

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

THAYSA AMÉLIA BORTOLOTI FERNANDES

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE ENCAPSULAMENTO DE
ANTICORPOS IGY VISANDO MANUTENÇÃO DA VIABILIDADE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2018

THAYSA AMÉLIA BORTOLOTI FERNANDES

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE ENCAPSULAMENTO DE
ANTICORPOS IGY VISANDO MANUTENÇÃO DA VIABILIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Takeo Ueno
Coorientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

LONDRINA
2018

TERMO DE APROVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE ENCAPSULAMENTO DE ANTICORPOS IGY VISANDO MANUTENÇÃO DA VIABILIDADE

THAYSA AMÉLIA BORTOLOTI FERNANDES

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 28 de novembro de 2018 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnóloga em Alimentos e foi avaliado pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Claudio Takeo Ueno
Prof. Orientador

Profa. Dra. Lyssa Setsuko Sakanaka
Avaliador do trabalho escrito e da apresentação oral

Profa. Dra. Marianne Ayumi Shirai
Avaliador do trabalho escrito

Profa. Dra. Amélia Elena Terrile
Avaliador da apresentação oral

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu querido orientador Prof. Dr. Claudio Takeo Ueno, por toda paciência, incentivo, trabalho e dedicação, pela sabedoria, simpatia e amizade. Sou muito grata por ter abraçado este desafio e por todos os ensinamentos. Imensamente obrigada!

Agradeço ao meu coorientador Prof. Dr. Emerson José Venancio e a Universidade Estadual de Londrina pela realização das análises, por todo aprendizado e experiências que foram muito enriquecedoras.

À Prof. Lyssa Sakanaka e Prof. Carlos Grosso, que me auxiliaram e me incentivaram muito para que este trabalho fosse adiante, obrigado por estar sempre à disposição para toda e qualquer dúvida, nos momentos de conquista, de desespero, de distrações e bate papo. O mesmo posso dizer para a Prof. Ana Flávia e Prof. Mariane Shirai, que estiveram sempre auxiliando em tudo que foi necessário. Vocês são muito queridos, obrigada!

As amigas e amigos, aos colegas de laboratório, que sempre me deram forças, me ampararam com as análises e ouviram meus desabafos. Cada um da sua maneira foi muito importante na realização desta pesquisa, Kamila, Vitor, Patrícia, Marcella, João Augusto, Rafaela, Larissa Piccinin, Paola, Talita.

Em especial, sou grata a minha amada mamãe, Michella Bortoloti, por ter me incentivado, apoiado minhas decisões, por ter tido paciência e sabedoria para me aconselhar. Agradeço por tudo o que sempre fez e faz por mim, por ter suportado minha ausência e estar ao meu lado em mais essa conquista! Sou grata a toda minha família, meu Pai, Primas, Tios, que sempre desejaram boas vibrações e me aconselharam para que eu chegasse até aqui, sem desistir.

Agradeço também a todos os que de alguma forma contribuíram para que esta pesquisa fosse concluída.

A todos vocês, um abraço e meus sinceros agradecimentos!

“We can be heroes, just for one day”
BOWIE, David. **Heroes**. West Berlin: RCA: 1977.

RESUMO

FERNANDES, Thaysa Amélia Bortoloti. **Desenvolvimento de processo de encapsulamento de anticorpos IgY**. 2018. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2018.

Micropartículas são compostas de um material encapsulante que isola a substância ativa a fim de preservá-la, sendo liberada apenas no local e momento adequado. Os anticorpos são capazes de reconhecer especificamente determinados patógenos provocando sua destruição ou inativação, garantindo a imunidade. A produção de anticorpos específicos da classe Ig-Y proveniente de ovos de aves apresenta vantagens econômicas de purificação quando comparada com anticorpos provenientes de mamíferos. A administração oral de IgY provou ser um tratamento bem sucedido para diversos tipos de infecções gastrointestinais e deve-se proteger a IgY contra a acidificação e degradação ao passar pelo estômago, chegando ao intestino e no local da infecção, intacta. Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo microencapsular a IgY pela técnica de gelificação iônica com alginato de sódio e quitosana. Os métodos utilizados envolveram a extração e purificação da IgY pelo método de precipitação com sal, ELISA quantitativo e indireto, eletroforese SDS-PAGE, microencapsulação por gelificação iônica e a caracterização das partículas obtidas (tamanho, morfologia, umidade e eficiência de encapsulação). A extração da IgY foi considerada eficiente, com pureza aceitável e obteve-se a concentração de $10,22 \pm 1,8$ mg/mL de anticorpos com reatividade contra BSA (soro albumina bovino) de 0,3406 nm. A técnica de microencapsulação foi eficiente em conferir micropartículas esféricas, densas, com tamanho de 1-2 μ m e 96% de umidade. A eficiência de encapsulação foi de 42,8 % ao analisar diretamente as micropartículas e 99,9 % pelo método indireto, analisando a solução residual de CaCl_2 /quitosana. Após o processo de encapsulação, a IgY manteve sua reatividade, com isso, pode-se afirmar que o processo manteve a IgY em suas condições viáveis (ativa) antes e após o procedimento, possibilitando que novas pesquisas sejam realizadas para verificar a continuidade desta atividade diante diferentes períodos de armazenamento e em determinadas condições, bem como a aplicação das micropartículas.

Palavras-chave: Microencapsulação. Gelificação iônica. Alginato. Quitosana. Imunoglobulina Y.

ABSTRACT

FERNANDES, Thaysa Amélia Bortoloti. **Development of IgY antibody encapsulation process**. 2018. 52 f. Course Conclusion Work (Food Technology) - Federal Technological University of Paraná. Londrina, 2018.

The microparticles are composed of an encapsulating material which isolates an active substance in order to be preserved, being released only at the appropriate time and place. Antibodies are able to recognize the pathogens that trigger their destruction or inactivation, thus ensuring immunity. The production of specific Ig-Y class antibodies was controversial when compared to mammalian antibodies. Oral administration of IgY has proven to be intact treatment of acidosis and degradation throughout the stomach, intestine and site of infection. Therefore, the objective of the present work was to microencapsulate IgY by the ionic gelation technique with sodium alginate and chitosan. The methods used involved the extraction and purification of IgY by the salt precipitation method, ELISA quantitative and indirect, SDS-PAGE electrophoresis, microencapsulation by ionic gelling and the characterization of the obtained particles (size, morphology, humidity and encapsulation efficiency). Extraction of IgY was considered efficient with acceptable purity and the concentration of 10.22 ± 1.8 mg/mL of antibodies reactive against BSA (bovine serum albumin) of 0.3406 nm was obtained. The microencapsulation technique was efficient in conferring dense and spherical microparticles with a size of 1-2 μ m and 96% humidity. The encapsulation efficiency was 42.8% when directly analyzing the microparticles and 99.9% by the indirect method, analyzing the residual solution of CaCl₂/chitosan. After the encapsulation process, IgY maintained its reactivity, thus, it can be affirmed that the process maintained IgY in its viable conditions (active) before and after the procedure, allowing further research to be performed to verify the continuity of this activity under different storage periods and under certain conditions, as well as the application of the microparticles.

Keywords: Microencapsulation. Ionic gelation. Alginate. Chitosan. Immunoglobulin Y.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Sequências de unidade M e G na estrutura de alginato de sódio	17
Figura 2 – Desenho esquemático do “modelo caixa de ovo” para gel de alginato de cálcio.....	17
Figura 3 – Estrutura química da quitosana.....	19
Figura 4 – Estrutura da Imunoglobulina.....	25
Figura 5 – Etapas do teste de ELISA indireto	30
Figura 6 – Eletroforese em Gel	31
Figura 7 – Gelificação iônica	33
Figura 8 – Etapas de extração de IgY.....	35
Figura 9 – Gráfico 1 – Atividade da IgY purificada	36
Figura 10 – Eletroforese da IgY	37
Figura 11 – Tamanho das micropartículas	38
Figura 12 – Micropartículas	38
Figura 13 – Micropartículas observadas em lupa	39
Figura 14 – Micropartículas observadas em microscópio ótico	40
Figura 15 – Micropartículas secas observadas em microscópio ótico	40
Figura 16 – Gráfico 2 – Atividade da IgY após microencapsulação	42
Figura 17 – Eletroforese das MPs IgY e solução residual	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3 MICROENCAPSULAÇÃO	13
3.1 AGENTES ENCAPSULANTES.....	15
3.1.1 Alginato.....	15
3.1.2 Quitosana.....	18
3.1.3 Complexo polieletrólito alginato-quitosana.....	20
3.2 MECANISMOS DE LIBERAÇÃO	21
3.3 OVOS DE GALINHA	22
3.4 IMUNOGLOBULINA Y	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 MATERIAIS	28
4.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA Y.....	28
4.3 ELISA quantitativo.....	29
4.4 <i>ELISA indireto</i>	29
4.5 ELETROFORESE SDS-PAGE.....	30
4.6 MICROENCAPSULAÇÃO POR GELIFICAÇÃO IÔNICA.....	32
4.7 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	33
4.8 UMIDADE.....	33
4.9 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

O conceito da microencapsulação originou-se a partir do modelo celular, pois a membrana cobre e protege o citoplasma, além de controlar a entrada e saída de nutrientes. Sendo assim, as micropartículas são compostas de um material encapsulante que isola a substância ativa a fim de preservá-la, sendo liberada apenas no local e momento adequado, estando em condições específicas de pH, temperatura, rompimento físico, dissolução e outros (SUAVE et al., 2006; OLIVEIRA, 2014).

Os primeiros registros desta técnica datam de 1930, mas a primeira aplicação comercial da tecnologia foi apenas em 1954 com a produção de papel de cópia sem carbono, composta com uma fina camada de microcápsulas de tinta que se rompia ao receber a pressão da ponta de um lápis, liberando o material encapsulado (SUAVE et al., 2006).

O desenvolvimento dessa tecnologia permitiu aplicações no meio agroindustrial, como em pesticidas, e na indústria alimentícia, que vem aumentando seu campo de aplicação desde corantes, temperos, vitaminas, minerais, embalagens, dentre outros, e se aplica também em produtos médicos, cosméticos e gráficos. Os objetivos desta técnica vão desde mascarar sabores e odores, como facilitar a manipulação do material, evitar perdas nutricionais, aumentar a vida de prateleira e preservar componentes (ROCHA, 2009; SUAVE et al., 2006; SILVA et al., 2003)

A aplicação das microcápsulas na indústria farmacêutica intensificou-se a partir da década de 50, tendo grande importância devido à possibilidade de liberação controlada de fármacos, redução do número de doses, tempo de trânsito no trato gastrointestinal e utilização em vacinas (SUAVE et al., 2006; JOSUÉ, 2002; VANDERBERG et al., 2001).

Dentre as formas de vacinação tem-se a imunização ativa, a qual o próprio organismo produz anticorpos naturalmente ou pelo contato com determinados antígenos, e a imunidade passiva, onde os anticorpos são transferidos pela placenta, aleitamento ou pela administração de anticorpos já prontos. Sendo assim, os anticorpos são essenciais para a proteção contra patógenos ao garantir a

imunidade, uma vez que reconhece estruturas estranhas ao organismo (HOMMA, 2003).

Diferentes tipos de anticorpos estão disponíveis para pesquisa, diagnóstico e terapias. Estudos sobre a produção de anticorpos específicos da classe IgY têm sido aplicados com sucesso para fins científicos, diagnósticos, profiláticos e terapêuticos, pois é o principal anticorpo produzido nas aves, estando presente no soro sanguíneo (IgG) e na gema do ovo (IgY) (MICHAEL et al., 2010).

A utilização de anticorpos provenientes de ovos é uma tecnologia alternativa para prevenção e tratamento de doenças, tanto em humanos quanto em animais, e apresenta vantagens econômicas, quando comparada à extração de anticorpos de mamíferos, pela fácil manipulação das galinhas e por não haver sangria do animal, utilizando apenas os ovos (SOARES, 2013; FERNANDES, 2013).

Para administração oral de IgY em seres humanos, deve-se proteger a IgY contra a acidificação e degradação ao passar pelo estômago, chegando ao intestino e no local da infecção, intacta. Diante disto, o uso de procedimentos como microencapsulação, emulsificação, uso de lipossomas e outras técnicas de encapsulamento vêm sendo estudadas, demonstrando serem bem-sucedidas para melhorar a estabilidade destes anticorpos (KOVACS-NOLAN; MINE, 2005).

2 OBJETIVOS

Microencapsular a imunoglobulina Y pela técnica de gelificação iônica, utilizando como agentes encapsulantes o alginato de sódio e a quitosana.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e purificar a IgY a partir da gema de ovo de galinha pelo método de precipitação com sal.
- Caracterizar a IgY extraída.
- Desenvolver microcápsulas pela técnica de gelificação iônica com os agentes encapsulantes alginato de sódio e quitosana.
- Caracterizar as micropartículas segundo morfologia, tamanho, eficiência de encapsulação e atividade de IgY após processo de encapsulamento.

3 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é uma tecnologia que permite empacotar partículas, no qual o material empacotado é denominado de recheio ou núcleo e o material que forma a cápsula, é denominado de material encapsulante, cobertura ou parede. O tamanho das cápsulas pode ser classificado como nanocápsulas ($< 0,2 \mu\text{m}$), microcápsulas (0,2 a $5000 \mu\text{m}$) e macrocápsulas ($< 5000 \mu\text{m}$), podendo conter mais de um tipo de recheio e vários materiais de parede para um mesmo núcleo (AZEREDO, 2005; REBELLO, 2009).

As aplicações desta tecnologia são vastas e de modo geral é utilizada para mascarar sabores e odores, reduzir a volatilidade, conferir proteção a substância em relação aos agentes externos (umidade, luz, pH, calor e oxidação) e garantir estabilidade e viabilidade do material encapsulado (SILVA et al., 2003; NOGUEIRA, 2013).

No campo da indústria farmacêutica, esta técnica vem sendo utilizada devido à liberação precisa e controlada de fármacos, focando na melhoria da segurança e eficácia da ação do fármaco, permitindo que a substância ativa seja liberada lentamente ou pela ação de algum componente do meio, evitando a perda ou a redução da eficácia do composto ativo pela redução ou eliminação dos efeitos do suco gástrico ou redução dos efeitos secundários provocados por outro fármaco (NOGUEIRA, 2013; SILVA et al., 2003).

Diante das diversas aplicações e objetivos desta técnica, é importante analisar as características da substância ativa para definir o tipo de material de parede, as condições de processamento as quais a microcápsula deverá resistir sem liberar seu conteúdo, a concentração da substância ativa dentro da microcápsula, o mecanismo de liberação e estabilidade. Devem também atender as necessidades de sua aplicação, podendo ser alterada em relação a sua composição, tamanho, morfologia, processamento, mecanismo de liberação e custo (ROCHA, 2009).

A escolha do material de parede também é de grande importância, pois influencia na estabilidade e eficiência da microcápsula. As propriedades físico-químicas devem ser levadas em consideração, assim como a aplicação desejada, o método utilizado para formação das micropartículas, viscosidade, higroscopicidade,

capacidade de reação com o material ativo, não possuir sabor dependendo do caso da aplicabilidade em produtos alimentícios, viabilidade econômica e ser capaz de formar uma barreira entre a fase interna e externa garantindo proteção máxima ao material ativo em condições adversas (SUAVE et al., 2006, NEDOVIC et al., 2011, SILVA et al., 2014).

A escolha do método de microencapsulação varia de acordo com o material ativo e do agente encapsulante, em relação à aplicação e tamanho da micropartícula, mecanismo de liberação e de suas propriedades físico-químicas (SUAVE et al., 2006; ROCHA, 2009). Os métodos se diferem quanto ao modo de formação das micropartículas, em relação a como os agentes se interagem, portanto podem ser divididos em:

- Métodos físicos: *spray drying*, *spray cooling*, pulverização em banho térmico, leite fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, co-cristalização e liofilização.
- Métodos químicos: inclusão molecular e polimerização interfacial.
- Métodos físico-químicos: coacervação, emulsificação seguida de evaporação do solvente, pulverização em agente formador de reticulação (gelificação iônica) e envolvimento lipossômico (SUAVE et al., 2006; SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000).

Para ocorrer a formação das microcápsulas, basicamente três fases devem acontecer, sendo a preparação da solução contendo o material de parede e o material ativo (recheio), a deposição do material de parede ao redor do recheio e a fixação ou solidificação da estrutura da parede (ROCHA, 2009).

Um das técnicas que vem sendo comumente empregada e considerada rápida, com procedimentos simples e relativamente de baixo custo é a gelificação iônica. Esse é um método de encapsulação de compostos tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos e utiliza a capacidade dos polieletrólitos de fazerem ligações cruzadas na presença de íons com cargas opostas para formar uma estrutura em malha tridimensional. Sendo assim, uma solução polimérica carregada negativamente forma ligações cruzadas com cátions de baixa massa molecular, formando hidrogéis (HOLKEM; CODEVILLA; MENEZES, 2015; COSTA, 2014).

Esta técnica pode ser dividida em gelificação iônica interna, que é baseada na liberação de íons cálcio em uma solução polimérica contendo o material de

recheio. Essa que é emulsificada em uma fase oleosa contendo surfactante seguida de redução do pH, provocando então a liberação dos íons cálcio e sua complexação. E há a gelificação iônica externa, que ocorre pela interação de diferentes polissacarídeos na presença de íons multivalentes (NOGUEIRA, 2013).

O tempo de permanência das partículas na solução reticulante, o pH e concentração do polissacarídeo e do cátion são fatores que podem influenciar na porosidade e estabilidade das micropartículas formadas, podendo determinar o tempo de liberação do material ativo (NOGUEIRA, 2013).

3.1 AGENTES ENCAPSULANTES

Para o método de microencapsulação há uma grande variedade de agentes encapsulantes que podem ser utilizados, dentre eles pode-se citar, as gomas (goma arábica, ágar, alginato de sódio, carragena), os carboidratos (amidos, pectina, dextrinas, celulose e quitosana), os lipídeos (cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, mono e diglicerídeos, óleos e gorduras hidrogenadas), as proteínas (glúten, caseína, isolado proteico de soro de leite, gelatina e albumina) e os polímeros sintéticos (poliacrilatos, copolímeros de polietileno-co-propileno, poli(ϵ -caprolactona) (SUAVE et al., 2006; NOGUEIRA, 2013).

3.1.1 Alginato

O alginato é um polissacarídeo que pode ser extraído de algas pardas (*Phaeophyceae*, *Laminaria hiperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*) e suas características podem variar de acordo com a espécie da alga e das diferentes partes da planta utilizada para extração, assim como pode ser também obtido por bactérias. As aplicações industriais do alginato estão ligadas a suas propriedades de estabilizante,

capacidade de reter água, viscosidade, solubilidade e capacidade de formação de gel (PAOLETTI; DONATI; REHM, 2009; BRESSEL, 2007; LEE; MOONEY, 2012).

Estruturalmente, o alginato é um polissacarídeo linear constituído por unidades monoméricas, o ácido β -D-manurônico (M) e o ácido α -L-gulurônico (G), que se agrupam em blocos sequenciais MM, MG e GG, por diferentes ligações glicosídicas entre os carbonos C-1 e C-4 das unidades monoméricas. Estas ligações variam com a proporção, distribuição e número de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas destes blocos, que irão definir as configurações espaciais dos blocos M e G, determinando as propriedades químicas e físicas da molécula de alginato (BRESSEL, 2007). As unidades M e G nos alginatos podem ser aleatoriamente ou não aleatoriamente organizadas como sequências heterogênea ou homogênea (Figura 1) (FU et al., 2011).

As propriedades como inchaço osmótico, difusão, resistência mecânica, estabilidade química, densidade de carga, transparência e atividade biológica são conduzidas principalmente pela composição e estrutura sequencial do alginato (STRAND et al., 2002; MARTINSEN; SKJBK-BRAEK; SMIDSRSD, 1987). Da mesma forma, a gelificação do alginato sofre interferência da composição e distribuição dos blocos M e G, pela concentração de alginato, presença de impurezas, concentração dos íons gelificantes e também pelo tamanho da gota (BRESSEL, 2007).

Os géis são formados na presença de cátions divalentes como o cálcio (Ca^{2+}) e para explicar as propriedades gelificantes do alginato um modelo foi proposto por Grant em 1973, conhecido como o modelo “caixa de ovo” (Figura 2). Esse modelo exemplifica como os cátions (como cálcio) interagem com os monômeros de ácidos gulurônicos gerando um emparelhamento de blocos G, sendo que o alginato modifica a sua forma linear gerando uma rede tridimensional, ampliando a possibilidade de mais íons cálcio reagir com o alginato, formando então estruturas cada vez mais complexas (BRESSEL, 2007; FU et al., 2011).

Durante a gelificação com alginato, os cátions divalentes se ligam preferencialmente aos blocos G de uma maneira altamente cooperativa, pois os resíduos G exibem uma afinidade mais forte por íons divalentes do que os resíduos M (TONNESEN; KARLSEN, 2002). As interações iônicas entre blocos G e os íons cálcio causam a formação de um gel mais resistente e termoestável cujas

propriedades dependem em grande parte sobre as características do polímero e da escolha do método (REIS et al., 2006; FUNDUEANU et al., 1999).

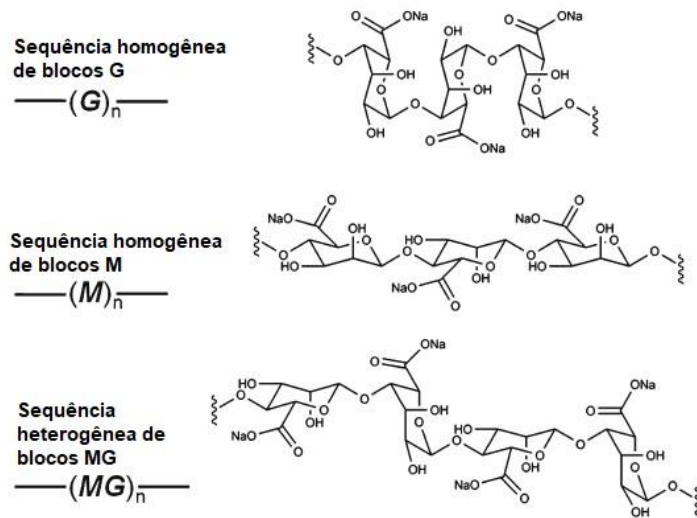


Figura 1 – Sequências de unidade M e G na estrutura de alginato de sódio

Fonte: Adaptado de FU et al. (2011).

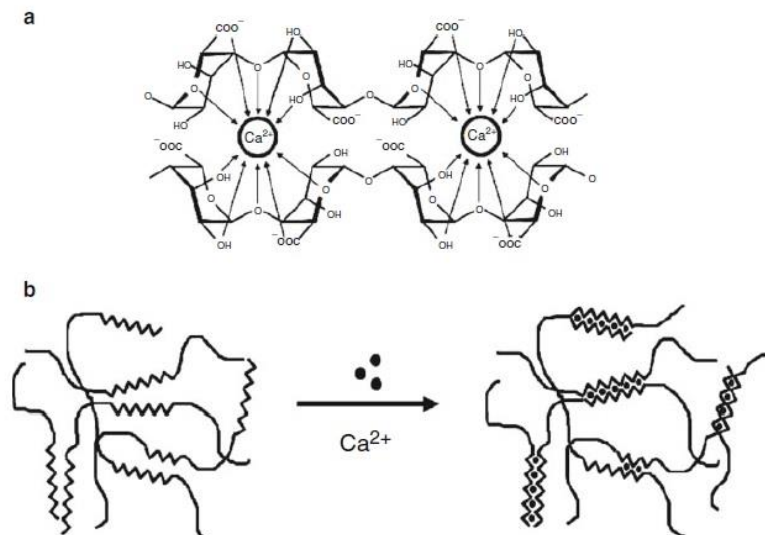


Figura 2 – Modelo “caixa de ovo” para a estrutura do gel de alginato de cálcio

A. O modelo “caixa de ovos”. B. Formação de junções inter-cadeias.

Fonte: Rehm (2009).

Na indústria alimentícia o alginato é muito utilizado por sua capacidade de estabilizar misturas, dispersões e emulsões aquosas, em conjunto com as propriedades de formação de gel e viscosidade. Pode ser encontrado na formulação de sorvetes, produtos lácteos e misturas para bolos, cervejas e sucos e, em filmes bioativos para recobrimento de alimentos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

Da mesma forma é muito utilizado nas áreas médicas e farmacêuticas, como em medicamentos para refluxo, curativos e imobilização de células, organismos microbianos vivos e animais, agente encapsulante, agente gelificante, agente de formação de filmes, dentre outras diversas aplicações. Sua semelhança estrutural a matrizes extracelulares de tecidos vivos permite também amplas aplicações na cicatrização de feridas, entrega de agentes como pequenas drogas químicas e proteínas com liberação controlada, e transplante de células (PAOLETTI; DONATI; REHM, 2009; BRESSEL, 2007; MARTINSEN; SKJBK-BRAEK; SMIDSRSD, 1987; LEE; MOONEY, 2012).

Sua aplicação é bem valiosa para a indústria farmacêutica, pois pode formar um gel capaz de aprisionar e liberar drogas de forma controlada, além de possuir baixo custo, baixa toxicidade e ser hidrofílico (MURTAZA et al., 2011; LEITE, 2014). Devido a esta propriedade, vários estudos foram desenvolvidos e demonstraram que as esferas de alginato de cálcio são excelentes veículos, tornando possível realizar a encapsulação de agentes bioativos e macromoléculas como células, enzimas, proteínas e vacinas (PATIL et al., 2010).

3.1.2 Quitosana

A quitosana (Figura 3) é um polissacarídeo catiônico não ramificado, composto de copolímeros de unidades de D-glucosamina e N-acetil-d-glucosamina ligadas por ligações β -(1-4)-glicosídicas (MATEESCU; ISPAS-SZABO; ASSAAD, 2015).

É derivada da quitina, polímero natural extraído do exoesqueleto de crustáceos e insetos, e foi isolada em 1859 pelo aquecimento da quitina em solução

concentrada de hidróxido de potássio, resultando na sua desacetilação (DAMIAN et al., 2005).

É um polímero biodegradável e se caracteriza por possuir grupos amínicos livres, pela solubilidade em soluções ácidas e em pH inferior a 6,5, insolubilidade em solventes orgânicos, em pH superior a 6,5 e em ácido sulfúrico. Possui capacidade de formar soluções viscosas com formação de gel com poliânions e de se solubilizar em misturas de água e álcool (JOSUE, 2002; DAMIAN et al., 2005).

O grau de desacetilação, distribuição de massa molar e conteúdo de impurezas da quitosana são dependentes das fontes naturais de matéria-prima e dos métodos de preparação (LARANJEIRA; FAVARE, 2009).

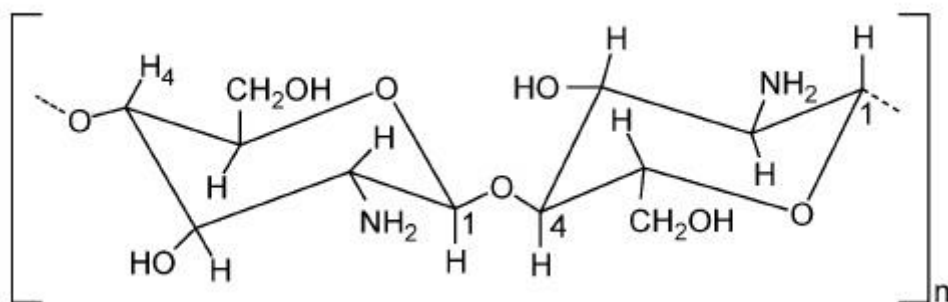


Figura 3 – Estrutura química da quitosana

Fonte: van der Merwe (2004).

Sua aplicação é ampla, desde a área alimentícia, nutrição, biotecnologia, agricultura, tratamento de águas, produção de cosméticos, medicamentos, membranas semipermeáveis e no desenvolvimento de biomateriais, além de possuir propriedades antimicrobianas e estimulantes do sistema imune, as quais são manifestadas na aceleração de cicatrizações de feridas (SANTOS; SOARES; DOCKAL, 2003; AZEVEDO et al., 2007; DAMIAN et al., 2005; FERRARI; GENENA; LENHARD, 2016).

A quitosana pode se complexar eletrostaticamente com grupos aniônicos como a pectina, a goma xantana e o alginato, formando complexos polieletrólitos e

proporcionando propriedades físico-químicas eficientes para o desenvolvimento de formulações e sistemas de administração de fármacos (HAMMAN, 2010; TAGLIARI, 2012).

3.1.3 Complexo polieletrólito alginato-quitosana

Os complexos de polímeros são formados pela associação de dois ou mais polímeros complementares e podem se ligar através das forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, ou pelas combinações dessas interações. Estes complexos podem ser formados entre porções de cargas opostas na mesma cadeia polimérica, ou nas mesmas unidades monoméricas. Desta forma, polieletrólitos em solução podem se ligar a íons multivalentes para formação de gel ou coacervados (DUMITRIU, 2001).

O alginato é um polieletrólito aniônico frequentemente utilizado na formação de complexos com quitosana (catiônico). Ao mesmo tempo em que o complexo formado entre estes dois polímeros é biodegradável, possui biocompatibilidade e mucoadesividade. É também mecanicamente forte em baixos valores de pH onde a quitosana é solúvel, características as quais proporcionam grande interesse para a liberação controlada de agentes ativos (HAMMAN, 2010; TAGLIARI, 2012).

Em solução aquosa, os grupos amino da quitosana interagem com os grupos carboxílicos do alginato de sódio para formar um complexo polieletrólito de alginato-quitosana. Com este complexo a dissolução de quitosana em pH baixo é reduzida pelo alginato e a dissolução do alginato em pH neutro é reduzida pela quitosana, e estruturalmente o complexo reduz a porosidade dos grânulos de alginato e diminui a liberação do composto encapsulado. Alguns fatores podem afetar as propriedades das cápsulas de alginato-quitosana, como a composição do alginato utilizado, bem como seu peso molecular, e também o grau de desacetilação da quitosana (GEORGE; ABRAHAM, 2006; MATEESCU; ISPAS-SZABO; ASSAAD, 2015).

Existem três tipos de interações nas redes de alginato-quitosana: interação eletrostática entre cargas opostas dos polos; interação eletrostática de íons de cálcio

com alginato; e ligações de hidrogênio inter-cadeias de alginato-quitosana (LIU et al., 1997).

Dois diferentes procedimentos podem ser utilizados para preparar partículas de alginato e quitosana e, em ambos, o revestimento de quitosana é formado. O primeiro procedimento consiste em gotejar a solução de alginato em uma solução de quitosana contendo cloreto de cálcio, assim os íons de cálcio, devido ao seu baixo peso molecular, se difundem mais rapidamente que a quitosana no núcleo de alginato para formar um núcleo de gel (LI et al., 2009a; MATEESCU; ISPAS-SZABO; ASSAAD, 2015).

O segundo procedimento é um método de duas etapas, onde a solução de alginato é gotejada em uma solução de cálcio para formar as partículas de alginato-cálcio, em seguida as partículas já formadas são suspensas em uma solução de quitosana, permitindo a formação de uma camada de quitosana na superfície da partícula. O material a ser encapsulado é disperso na solução de alginato ou na solução de quitosana antes de misturar estas duas soluções (GASEROD; SMIDSROD; SKAJAK-BRAEK, 1998; MATEESCU; ISPAS-SZABO; ASSAAD, 2015).

O contato entre o alginato e o cálcio em solução induz a polimerização iônica interfacial imediata do alginato através da ligação do cálcio dentro das cavidades dos resíduos gulurônicos, formando assim uma microcápsula polianiônica. A adição de poliacrílate ao meio de gelificação induz a formação de complexos polianiônico-policatiônicos, que estabilizam a rede de gel iônico e reduzem a permeabilidade ao alginato (VANDERBERG et al., 2001).

3.2. MECANISMO DE LIBERAÇÃO

Um dos principais objetivos da microencapsulação, pelo qual é muito utilizada industrialmente, é a liberação controlada. A liberação do material ativo ocorre de uma forma controlada por um período de tempo, evitando a perda do material durante o processamento e a possível interação com agentes reativos, assim como a perda de sua integridade (ROCHA, 2009).

Os mecanismos de liberação do material ativo microencapsulado variam de acordo com as características dos agentes encapsulantes e condições do meio, com a variação de temperatura, de pH, solubilidade do meio, biodegradação, ruptura mecânica, permeabilidade seletiva e gradiente de concentração existente em relação ao meio de liberação, dissolução em solventes, intumescimento, pressão osmótica, por difusão ou ação de enzimas (ROCHA, 2009; JOSUE, 2002; FAVARO-TRINDADE, PINHO, ROCHA, 2008).

Dentre estes mecanismos o mais comum é a difusão, onde o material ativo migra de sua posição inicial no polímero para a superfície e posteriormente para o lugar de atuação. As etapas envolvidas na liberação do recheio são: absorção de solvente pela cápsula (como a água); dissolução da parede; dissolução do recheio e permeação do recheio pela parede e difusão do recheio no solvente (ROCHA, 2009; JOSUE, 2002).

Se a administração das microcápsulas for via oral, deve-se levar em consideração as condições fisiológicas por onde ela percorrerá, para verificar se tais condições irão interferir na integridade da microcápsula, e então projetar o sistema de liberação controlada adequado para que o material ativo seja liberado somente no local desejado. Portanto, as condições do meio gastrointestinal devem ser avaliadas, pois fatores como pH, o esvaziamento gástrico e a atividade de enzimas digestivas podem interferir na integridade das microcápsulas (JOSUE, 2002).

3.3 OVOS DE GALINHA

O ovo de galinha (*Gallus domesticus*) é um dos alimentos mais completos para a nutrição humana, pois é rico em vitaminas, minerais, ácidos graxos e proteínas que reúnem vários aminoácidos essenciais de excelente valor biológico (REGO et al. 2012).

A produção industrial do setor de ovoprodutos demonstrou uma enorme capacidade de rentabilização e aproveitamento de todas as partes do ovo, ampliando os diversos tipos de produtos à base de ovos que são ofertados no mercado, possuindo versatilidade, fácil armazenamento e utilização, mantendo um

nível de estabilidade, uniformidade e garantia de controle microbiológico (GOMES, 2012).

O ovo é constituído por três partes principais: casca, gema e clara. Além disso, possui outras partes em menor proporção como o disco germinativo, a calaza, a câmara de ar, a cutícula e as membranas da casca (GOMES, 2012; MINE, 2008).

A clara do ovo consiste de 88% de água, 11% de proteínas e uma pequena quantidade de lipídeos, carboidratos e minerais. Por outro lado, as proporções para gema de ovo são cerca de 48% água, 32-35% de lipídios e 15,7-16,6% proteínas, 0,2-1,0% de carboidratos e 1,1% de teor de cinzas (MINE, 2008).

As proteínas estão distribuídas por todo o ovo, sendo encontrada em sua grande maioria na gema e clara de ovo, e uma pequena porção na casca e membrana de casca do ovo, enquanto os lipídios são encontrados quase exclusivamente na gema, principalmente na forma de lipoproteínas, e podem estar combinadas com outras proteínas (KOVASC-NOLA; PHILLIPS; MINE, 2005; MINE, 2008).

A gema pode ser dividida em sobrenadante e precipitado. Os principais componentes dos grânulos da gema são lipoproteínas de alta densidade (HDL) (α -lipovitelinas e β -lipovitelinas), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e fosvitinas (MINE, 2008).

O plasma é composto por proteínas solúveis em água, que são as α -livetinas (80 kDa), β -livetinas (40-42 kDa) e γ -livetinas (180 kDa). A γ -livetinas, também denominadas imunoglobulina Y, compreendem glicoproteínas estruturalmente diferentes da IgG de um mamífero. Elas podem ser encontradas tanto no soro da ave como na gema do ovo (KOVASC-NOLA; PHILLIPS; MINE, 2008).

Atualmente, as galinhas são submetidas a processos de imunização, na qual são injetados antígenos, para estimular o sistema imune desses animais e então protegê-los contra doenças infecciosas. Da mesma forma que os anticorpos maternos, em mamíferos, são transferidos para a prole via placenta e através do aleitamento, a imunidade adquirida de galinha é transmitida aos seus filhotes através do ovócito. A partir deste conhecimento, a coleta de ovos não embrionados é considerada como uma potencial fonte de produção de anticorpos IgY (MINE, 2008).

3.4 IMUNOGLOBULINAS

O sistema imunológico é constituído por diversas células e moléculas presentes em todo o organismo, sendo capaz de reconhecer especificamente determinados patógenos provocando sua destruição ou inativação. A capacidade de defesa do organismo desencadeia diferentes respostas imunológicas, como resposta imune inata e adaptativa, responsáveis por combater tais patógenos (MARTÍNEZ; ALVAREZ-MON,1999).

A resposta imune inata está sempre disponível a combater uma variedade de patógenos, através de mecanismos de defesa celulares e bioquímicos, mas não conduz a uma imunidade duradoura e não é específica para nenhum patógeno individual. Já a resposta imune adaptativa é desenvolvida durante a vida do indivíduo como uma adaptação às infecções causadas por um ou mais patógenos (antígenos) e, é caracterizada por sua especificidade e capacidade de responder repetidas vezes ao mesmo patógeno conferindo então uma memória imunológica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Os componentes exclusivos da imunidade adaptativa são células denominadas linfócitos e seus produtos secretados, tais como anticorpos, a qual é dividida em imunidade humoral (mediado por linfócitos B, secretores de anticorpos) e imunidade celular (mediado por linfócitos T, reconhecem patógenos e auxiliam na ativação dos linfócitos B) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

As imunoglobulinas (Ig), também chamadas de anticorpos, são produzidas pelos linfócitos B na medula óssea e secretadas no soro. São moléculas de natureza glicoproteica, divididas em classes e subclasses e fazem parte do sistema imune humoral, que é dirigido para infecções bacterianas, vírus extracelulares e também para proteínas estranhas. Possuem a função de reconhecer o antígeno, se ligar a estas moléculas identificadas como estranhas e neutralizá-la (NELSON; COX, 2014).

Os anticorpos têm uma estrutura composta por duas regiões distintas, sendo uma região constante e uma região variável. Cada molécula possui quatro cadeias de polipeptídios ligadas covalentemente por pontes de dissulfeto, sendo duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas (Figura 5). As cadeias leves e pesadas possuem regiões variáveis que se combinam para formar um sítio

de ligação do antígeno, então, ambas as cadeias contribuem para a especificidade de ligação do antígeno da molécula de anticorpo (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Em mamíferos existem cinco classes de imunoglobulinas, conhecidas como IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, que podem ser distinguidas por suas regiões constantes, enquanto as diferenças na região variável são em relação a especificidade de ligação com o antígeno (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Em aves existem 3 classes de imunoglobulinas, IgM, IgA e IgG. Os anticorpos IgG são encontrados no soro e nos ovos, mas existem algumas características diferentes entre a IgG de mamíferos e de aves, como peso molecular, ponto isoelétrico, temperatura de desnaturação, a não interação da IgG com receptores de fragmentos Fc e nem com proteínas do sistema complemento dos mamíferos. Outrora, a IgG aviária que está presente no ovo é denominada também de anticorpo da gema de ovo e imunoglobulina Y (IgY) (MINE, 2008; FERREIRA JUNIOR, 2012; GUIMARÃES, 2015; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012).

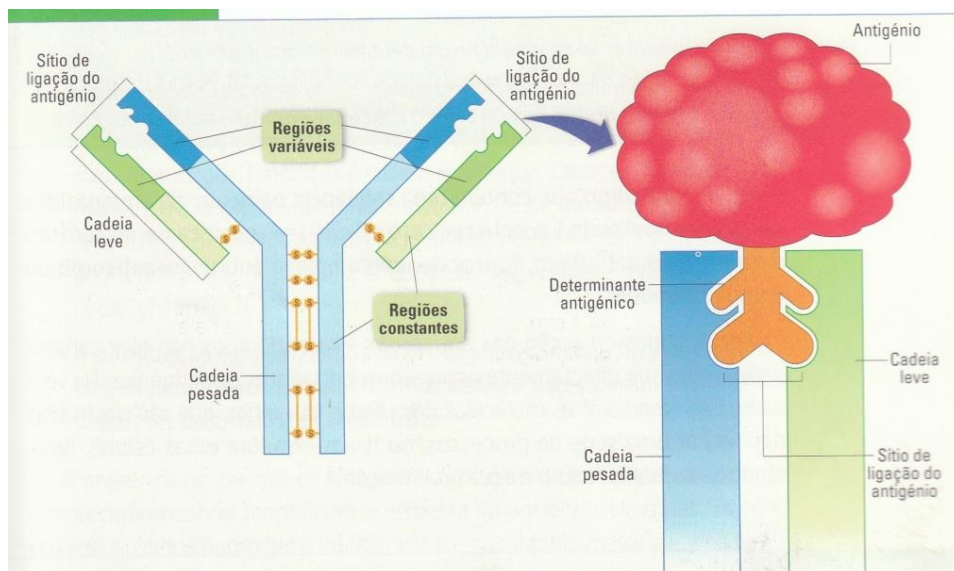


Figura 4 – Estrutura da Imunoglobulina

Fonte: Blogspot (2010).

A vacinação de galinhas, coleta e processamento automatizados de ovos já é realizado em escala industrial, tornando a produção em larga escala de IgY tecnicamente viável (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012).

A utilização de IgY possui vantagens atrativas quando comparadas ao isolamento de anticorpos de mamíferos, pois este envolve geralmente processo de imunização e sangria do animal. Em aves, o processo é mais eficiente por meio da redução do número de animais, diminuição do sofrimento causado ao animal, uma vez que se utilizam os ovos das aves, além de que as galinhas têm menor custo de manutenção e são de fácil manipulação (KARSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004; SOARES, 2013).

Há diferentes métodos de isolamento, eficientes e econômicos, no entanto garantem diferentes estabilidades, atividade, pureza e rendimento do processo e do anticorpo extraído. A escolha de um método específico depende do rendimento e pureza desejados, da aplicação final do IgY, bem como custo de material, tecnologia, habilidades de trabalho e escala de extração (KARSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004; MUNHOZ, 2014; SOARES, 2013).

Uma gema de ovo contém cerca de 100-150 mg de anticorpos IgY (KARSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004) e sua atividade da IgY pode ser afetada pela temperatura e pelo tempo de exposição. Perdas de atividade foram observadas em temperaturas acima de 70 °C, enquanto permanecem estáveis em 60°C. A IgY é relativamente estável entre pH 4 e pH 11, mas pode reduzir rapidamente sua atividade acima de pH 12. Em pH 3,5 a atividade de IgY diminui e é quase completamente perdida em pH 3, devido a mudanças conformacionais em sua estrutura. No entanto, a estabilidade do pH também pode ser melhorada pela adição de estabilizadores, tais como açúcares e carboidratos (GUIMARÃES, 2015; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012).

Os anticorpos são suscetíveis à digestão proteolítica, a inativação de IgY durante os processos digestivos pode ser uma grande preocupação para aplicações de imunoterapia oral (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012; SHIMIZU et al., 1988). Alguns estudos demonstram que a IgY é estável contra enzimas digestivas, tripsina e quimotripsina. Embora haja uma grande perda de atividade através da pepsina em condições de baixo pH em pouco tempo (MULLER et al., 2015).

Shimizu et al. (1988) avaliaram que em condições de congelamento e liofilização a atividade de IgY não é afetada, a menos que repetida várias vezes. Demonstrou também que a IgY é sensível a digestibilidade da pepsina em pH 4,5 e abaixo, perdendo a atividade de anticorpo.

Atualmente diversos estudos mostram a aplicação desses anticorpos na pesquisa básica e aplicada, assim como na indústria farmacêutica para implementação de kits diagnósticos, terapias, cosméticos e, também pode ser utilizado como aditivo de alimentos funcionais (GUIMARAES; CORREIA; GAMA FILHO, 2008).

A administração oral de IgY provou ser um tratamento bem sucedido para diversos tipos de infecções gastrointestinais, para prevenção de infecções com *Pseudomonas aeruginosa*, formação de placas bacterianas por *Streptococcus mutans*, desenvolvimento de úlcera gástricas por *Helicobacter pylori*, enterites por *Escherichia coli*, e rotavírus humano (GUIMARAES; CORREIA; GAMA FILHO, 2008).

4 METODOLOGIA

Esta pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Análise de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) e no Laboratório de Imunologia IV da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Os métodos utilizados envolvem a extração e purificação da imunoglobulina Y a partir da gema de ovo, eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE para verificar a pureza da IgY extraída, a técnica de microencapsulação por gelificação iônica, caracterização das micropartículas, determinação da eficiência de encapsulação (teste de ELISA quantitativo) e avaliação da atividade de IgY (teste de ELISA indireto).

4.1 MATERIAIS

Utilizaram-se ovos de galinhas adquiridos comercialmente. Alginato de sódio puríssimo (Cinética), quitosana (Polymar, lote 01012017, com grau de desacetilação de 85%), cloreto de cálcio P.A dihidratado (Dinâmica, lote 88295) e demais reagentes comerciais PA.

4.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA Y

A metodologia utilizada foi proposta por Akita e Nakai (1992). Separou-se a gema da clara, lavou-se com água destilada e cuidadosamente removeu a película (calaza). O volume da gema foi diluído em 1:7 com água destilada pH 2,5 (0,1 M HCl), proporcionando pH final de 5,2, e foi mantida por 24 horas, a 4°C. Toda a solução foi filtrada com papel Whatmann nº 1 e a fração solúvel foi precipitada com solução de sulfato de amônio saturado, mantida por 30 minutos sob agitação. Esta foi centrifugada a 5000 rpm, por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o

precipitado ressuspendido com sulfato de sódio 18% (p/v), incubado por 20 minutos e centrifugado a 4000 rpm, por 20 minutos. O precipitado foi novamente ressuspendido, utilizando sulfato de sódio 14% (p/v), incubado por 20 minutos e centrifugado a 4000 rpm, por 20 minutos. O precipitado resultante foi ressuspendido com 2 mL de PBS 1x (solução salina tamponada com fosfato) e armazenado no congelador, neste precipitado se encontra a IgY.

A amostra foi dialisada com PBS 1x em tubo de celulose para diálise 33 mm, Sigma Aldrich, (D9652-100FT), previamente tratada em água fervente por 30 minutos, seguida de lavagem com solução de bicarbonato de sódio 0,01 M, solução EDTA 0,01 M por 30 minutos e água destilada. Para avaliar a pureza da IgY extraída, fez-se análise de eletroforese (SDS-PAGE), a quantificação e atividade foram determinadas por ELISA quantitativo e indireto, respectivamente.

4.3 ELISA QUANTITATIVO

O teste de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) quantitativo foi realizado em placa de 96 poços de fundo chato segundo as recomendações do fabricante Bethyl (cat nº E30-104, lote nº E30-104-26).

Os dados do ELISA quantitativo são interpretados em comparação com uma curva padrão (uma diluição seriada de um antígeno conhecido) para calcular com precisão a concentração do anticorpo presente nas amostras (BOSTER, 2018).

4.4 ELISA INDIRETO

O teste de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) é uma técnica de dosagem de anticorpos e antígenos através de reações enzimáticas (BRACHT; ISHIII-IWAMOTO, 2003).

O ELISA indireto (Figura 6) foi realizado em placa com 96 poços de fundo chato, a qual foi sensibilizada com 50 µL/poço de antígeno BSA (albumina do soro bovino) na concentração de 50 µg/mL em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6,

incubada overnight a 4°C. Após a incubação, o bloqueio foi efetuado com 100 µL de PBS 1x/leite em pó desnatado 5% e incubado por 1 hora a 37°C, seguida de uma lavagem com 200 µL/poço de PBS 1x. A amostra (anticorpo primário) foi preparada e diluída em solução PBS 1x/leite em pó desnatado 1% e foi adicionado 50 µL/poço da amostra, incubada por 1 hora a 37°C, seguida de três lavagens com 200 µL/poço de PBS 1x/Tween 20 0,05%. Adicionou-se 50 µL/poço de anticorpo secundário IgG de cabra anti cadeia leve e pesada de IgY conjugado com peroxidase (lote nº A30-106P-28) diluído 1:40.000, incubado por 1 horas a 37 °C, seguido de três lavagens com 200 µL/poço de PBS 1x/Tween 20 0,05%. O substrato adicionado (50 µL/poço) foi confeccionado com uma parte de TMB 1x, Água oxigenada 1x e acetato de sódio 98x, e a reação foi conduzida na ausência de luz durante aproximadamente 15 minutos. Após, foi adicionado 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2N para interromper a reação e efetuou a leitura em espectrofotômetro na absorvância de 450nm.



Figura 5 – Etapas do teste de ELISA indireto

Fonte: adaptado de CÂMERA, 2018.

4.5 ELETROFORESE EM GEL SDS-PAGE

A eletroforese é uma técnica de migração de moléculas carregadas, em um determinado meio, sob a influência de um campo elétrico. A eletroforese em gel SDS-PAGE (Eletroforese em gel poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio) é aplicada para separação de proteínas com base no seu peso molecular e pode ser

realizada com a proteína desnaturada (utilização do β -mercaptoetanol), assim será separada as sub-unidades da proteína (BRACHT; ISHIII-IWAMOTO, 2003).

Para a técnica de SDS-PAGE as amostras foram diluídas para obter 5 μ g de proteínas em 10 μ L de solução, e nesta foi adicionado 5 μ L de tampão de amostra (8,5% de solução A (tris 0,757%, SDS 2%, água destilada, pH 6,8), 1% de glicerol, 0,5% de β -mercaptoetanol, 2% de solução 1% de azul de bromofenol), em seguida foram aquecidas por 6 minutos em aproximadamente 96 °C, para que ocorresse a quebra de pontes dissulfeto. Como padrão molecular foi utilizado o BenchMark™ Proteing Ladder (lot nº. 1714702, cat. nº. 10747-012), Invitrogen™. O gel de empilhamento foi preparado a 10% de SDS poliacrilamida (gel buffer 4x pH 8,8, acrilamida 30%, persulfato de amônia 10%, TEMED e água destilada) e o gel de separação a 5% (stacking buffer, acrilamida 30%, persulfato de amônia 10%, TEMED e água destilada). O gel foi submetido a uma corrente de 80 volts para o gel de empilhamento e 120 volts no gel de separação, com 15 mA (Figura 5). Após a corrida, o gel foi corado utilizando solução de Comassie Brilliant Blue R-250 (Comassie Brilliant Blue R-250 0,2%, metanol 45%, ácido acético 10% e água destilada), em temperatura ambiente *overnight*, e descorado com solução de metanol 45%, ácido acético 10% e água, posteriormente foi realizado o registro fotográfico em fotodocumentador L-Pix (Loccus) para gel de eletroforese (e outras técnicas).

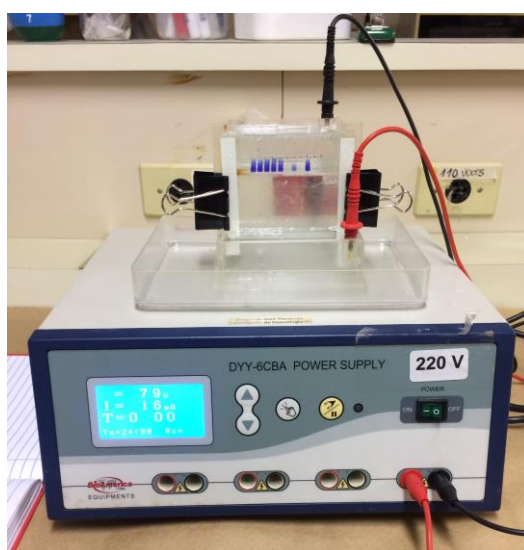


Figura 6 – Eletroforese em gel

Fonte: Autoria Própria, 2018

4.6 MICROENCAPSULAÇÃO POR GELIFICAÇÃO IÔNICA

A IgY foi microencapsulada pelo método proposto por Li et al. (2009a) e Vanderberg et al. (2001). Segundo essas metodologias, foram utilizadas soluções de alginato de sódio 2% (p/v), quitosana 0,2% (v/v) e cloreto de cálcio 1,5% (p/v). Para o material de recheio, a proporção utilizada foi de 25% de IgY sob 2% de alginato, ou seja, para cada 2 g de alginato utilizou-se 0,5 g de IgY em 100 mL de solução.

A solução de quitosana foi preparada previamente a 1% (p/v) dissolvida em ácido acético 1% (v/v), utilizando aquecimento brando. Posteriormente, esta solução de quitosana 1% foi diluída na solução cloreto de cálcio para obter concentração de 0,2%.

A gelificação iônica foi realizada confeccionando dois tratamentos de micropartículas, as MPs Branco (sem material de recheio) e as MPs IgY (contém IgY como recheio).

A técnica consiste em gotejar (Figura 6), utilizando seringa acoplada de agulha (0,7x25 mm), 40 mL de solução de alginato 2% em 150 mL de solução de cloreto de cálcio 1,5% quitosana 0,2%, sob agitação. Estas permaneceram sob agitação lenta por 30 minutos para maturação (estabilizar os complexos, formando uma estrutura mais enrijecida) e em seguida foram removidas, lavadas com água destilada e armazenadas a 4°C.

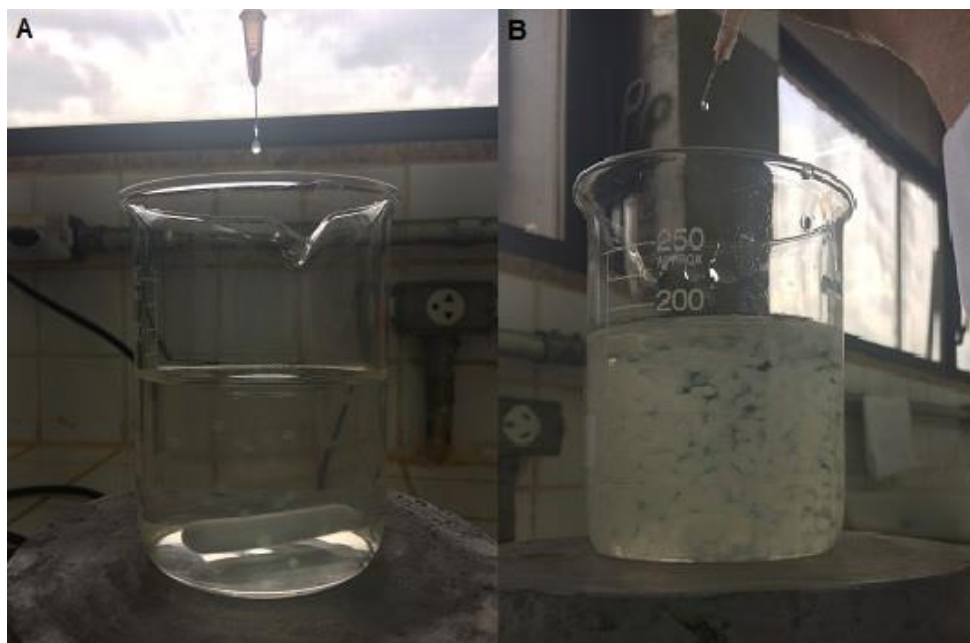


Figura 7 – Gelificação iônica

A. Início do processo. B. Formação das micropartículas.

Fonte: Autoria Própria, 2018.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

A caracterização em relação à forma e tamanho das micropartículas foi realizada por microscopia ótica de captura de imagem, utilizando o software Motic® em microscópio ótico e também em lupa acoplada a câmera digital.

4.8 UMIDADE

Foi avaliado o teor de umidade, com 5 g de amostra (em triplicata), secas em estufa a 50 °C até peso constante, seguindo a metodologia descrita no manual do Instituto Adolfo Lutz (2008), adaptada.

4.9 EFICIÊNCIA DE MICROENCAPSULAÇÃO

A eficiência da microencapsulação foi realizada dissolvendo 10 mg, em peso seco, de micropartículas em uma mistura de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 0,2 M e citrato de sódio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 0,06 M em pH 8,0, segundo Li et al. (2009a).

As micropartículas dissolvidas (2mg/mL) foram analisadas por ELISA quantitativo para determinação da concentração de IgY na amostra. A eficiência de encapsulação (EE) das micropartículas é o quociente entre a razão da quantidade de IgY presente na amostra e a razão da IgY total utilizada inicialmente na formulação, de acordo com a seguinte Equação 1:

$$\text{EE (\%)} = [\text{IgY encapsulada} / \text{IgY total}] \times 100 \quad (1)$$

A EE também foi verificada de forma indireta ao analisar a solução residual de CaCl_2 /Quitosana, verificando assim a possível migração de IgY para a solução, pela Equação 2 (BAKHSHI et al., 2017):

$$\text{EE (\%)} = [\text{IgY total} - \text{IgY não encapsulada} / \text{IgY total}] \times 100 \quad (2)$$

Ambas as amostras foram também analisadas por eletroforese e ELISA indireto, para verificar a reatividade da IgY após o processo de microencapsulação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As etapas da extração e purificação da IgY estão evidenciadas na Figura 7. Foram utilizadas 50 gemas de ovos (780 mL) que resultaram em uma solução de IgY diluída em PBS 1x, com pH 7,24.

A solução de IgY foi então analisada por teste de ELISA quantitativo para determinar a concentração de IgY, que resultou em $10,22 \pm 1,8$ mg/mL. A atividade do anticorpo extraído foi determinada por teste de ELISA indireto, avaliando a reatividade da IgY com antígeno BSA (albumina do soro bovino). Obteve-se 0,7436 nm de reatividade para a solução concentrada (10,22 mg/mL), no entanto, a amostra foi analisada também por diluição seriada para determinar a reatividade da IgY em diferentes concentrações, como apresenta o Gráfico 1.

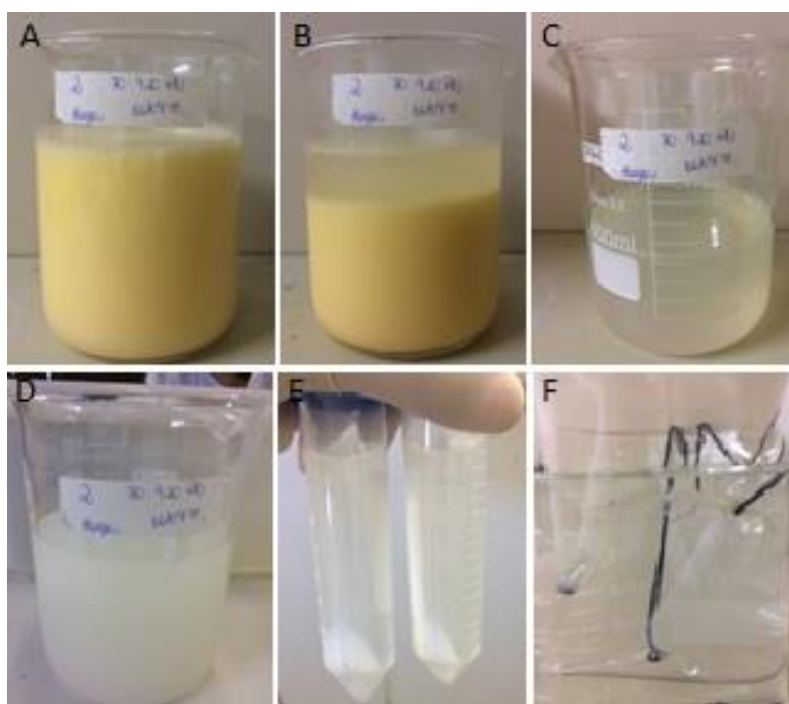


Figura 8 – Etapas de extração de IgY

A. Diluição da gema 1:7 em água destilada pH 5,2. B. Após incubação, nota-se a separação da fração solúvel e lipídica. C. Fração solúvel filtrada. D. Precipitação com Sulfato de amônia saturado. E. Precipitação com Sulfato de sódio 18% e 14%. F. Diálise da solução de IgY

Fonte: Autoria Própria, 2018.

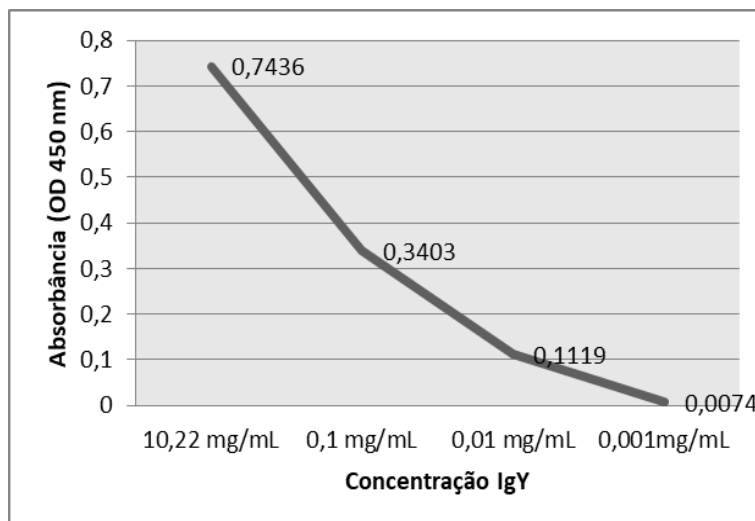


Figura 9 – Gráfico 1 – Atividade da IgY purificada

Resultados obtidos por ELISA indireto através da diluição seriada da amostra de IgY

Fonte: Autoria Própria, 2018

Para avaliar a pureza da IgY extraída a amostra foi analisada por eletroforese em gel que, conforme demonstrado na Figura 8, há a presença de bandas com peso molecular de 67 kDa e 28 kDa, representando a cadeia pesada e cadeia leve, respectivamente, da IgY. Os mesmo pesos moleculares foram encontrados por Tan et al. (2012), não obstante, Brum (2010) estima que as cadeias pesadas possuem 69 kDa e 26kDa, enquanto Carlander (2002) e Chacana et al. (2004) apontam 65 kDa e 18 kDa para as cadeias pesada e leve da IgY, respectivamente.

Além das bandas correspondentes as subunidade da IgY, uma terceira banda foi encontrada com 35 kDa a qual representa uma proteína denominada de fragmento C-terminal de vitelogenina II (PAULY et. al., 2011), comumente encontrada quando utilizada a técnica de extração por precipitação com sal.

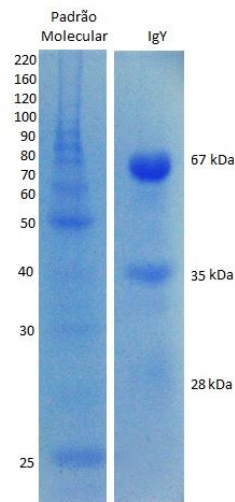


Figura 10 – Eletroforese da IgY

Fonte: Autoria Própria, 2018.

Dadas as características iniciais da IgY, seguiu-se com o processo de microencapsulação, que foi então realizado produzindo dois tratamentos de micropartículas, sendo as MPs Branco, que não continham nenhum material de recheio, e as MP IgY, que continham IgY como recheio.

A técnica de gelificação iônica aplicada foi satisfatória em produzir micropartículas, bem como a utilização dos agentes encapsulantes alginato de sódio e quitosana, que proporcionaram micropartículas de formato esférico com tamanho de 1-2 mm (Figura 9).

Ao microencapsular IgY, Li et al. (2009a) obtiveram micropartículas com cerca de 1000 μm com uma agulha de 0,7 mm de diâmetro, no entanto, utilizaram processo mecânico com vazão de amostra e de ar controlados. Já Fujiwara et al. (2010) desenvolveram uma matriz de alginato/cálcio/quitosana para microencapsular azul de metileno manualmente com seringa, gerando micropartículas de 1-2 mm.

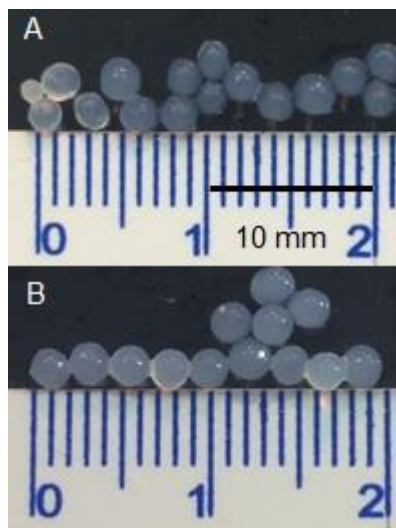


Figura 11 – Tamanho das micropartículas

A. MPs Branco. B. MPs IgY.

Fonte: Autoria Própria, 2018

Observando a Figura 10 pode-se notar que as MP Branco possuem uma coloração mais transparente quando comparada com as MP IgY, que apresentam cor mais branca, provavelmente devido a incorporação da IgY na matriz de alginato-cálcio-quitosana.

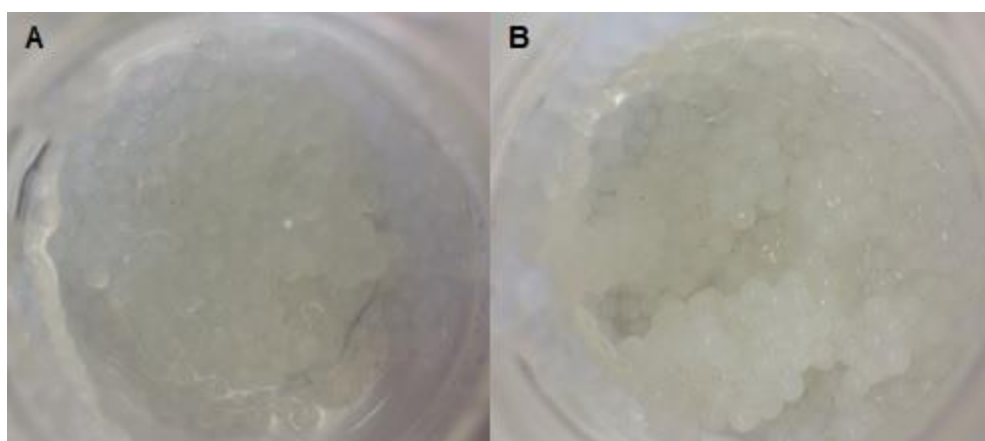


Figura 12 – Micropartículas

A. MPs Branco. B. MPs IgY.

Fonte: Autoria Própria, 2018.

Devido a técnica ser realizada manualmente, é passível que ocorra deformações nas micropartículas, tanto pelo diâmetro e posicionamento da seringa, quanto pela altura da agulha sob a fase reticulante, originando então micropartículas com formato menor ou maior, mais alongadas e até achatadas.

As micropartículas foram observadas em lupa com aumento de 2x e 4x (Figura 11) e foi possível verificar algumas dessas deformações, podendo ser devido ao contato com outras micropartículas ou também pela própria manipulação e procedimento aplicado.

Ao observar no microscópio óptico, verificou-se que as MPs Branco apresentam uma estrutura com mais ranhuras (Figura 12) enquanto as MPs IgY aparentam possuir estruturas menos rugosa, lisa e mais densa. Após o processo de remoção a umidade, as micropartículas perderam sua estrutura esférica (Figura 13).

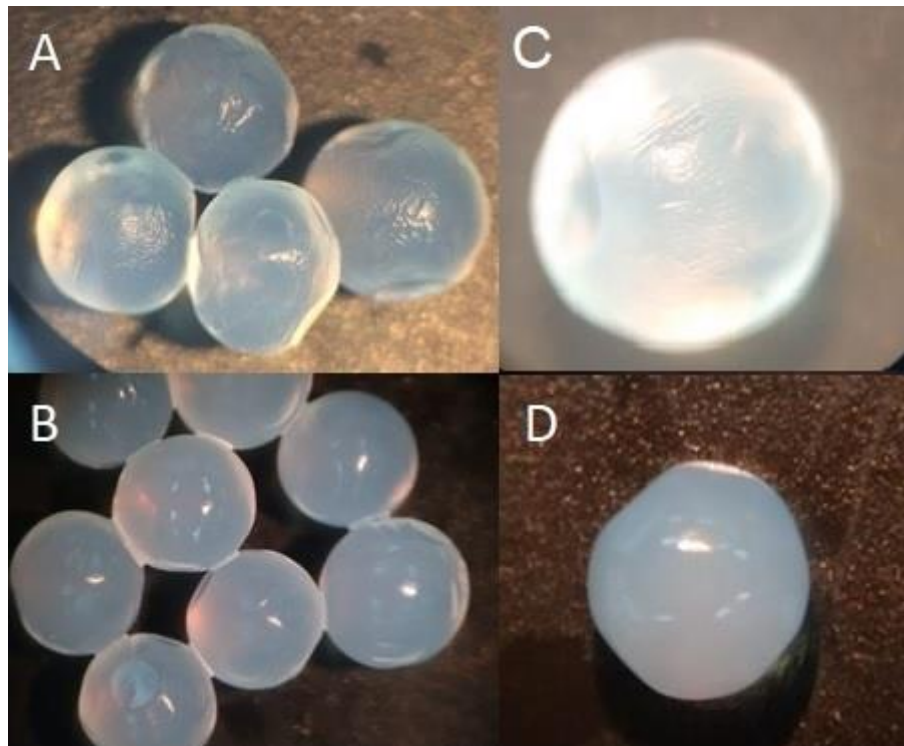


Figura 13 – Micropartículas observadas em lupa

A e B. Aumento de 2x. C e D. aumento de 4x. Sendo A e C, MPs Branco, B e D MPs IgY.

Fonte: Aatoria Própria, 2018.

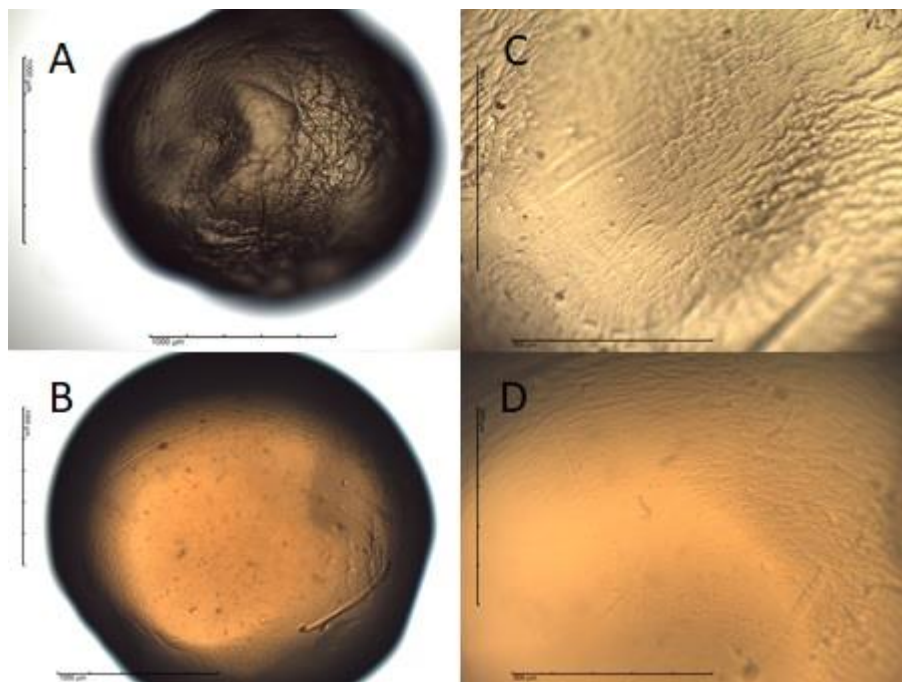


Figura 14 – Micropartículas observadas em microscópio ótico

A e B. Aumento de 4x. C e D. aumento de 10x. Sendo A e C MPs Branco, B e D MPs IgY.

Fonte: Aatoria Própria, 2018.

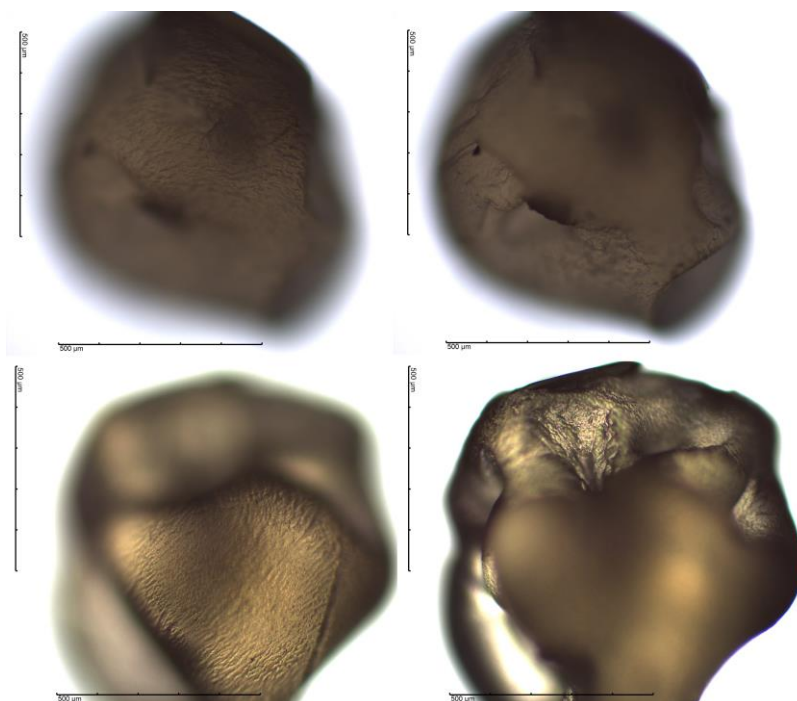


Figura 15 – Micropartículas secas observadas em microscópio ótico

A, B, C e D com aumento de 10x. A e B, MPs Branco, e C e D MPs IgY.

Fonte: Aatoria Própria, 2018.

As micropartículas foram analisadas quanto ao teor de umidade com temperatura de secagem de 50 °C, pois a molécula de IgY se desnatura em temperaturas acima de 70 °C (MINE, 2008). As MPs Branco possuem 96% de umidade enquanto as MPs IgY, 94%, e ao determinar o peso seco total das MPs, foi possível notar um aumento de massa das MPs IgY (1240mg) quando comparada com as MPs Branco (827 mg).

XIA et al. (2011) definiu que o ponto isoelétrico (pI) da IgY é no pH 5 e determinou que quando o pH do meio aumenta de 5 para 7 (acima do pI), o potencial zeta da IgY se torna-se negativo, indicando que a molécula está carregada negativamente.

Diante desses dados, podemos supor que devido a incorporação da IgY na formulação das MPs, que estava em pH 7,24, houve maior atração de moléculas de cálcio e/ou quitosana para a estrutura das micropartículas, explicando porque nas MPs IgY resulta em 240 mg de massa restante (cálcio e/ou quitosana), enquanto na MP Branco resulta em 27 mg. Para determinar com mais precisão, análises de quantificação de cálcio e até de quitosana podem ser realizadas para melhor caracterizar as MPs.

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada de forma direta (pela concentração de IgY presente na micropartícula) e indireta (analisando a solução residual de CaCl₂/quitosana), por ELISA quantitativo.

Ao analisar diretamente a solução de MPs dissolvidas (2mg/mL), o teste de ELISA detectou 0,1369 mg/mL de IgY. Este valor vou aplicado na Equação 1 e determinou 42,8% EE.

Analisando indiretamente a solução residual de CaCl₂/quitosana resultou em 25,5 ng/mL de IgY. Utilizando a Equação 2, a EE foi de 99,99%.

A atividade da IgY foi avaliada antes e após o processo de encapsulamento para verificar a possível interferência do processo aplicado na reatividade do anticorpo. Observa-se (Gráfico 2) que, as micropartículas na concentração de 2 mg/mL obtiveram reatividade contra BSA (Soro albumina bovina) de 0,29 ±0,03 nm e a solução residual de CaCl₂/Quitosana obteve 0,059 nm.

Em relação a atividade da IgY microencapsulada, pode-se afirmar que a IgY continua ativa após o processo de microencapsulação, pois a atividade está similar a da molécula não encapsulada. Houve uma pequena diferença na atividade, o que

pode ser explicada pelo tempo de armazenamento e condições as quais foi submetida até que o processo de microencapsulação fosse realizado, mas no geral não houve grandes perdas. Tal resultado favorece a utilização deste método quando se objetiva preservar a molécula, no entanto, mais estudos devem ser realizados para verificar a possível perda de atividade com o tempo e condições de armazenamento.

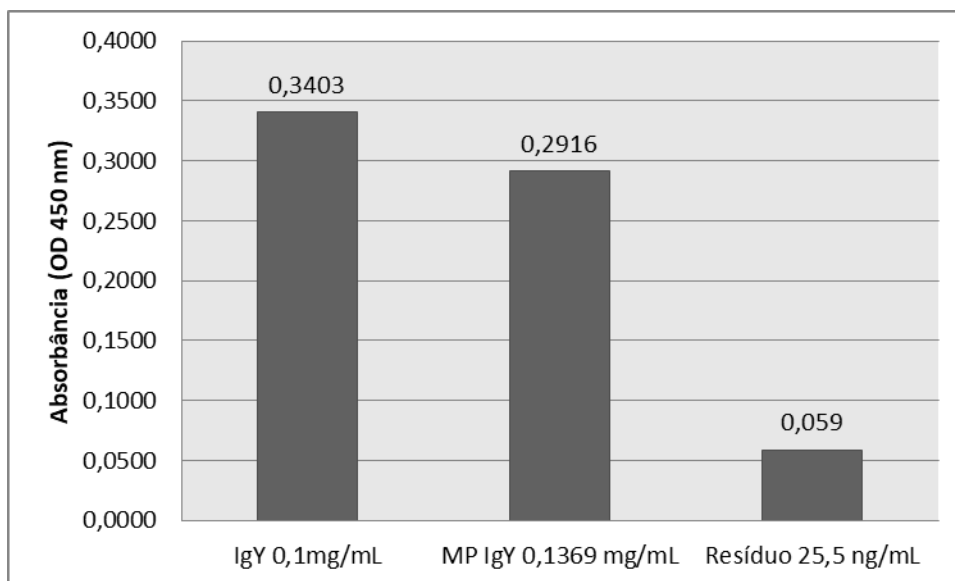


Figura 16 – Gráfico 2 – Atividade da IgY pós microencapsulação

Fonte: Aatoria Própria, 2018

Para se obter um dado qualitativo as MPs IgY dissolvidas e a solução residual de CaCl_2 /quitosana foram analisadas por eletroforese, a fim de verificar a presença da IgY nestas amostras. Analisando a Figura 15 podemos confirmar qualitativamente que a concentração de IgY na solução residual é tão insignificante que não apresenta nenhuma banda proteica, enquanto a amostra de MPs IgY, apresentaram bandas de 67 kDa e 28 kDa, caracterizadas pela cadeia pesada e cadeia leve da IgY.

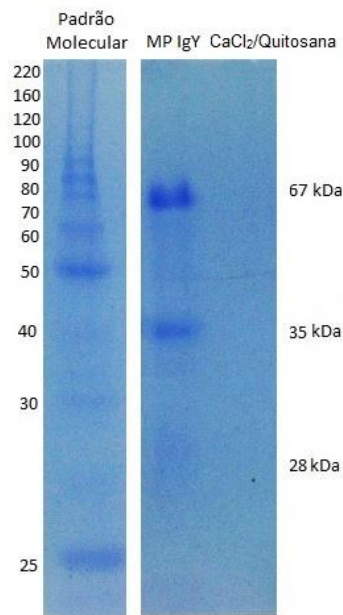


Figura 17 – Eletroforese das MPs IgY e solução Residual

Fonte: Aatoria Própria, 2018.

Ao centrifugar a amostra de MPs IgY dissolvida notou-se a formação de precipitado (dados não mostrados), o que pode justificar as baixas concentrações de IgY detectadas no teste de ELISA, proporcionando baixa EE. A formação do precipitado pode indicar que as micropartículas não foram totalmente dissolvidas, assim parte da IgY pode estar ainda retida na matriz da micropartícula, sendo impossibilitada de ser detectada no teste.

Além disso, podemos comparar a baixa concentração de IgY encontrada na solução residual (25,5 ng/mL), baixa reatividade (0,059 nm) e ausência de bandas de proteicas no gel de eletroforese, proporcionando 99,9% de EE. Todos estes dados em conjunto indicam que houve de fato alta EE, mesmo que a análise direta tenha gerado um valor intermediário de EE. Deste modo, mais estudos devem ser realizados para possibilitar a total dissolução das micropartículas e obter resultados precisos de EE%

LI et al. (2009a) conseguiram EE de 68,06% utilizando a solução de CaCl₂/Quitosana em pH 4, enquanto ao modificar o pH para 3,5 a EE aumentou para 73%.

Estudos realizados por Bakhshi et al. (2017) verificaram que nanoencapsulação não teve efeitos adversos na qualidade e atividade da IgY. Ao

expor essas nanopartículas em condições de sistema gastro intestinais, verificaram que a atividade de IgY foi diminuída quando incubada em pH 3,5 ou inferior, e completamente perdida a pH 3, concluindo que as nanopartículas por eles produzidas seriam uma boa escolha para proteção de IgY contra condições gastrointestinais severas e distribuição de IgY no intestino.

A administração oral de igy provou ser bem sucedida para o tratamento de uma variedade de infecções gastrointestinais (MINE; KOVACS-NOLAN, 2002). O mecanismo de liberação para esferas de alginato é por processo de difusão através dos poros e este fenômeno é facilitado pela degradação da matriz polimérica em pH neutro (BAKHSHI et al., 2017).

A desintegração das microcápsulas de alginato/quitosana é dependente do pH, em meio ácido o material da matriz da microcápsula permanece intacto como resultado das ligações iônicas nas microcápsulas. Uma vez que as microcápsulas são expostas a pH neutro, o alginato aniônico no complexo alginato-cálcio/quitosana pode ser deslocado por íons hidroxila. Ainda mais importante, a quitosana perderá sua carga positiva. Portanto, o complexo se desintegra, a matriz é erodida e o material encapsulado é liberado no fluido circundante (Li et al., 2009a).

Deste modo, a IgY pode ser encapsulada por diferentes técnicas, as quais irão protegê-las diante das condições gastrointestinais, mantendo-as integras e ativas para serem liberadas no trato intestinal, onde serão absorvidas.

6 CONCLUSÃO

A extração da IgY ocorreu de forma aceitável diante da metodologia empregada (precipitação com sal). Verificou-se que os agentes encapsulantes selecionados, se mostraram hábeis em produzir micropartículas de alginato-cálcio/quitosana e estas se mostraram esféricas e firmes, com uma eficiência de encapsulação considerada satisfatória.

Foi possível determinar que o processo de microencapsulação não inativa a atividade da IgY, permitindo que a técnica seja utilizada para proteger a IgY, possibilitando que novas pesquisas sejam realizadas para verificar a continuidade desta atividade diante diferentes períodos de armazenamento e em determinadas condições, bem como a aplicação das micropartículas.

REFERÊNCIAS

- Abbas, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv.. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- AKITA, E. M.; NAKAI, S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 3, p. 629-634 , 1992.
- AZEREDO, Henriette Monteiro Cordeiro de. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89-97, jan./mar. 2005.
- Dumitriu, Severian et al. **Polymeric Biomaterials**, Revised and Expanded. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2001.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e processos**, v.2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- BAKHSI, Mostafa et al. Nano-encapsulation of chicken immunoglobulin (IgY) in sodium alginate nanoparticles: In vitro characterization. **Biologicals xxx**, 2017.
- BLOGSPOT. O antivírus do sistema operativo nervoso. **Anticorpos**. 2010.
Disponível em:
<<http://antivirussoperativohumano.blogspot.com.br/2010/05/anticorpos.html>>.
Acessado em: 06 jun. 2017.
- BOSTER. **ELISA Handbook**. Disponível em:
<https://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf> . Acessado em: 27 de nov. 2018.
- BRACHT, Adelar; ISHII-IWAMOTO, Emy Luiza. Métodos de laboratório em bioquímica. Barueri: Manole, 2003.
- BRESSEL, Tatiana Azevedo Bastian. **Sistema gerador de microcápsulas de alginato**. 2007. 70 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Pós graduação em Genéticas e biologia MOlecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- BRUM, Beatriz Coutinho. **Anticorpos aviários como reagentes para o diagnóstico da intoxicação humana por organofosforado**. 2010. 57 f.
Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.
- CÂMERA, Bruno. **ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**. Disponível em:
< <https://www.biomedicinapadiao.com.br/2010/05/elisa.html>>. Acessado em: 27 de nov. de 2018.
- CARLANDER, David. **Avian IgT antibody** in vivo *and* in vitro. 2002. 53 f.
Dissertação (Doutor em Filosofia em Clínica Química) – Faculdade de Medicina, Acta Universitatis Upsaliensis, UPPSALA, 2002.

COSTA, Bianca Souza da. **Microcapsulas produzidas por gelificação iônica recobertas com gelatina de peixe e isolado proteico de soja**. 2014. 143f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

CHACANA, P. A. et al. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gal lina. **Revista de Medicina veterinária**, v. 85, n. 5, 2004.

CHO, Young-Hee et al. Protective effect of microencapsulation consisting of multiple emulsification and heat gelation processes on immunoglobulin in yolk. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 2, p. 148-151, 2005.

DAMIAN, Cesar et al. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 16, n. 2, p. 195-205, abr./jun. 2005.

FAVARO-TRINDADE, Carmen Silvia; PINHO, Samantha Cristina de; ROCHA, Glaucia Aguiar. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal Food Technol.**, v. 11, n. 2, p. 103-112, abr./jun. 2008.

FERNANDES, Dayanne Carla et al. Biologia do sistema imune das aves. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 5, p. 131-140, 2013.

FERRARRI, Criatiane Trevisan da Rocha Ribeiro; GENENA, Aziza Kamal; LENHARD, Daiane Cristina. Use of natural coagulants in the treatment of food industry effluents replacing ferric chloride: a review. **Científica**, Jaboticabal, v. 44, n. 3, p. 310-317, 2016.

FERREIRA JÚNIOR, Álvaro. **Anticorpos IgY policlonais: Ferramentas auxiliares para o estudo *in vitro* de *Toxoplasma gondii***. 2012. 117f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicada) – Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

FOOD INGREDIENTS BRASIL Os Alginatos e suas múltiplas aplicações. **Food Ingredients Brasil**, n. 26, 2013. Disponível em: < http://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060847415001464961683.pdf>. Acessado em: 24.09.2018.

FU, Shao et al. Relevance of rheological properties of sodium alginate in solution to calcium alginate gel properties. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 12, n. 2, p. 453-460, jun. 2011.

FUJIWARA, G. M. Comparação entre os perfis de liberação de azul de metileno a partir de micropartículas de alginato-quitosana em pH ácido. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2, 2010.

FUNDUEANU, Gheorghe et al. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. **Biomaterials**, v.20, p. 1727-1435, 1999.

GASSEROD, Olav; SMIDSROD, Olav; SKJASK-BRAEK, Gudmund. Microcapsules of alginate-chitosan – I A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. **Biomaterials**, v. 19, p. 1815-1825, 1998.

GEORGE, Meera; ABRAHAM, T. Emilia. Poluionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 1-14, 2006.

GOMES, Pedro Emanuel de Borralho. **Desenvolvimento de ovoproduto à base de gema de ovo para fios de ovos**. 2012. 128f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de Aveiro, 2012.

GRANT, Gregor T. et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. **Ferbs letters**, v. 32, n.1, p. 195-198, 1973.

GUIMARÃES, Marco Cesar Cunegundes. **Produção e aplicação de anticorpos da gema do ovo de galinha**. 2005. 189 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Centro de Ciências e tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2005.

GUIMARÃES, Marco Cesar Cunegundes; CORREIA, Vitor Guimarães; GAMA FILHO, Reubes Valério da. Produção de anticorpos em galinhas. **Perspectives online**, v. 2, n. 7, 2008.

HOLKEM, Augusto Tasch; CODEVILLA, Cristiane Franco; MENEZES, Cistiano Ragagnin. Emulsificação/gelificação iônica interna: Alternativa para microencapsulação de compostos bioativos. **Ciencia e Natura**, Santa Maria, Edição especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e próbióticos em alimentos, v. 37, p. 116-124, dez. 2015.

HOMMA, Akira et al. Desenvolvimento tecnológico: elo deficiente na inovação tecnológica de vacinas no Brasil. **História, Ciências, Saúde**, v. 10, p. 671-696, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

JOSUÉ, Atche. **Desenvolvimento de um novo sistema de microencapsulação de fármacos a partir da quitosana para o uso ora**. 2002. 143f. Tese (Doutorado em Química) – Curso de pós-graduação em química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

KOVACS-NOLAN, Jennifer; PHILLIPS, Marshall; MINE, Yoshinori. Advances in the value of eggs and egg components for human health. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8424-8431, 2005.

KOVACS-NOLAN, Jennifer; MINE, Yoshinori. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annual Reviews Sci. Technol**, v. 3, p. 82-163, 2012.

KARLSSON, M.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 341-348, set. 2004.

KOVACS-NOLAN, Jennifer; MINE, Yoshinori. Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y. **Journal of Immunological Methods**, v. 296, p. 199-209, 2005.

LARANJEIRA, Mauro C. M.; FÁVARE, Valfredo T. de. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LEE, Kuen Young; MOONEY, David J. Alginate: properties and biomedical applications. **Prog Polym Sci.**, v. 37, n. 1, p. 106-226, jan. 2012.

LEITE, Melina Vasconcelos. **Microcapsulas de alginato-quitosana contendo nanopartículas magnéticas para liberação controlada de progesterona**. 2014. 106f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2014.

LI, Xiao-Yu et al. Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY). **Biochemistry and Biotechnology**, 2009. (a)

LI, Xiao-Yu et al. Chitosan–Alginate Microcapsules for Oral Delivery of Egg Yolk Immunoglobulin (IgY): Effects of Chitosan Concentration. **Appl Biochem Biotechnol**, 2009. (b)

LI, Xiao-Yu et al. Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): *In vivo* evaluation in a pig model of enteric colibacillosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, p. 132-136, 2009. (c)

LIU, Lin-Shu et al. Controlled release of interleukin-2 for tumour immunotherapy using alginate/chitosan porous microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 43, p. 65-74, 1997.

MARTINSEN, A.; SKJÅK-BRAEK, G.; SMIDSRED, O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, p. 79-89, 1989.

MARTÍNEZ, Alfredo Córdova; ALVAREZ-MON, Melchor. O sistema imunológico (I): Conceitos gerais, adaptação ao exercício físico e implicações clínicas. **Rev Bras Med Esporte**, v. 5, n. 3, 1999.

MATEESCU; ISPAS-SZABO; ASSAAD. Chitosan-based polyelectrolyte complexes as pharmaceutical excipients. In:_____. **Controlled Drug Delivery**, Elsevier, 2015. p.127-161.

MICHAEL, A. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 4, 2010.

MINE, Yoshinori. **Egg bioscience and biotechnology**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008.

MUNHOZ, Livia Silveira et al. Anticorpos IgY aviário: características e aplicações em imunodiagnóstico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 1, p. 153-160, jan. 2014.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. Porto Alegre: ArtMed, 7ª edição. 2010.

MULLER, Sandra et al. IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. **Nutrition Journal**, v. 14, n. 109, 2015.

MURTAZA, Ghulam et al. Alginate microparticles for biodelivery: a review. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 25, p. 2726-2737, Dez. 2011.

NEDOVIC, Viktor et al. Na overview of encapsulation Technologies for food applications. **Procedia FOOD Science**, v.1, p. 1806-1815, 2011.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NOGUEIRA, Gislaine Ferreira. **Produção e caracterização de micropartículas com multicamadas obtidas por gelificação iônica associada à interação eletrostática**. 2013. 173f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

OLIVEIRA, Mariana Salvim de. **Desenvolvimento e caracterização de micropartículas lipídicas sólidas carregadas com hidrolisado proteico obtidas por spray chilling**. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

PAULY, Diana et al. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. **Journal of Visualized Experiments**, n. 51, ed, 2011.

PATIL, J.S. et al. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: a review. **Digest Journal of Nanomaterial and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241-248, mar. 2010.

REBELLO, Flávia de Floriani Pozza. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Revista Agrogeoambiental**, pg. 134-144, dez. 2009.

REIS, Catarina P. et al. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. **Journal of Microencapsulation**, V. 23, N. 3, P. 245-357, Maio 2006.

REHM, Bernd H. A.; PAOLETTI, Sergio; Donati, Ivan. **Alginates: Biology and applications**. Microbiology Monographs, v. 13. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.

RÊGO, I. O. P. et al. Influência do período de armazenamento na qualidade do ovo integral pasteurizado refrigerado. **Arq. Bras. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 3, p. 735-742, 2012.

ROCHA, Glaucia Aguiar. **Produção, caracterização, estabilidade e aplicação de microcápsulas de licopeno**. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

SANTOS, Andréa Barbosa; FERREIRA, Vera Pupo; GROSSO, Carlos Raimundo Ferreira. Microcápsulas uma alternativa viável. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 26-30, 2000.

SANTOS, José E. dos; SOARES, João da P.; DOCKAL, Edward R. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SILVA, Catarina et al. Administração oral de peptídeos e proteínas : II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v. 39, n. 1, jan./mar., 2003.

SILVA, Pablo Teixeira da et al. Microencapsulação: conceitos, mecanismos, métodos e algumas aplicações em tecnologia de alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 7, p. 1304-1311, jul. 2014.

SHIMIZU, Makoto; FITZSIMMONS, Robert C.; NAKAI, Shuryo. Anti-*E. Coli*. Immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 5, p. 1360-1366, 1988.

STRAND, Berit L. et al. Microcapsules made by enzymatically tailored alginate. **Journal of Biomedical Materials Research**, p. 540-550, 2002.

SOARES, Pollyanna Mafra. **Produção e utilização de anticorpos IgY para diagnóstico de brucelose**. 2013. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias – Saúde animal) – Faculdade de Medicina veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, dez./2006.

TAGLIARI, Monika Piazzon. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana e alginato de sódio para incorporação de ácido glicirrízico, ácido salicílico ou**

cafeína visando liberação tópica. 2012. 229 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Pós-Graduação em Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

TAN, Sock Hwee. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. **Journal of Immunological Methods**, n. 380, p. 73-76, 2012.

TONNESEN, Hanne Hjorth, KARLSEN, Jan. Alginate in Drug Delivery Systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, n. 28, v. 6, p. 621–630, 2002.

van der MERWE, S.M. et. al. Junginger, Trimethylated chitosan as polymeric absorption enhancer for improved peroral delivery of peptide drugs, **Eur. J. Pharm. Biopharm**, n. 58, p. 225–235, 2004.

VANDERBERG, G. W. et al. factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation. **Journal of Controlled Release**, v. 77, p. 297-307, 2001.

XIA, Hai-Feng et al. Influences of ligands structure and pH on the adsorption with hydrophobic charge induction adsorbents: a case study of antibody IgY. **Separation Science and Technology**, n. 46, p. 1957-1965, 2011.