



**Rúben Daniel Lopes  
Alves**

**Desenvolvimento e caracterização de sistemas para a  
encapsulação de Imunoglobulina Y**

**Development and characterization of encapsulation  
systems for Immunoglobulin Y**



Rúben Daniel Lopes  
Alves

## Desenvolvimento e caracterização de sistemas para a encapsulação de Imunoglobulina Y

### Development and characterization of encapsulation systems for Immunoglobulin Y

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Mara Guadalupe Freire Martins, Investigadora Coordenadora do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e coorientação da Professora Doutora Maria Helena dos Anjos Rodrigues Amaral, Professora Auxiliar do Departamento de Ciências do Medicamento, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Apoio financeiro do POCTI no âmbito  
do III Quadro Comunitário de Apoio.

A investigação que conduziu aos  
resultados aqui apresentados foi  
financiada pelo Conselho Europeu de  
Investigação ao abrigo do Horizonte 2020  
(*ERC Grant number: 899921*)



“- Cada um de nós, liberto da materialidade das coisas,  
Tem a capacidade de perceber, lucidamente  
O que fez de bem e o que fez de mal,  
Julgando-se a si próprio,  
-Seremos o Deus de nós próprios?  
-Mais do que isso,  
Nós somos uma partícula de Deus,  
Deus está em nós!”

**o júri**  
presidente

**Professor Doutor Carlos Manuel Santos da Silva**

Professor Associado, Departamento de Química, CICECO-Instituto de Materiais de Aveiro,  
Universidade de Aveiro

**Professora Doutora Mara Guadalupe Freire Martins**

Investigadora Coordenadora, Departamento de Química, CICECO-Instituto de Materiais de Aveiro,  
Universidade de Aveiro

**Professora Doutora Carla Martins Lopes**

Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa

## **agradecimentos**

Deixar um especial agradecimento à Doutora Mara, pela confiança e acompanhamento, não só de agora, e pela abertura e disponibilidade em me deixar crescer e evoluir. Um agradecimento, também especial, à Professora Helena, pela doçura e delicadeza que sempre teve para comigo, mesmo naqueles dias em que parecia que tínhamos o universo contra!

Muito obrigado à família, mas em especial aos meus pais, à minha irmã e ao meu cunhado e à minha madrinha pelo apoio que deram e pelo colo que, embora crescido, sabem que necessito. Não esperava eu outra coisa!

Um muito obrigado aos meus amigos que sempre souberam estar onde deviam estar, e onde eu sabia que estavam. Não esperava eu outra coisa!

E claro a ti, Mariana, muito obrigado pelos pequenos, pelos médios e pelos grandes momentos passados. Pelo apoio, pelos sorrisos, pelas gargalhadas, pelos conselhos, pelos mimos, pelas bulhas. Mas mais que tudo, obrigado por estares comigo, sempre e incondicionalmente.

Dizem, eu inclusive, que uma pessoa é fruto das pessoas que a rodeiam. Assim sendo tenho tudo para ser uma grande pessoa.

**palavras-chave**

Imunoglobulina Y, Extração, Purificação, Microemulsão, Sistema de liberação controlado, Administração parentérica

**resumo**

Nas últimas décadas, tem-se verificado o aparecimento de microrganismos altamente resistentes a antibióticos. A ineficácia destes agentes terapêuticos convencionais, e a conseqüente necessidade de terapias alternativas, fomentou um crescimento sem precedentes por parte da indústria biofarmacêutica, sendo possível destacar o uso de anticorpos específicos para o combate a bactérias multirresistentes. Entre as várias possibilidades de anticorpos, os anticorpos obtidos a partir da gema do ovo de galinhas imunizadas, imunoglobulina Y (IgY), são uma alternativa com elevado potencial. Contudo, uma vez que a IgY é uma proteína suscetível a perda de eficácia terapêutica por variações de pH e temperatura, é fundamental desenvolverem-se formulações farmacêuticas para a sua administração que garantam a estabilidade do anticorpo e possibilitem uma biodisponibilidade controlada. Face ao exposto, o foco deste trabalho residu no desenvolvimento e na caracterização de uma formulação à base de uma microemulsão para a encapsulação de IgY visando a sua administração parentérica. Após a purificação de IgY a partir da gema de ovo, foi otimizado o processo de produção da microemulsão por variação de tempo de sonicação, intensidade de sonicação e ciclos de homogeneização a alta pressão. Efetuaram-se estudos de eficácia de encapsulação seguidos de ensaios de liberação de IgY in vitro. Sob as melhores condições foi possível obter gotículas da fase hidrófoba com tamanho médio inferior a 200 nm e uma eficácia de encapsulação de IgY de cerca de 60%. Os estudos de liberação in vitro evidenciaram o potencial da microemulsão múltipla para prolongar a liberação da IgY.

**keywords**

Immunoglobulin Y, Extraction, Purification, Microemulsion, Controlled release system, Parenteral administration

**abstract**

In the last decade, the human being has been facing severe infectious diseases due to the emergence of antibiotic-resistant microorganisms. These conventional therapeutics inefficacy and consequent need for alternative medicines led to an unprecedented improvement in the biopharmaceutical industry, being possible to highlight the use of specific antibodies to combat multidrug-resistant bacteria. Among different possibilities of antibodies, those obtained from egg yolk of immunized hens, immunoglobulin Y (IgY), have shown to be a potential alternative. However, since IgY is a susceptible protein to pH and temperature variations, it is crucial the development of pharmaceutical formulations that ensure the antibody stability and enable its controlled release. The aim of this work was the development and characterization of a formulation based on a multiple emulsion for IgY encapsulation for parenteral administration. After IgY purification from egg yolk, the microemulsion production process was optimized according to the sonication time, sonication intensity, and high-pressure homogenization cycles variation. In addition to evaluating the droplets size of the hydrophobic phase, encapsulation efficacy studies were also performed, followed by IgY release studies in vitro. In the best conditions, it was possible to obtain hydrophobic phase droplets with an average size of less than 200 nm and around 60% of IgY encapsulation efficiency. The release studies shown the high potential of the multiple emulsion to control and prolong the IgY release.





# Índice

Índice .....	i
Índice de Tabelas .....	iii
Índice de Figuras .....	v
Lista de Abreviaturas.....	vii
1. Introdução.....	1
1.1. Indústria Biofarmacêutica.....	1
1.2. Imunoglobulina Y (IgY) .....	3
1.2.1. Investigação: IgY como agente Imunoproliferativo e Imunoterapêutico passivo..	5
1.2.2. Desenvolvimento: Extração, Purificação, Estabilidade e Formulação .....	8
1.2.2.1. Extração e Purificação .....	9
1.2.2.2. Estabilidade.....	14
1.2.2.3. Formulação .....	14
1.2.3. Produção e Marketing .....	20
1.3. Enquadramento e objetivos .....	22
2. Parte experimental .....	23
2.1. Materiais e equipamento .....	23
2.2. Métodos.....	25
2.2.1. Extração e Purificação de IgY .....	25
2.2.2. Preparação de microemulsões múltiplas A/O/A.....	26
2.2.2.1. Composição das microemulsões A/O/A.....	27
2.2.2.2. Método de preparação das microemulsões A/O/A.....	27
2.2.3. Caracterização da microemulsão múltipla.....	29
2.2.3.1. Tamanho das gotículas da fase oleosa.....	29
2.2.3.2. Estabilidade acelerada por centrifugação .....	31

2.2.3.3. Eficácia de encapsulação .....	31
2.2.3.4. Estudos de liberação .....	33
2.3. Resultados e discussão .....	34
2.3.1. Extração e purificação da IgY .....	34
2.3.2. Tamanho das gotículas da microemulsão sem IgY.....	36
2.3.2.1. Influência da etapa de emulsificação .....	37
2.3.2.2. Influência da etapa de homogeneização .....	39
2.3.3. Tamanho das gotículas da microemulsão com IgY .....	44
2.3.4. Estabilidade acelerada por centrifugação.....	45
2.3.5. pH.....	46
2.3.6. Quantificação da IgY na formulação .....	46
2.3.7. Eficácia de encapsulação de IgY .....	47
2.3.8. Liberação de IgY .....	49
3. Conclusões e trabalhos futuros .....	51
4. Referências .....	53
5. Anexos .....	62
5.1. Anexo A.1. Curva de calibração por SE-HPLC.....	62
5.2. Anexo A.2. Quantificação de IgY por SE-HPLC e Método de Bradford.....	64
5.3. Anexo A.3. Curva de Calibração por BCA.....	66
5.4. Anexo A.4. Avaliação da integridade da IgY por SDS-PAGE.....	67

# Índice de Tabelas

Tabela 1- Comparação entre IgG e IgY.....	4
Tabela 2- Aplicações terapêuticas de IgY. ....	7
Tabela 3- Reagentes e matérias-primas utilizados. ....	23
Tabela 4- Equipamento utilizado.....	24
Tabela 5- Composição da microemulsão múltipla A/O/A. ....	27
Tabela 6- Parâmetros utilizados para a determinação do tamanho das gotículas.....	30
Tabela 7- Valores da concentração, pureza e agregação obtidos após o processo de extração e purificação da IgY. ....	36
Tabela 8- Diâmetro das gotículas obtidos com diferentes agitadores durante a etapa de emulsificação. ....	37
Tabela 9- Valores de Span obtidos de acordo com o número de ciclos no homogeneizador de alta pressão.....	41
Tabela 10- Diâmetro das gotículas obtidas com homogeneização com sonificador e homogeneizador de alta pressão. ....	44
Tabela 11- Eficácia de encapsulação após diluição com solução de <i>NaCl</i> (0,9% (m/v)) e com solução PBS (0,01M, pH=7,4). ....	48



# Índice de Figuras

Figura 1- A) Quantidade de biofármacos aprovados pela FDA, desde 1982; B) Índice NASDQ-Biotec, desde 2004. ....	2
Figura 2- Fases de desenvolvimento de um biofármaco. ....	4
Figura 3- Obtenção de IgY a partir de ovo de galinha. ....	5
Figura 4- Principais métodos de Extração (zonas de cor cinzento-claro) e Purificação (zonas de cor cinzento-escuro).....	13
Figura 5- Esquema ilustrativo do processo de produção da microemulsão múltipla A/O/A. ....	29
Figura 6- Reações principais que ocorrem no método BCA. ....	32
Figura 7- Perfis proteicos obtidos por SDS-PAGE após a extração e purificação de IgY..	34
Figura 8- Cromatograma de SE-HPLC da solução obtida após a extração e purificação de IgY. ....	35
Figura 9- Esquema ilustrativo do fenómeno de coalescência numa emulsão. ....	38
Figura 10- Estudo da influência das condições do sonicador. ....	40
Figura 11- Estudo da influência do número de ciclos no homogeneizador de alta pressão.	41
Figura 12- Representação dos tamanhos das gotículas após 60 dias de armazenamento....	43
Figura 13- Microemulsão após centrifugação (4000 rpm, 30 minutos). ....	45
Figura 14- Variação do pH das microemulsões ao longo de 14 dias. ....	46
Figura 15- Amostras obtidas após diluição e centrifugação. A) utilizando a solução de NaCl; B) utilizando a solução de PBS (0,01M, pH=7,4). ....	48
Figura 16- Perfil de libertação da IgY .....	49



# Lista de Abreviaturas

A/O/A- água/óleo/água

%*AgregaçãoIgY*- Percentagem de agregação de IgY

CMC- Concentração micelar crítica

CQA- *Critical Quality Attributes*

EMA- *European Medicine Agency*

FDA- *Food and Drug Administration*

ICH- *International Council for Harmonisation*

Ig's- Imunoglobulinas

IgY- Imunoglobulina Y

[*IgY*]- Concentração de IgY

NASDAQ-Biotec- *National Association of Securities Dealers Automated Quotations-Biotechnology*

PLGA- ácido Poli(lático-co-glicólico)

%*PurezaIgY*- Percentagem de pureza de IgY

QbD- *Quality by Design*

QTPP- *Quality Target Product Profile*

SA- Substância Ativa

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio

SE-HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência com uma coluna de exclusão molecular





# 1. Introdução

## 1.1. Indústria Biofarmacêutica

Os Biofármacos por definição são produtos farmacêuticos de origem biológica, normalmente de alto peso molecular, obtidos a partir de microrganismos, células, animais ou plantas [1]. A indústria biofarmacêutica é a que desenvolve qualquer atividade de investigação, desenvolvimento, produção e marketing relacionadas com biofármacos [2]. Em pleno século 21, a indústria biofarmacêutica tem-se desenvolvido de forma muito eficaz, devido ao *know how* adquirido em diversas áreas, onde claramente se destacam a genética e a imunologia [3, 4].

Até ao ano de 2019, o mercado de biofármacos apresentou uma receita acima dos 275 biliões de dólares, destacando-se um crescimento anual de 12 a 13% [5]. Na Figura 1A é possível observar a quantidade de biofármacos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration Agency*) desde 1982 [6], sendo possível observar que o comportamento de aprovação de biofármacos é tendencialmente crescente, sendo que na última década foram aprovados anualmente, em média, 30 novos biofármacos, evidenciando um crescimento cada vez mais sólido e repleto de potencial [6].

Analisando, também, o número de biofármacos aprovados em 2020 pela EMA (Agência Europeia do Medicamento, *European Medicines Agency*), é possível evidenciar 16 novos biofármacos com autorização para comercialização, contabilizando-se, nesse ano, uma taxa de 100% de aprovação, uma vez que não se registou qualquer parecer negativo por parte desta entidade [7].

Devido a este crescimento sustentado, o mercado dos biofármacos tem atraído cada vez mais investimento, tendo mesmo atingido, em alguns casos, retornos mais lucrativos quando comparado com fármacos convencionais [5]. Na Figura 1B [8] é possível analisar o comportamento de um dos índices mais importantes para a indústria biofarmacêutica [8, 9], o Índice NASDAQ-Biotec (*National Association of Securities Dealers Automated Quotations- Biotechnology*), que corrobora, factualmente, o crescimento referido.

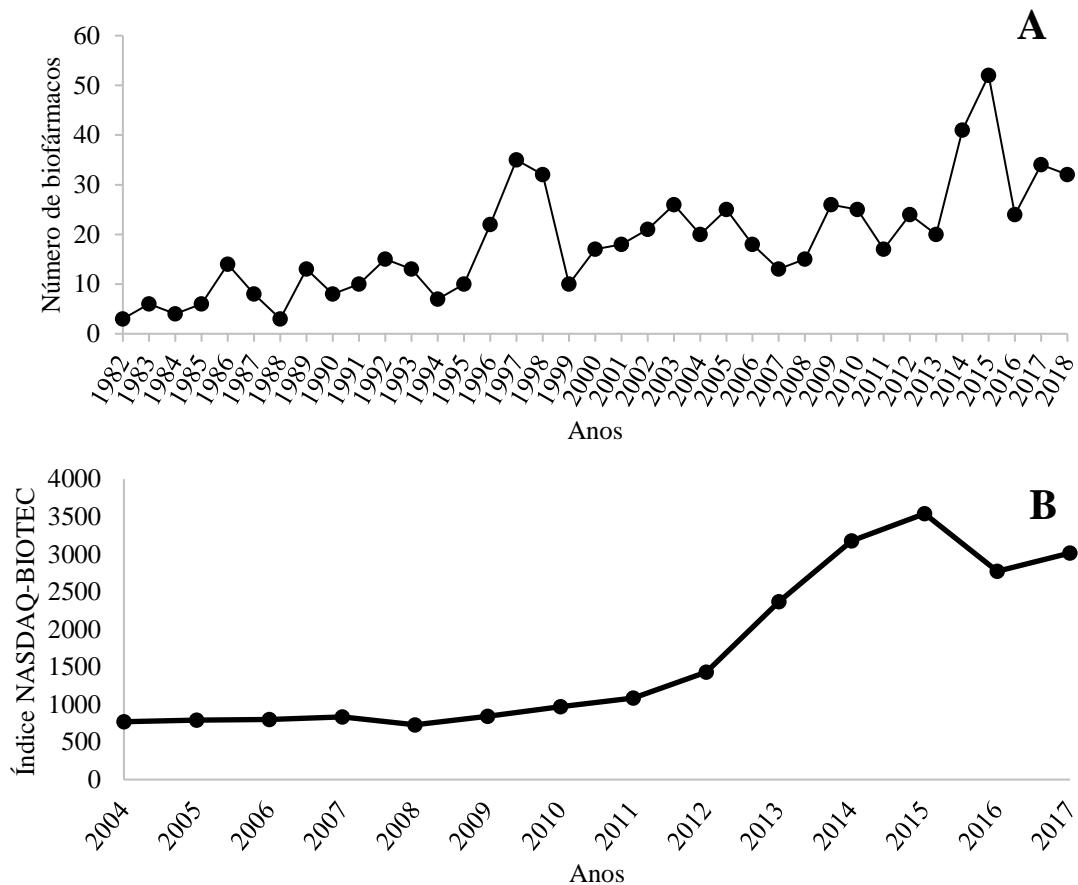


Figura 1- A) Quantidade de biofármacos aprovados pela FDA, desde 1982; B) Índice NASDAQ-Biotec, desde 2004.

A caracterização e o controlo dos processos biofarmacêuticos à escala industrial é um processo muito complexo [4]. Por conseguinte, para um sucesso sólido, estas empresas precisam de ter muita atenção na segurança dos produtos obtidos e na alta eficiência dos processos, tornando, assim, muito estreita a relação entre a fase de desenvolvimento e a fase de produção [4]. Neste contexto, tem-se verificado que as indústrias, quando realmente tencionam desenvolver e produzir um determinado composto, acionam e mobilizam os seus próprios meios, a fim de criarem a referida relação próxima entre o desenvolvimento e a produção do mesmo [4]. Contudo, todo o percurso, desde a execução de um projeto até ao produto final, é longo e comporta altos riscos e custos. Em média, todo o processo de desenvolvimento de um novo biofármaco ascende a valores entre os 500 e os 1000 milhões de dólares, e apenas 10 % destes projetos chegam à fase de testes clínicos e entram efetivamente no mercado [4]. Assim, é de extrema importância que o desenvolvimento de um biofármaco seja irrepreensível, para que, posteriormente, na etapa da produção, o foco seja a reprodutibilidade e a otimização dos custos inerentes ao processo [4].

## 1.2. Imunoglobulina Y (IgY)

O sistema imunológico é um sistema presente em todos os vertebrados, que fornece proteção contra substâncias patogênicas [10]. Este sistema divide-se no sistema inato e no sistema adaptativo. De salientar que as interações entre estes dois sistemas são extremamente importantes, não só para um bom desempenho global, mas também para um bom desempenho individual de cada um dos sistemas [11]. O sistema inato apresenta uma grande especificidade, eficiência e um tempo de resposta curto quando detetado o agente invasor [11]. Células como os macrófagos ou as células dendríticas fazem parte deste sistema [11]. Já o sistema adaptativo, que também possui uma grande especificidade, apresenta, porém, um tempo de resposta mais longo e permite garantir uma proteção a longo prazo [11]. O sistema adaptativo pode ainda ser subdividido no sistema imunológico humoral e no sistema imunológico celular. Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig's), por definição, são as principais proteínas intervenientes na resposta imunológica humoral, constituindo cerca de 20% das proteínas plasmáticas presentes no ser humano [10, 12]. Estas proteínas são excretadas pelas células B para o meio extracelular, tendo como objetivo a deteção/sinalização do invasor, podendo este ser uma bactéria, um vírus, ou qualquer agente que o corpo identifique como “estranho” [11, 12]. Na classe dos mamíferos existem cinco grandes tipos de Imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgM e IgG. Já na classe das aves existem três grandes tipos: IgA, IgM e IgY [11].

Desde a primeira administração de soro hiper-imunizado para o tratamento contra a difteria, em 1890 [13], muitos cientistas focaram-se no grande potencial que os anticorpos demonstravam em aplicações terapêuticas, administrados neste caso em imunoterapia passiva [14]. No entanto, estas aplicações passam pela recolha de anticorpos específicos de sangue de mamíferos, sendo este processo longo, dispendioso e invasivo [15]. Em face do exposto, a comunidade científica, em busca de novas fontes de anticorpos, viu nas aves e nos anticorpos desta classe uma alternativa a considerar [16-20]. Devido à estreita relação filogenética, existe compatibilidade entre o sistema imunológico dos mamíferos e das aves. Tal como se observa na Tabela 1, é mais vantajoso o uso da Imunoglobulina Y (IgY) em aplicações terapêuticas, uma vez que, quando comparado com a IgG, esta apresenta uma melhor capacidade de ligação a antígenos específicos [21] e comporta uma menor probabilidade de causar reações adversas aquando da sua administração [18-20].

Tabela 1- Comparação entre IgG e IgY.

	<b>IgG</b>	<b>IgY</b>
Classe de animal	Mamífero	Aves, répteis, anfíbios
Interação com a Proteína A e G	Sim	Não
Interação com o fator reumatoide	Sim	Não
Degradação por proteólise	Pepsina, papaína, tripsina e quimiotripsina	Pepsina e papaína
Ativação do complemento	Sim	Não

Tal como referido no capítulo anterior, é de extrema importância que todo o processo de manufatura de um biofármaco seja minuciosamente planeado. Assim, seguindo o enquadramento normalmente aplicado no desenvolvimento de um biofármaco [4], que se sumaria na Figura 2, serão, de seguida, analisadas as fases a ter em consideração no desenvolvimento de um biofármaco (no presente caso, contendo a IgY como substância ativa (SA)), dando maior destaque às duas primeiras etapas, uma vez que se enquadram no tema abordado na presente dissertação.

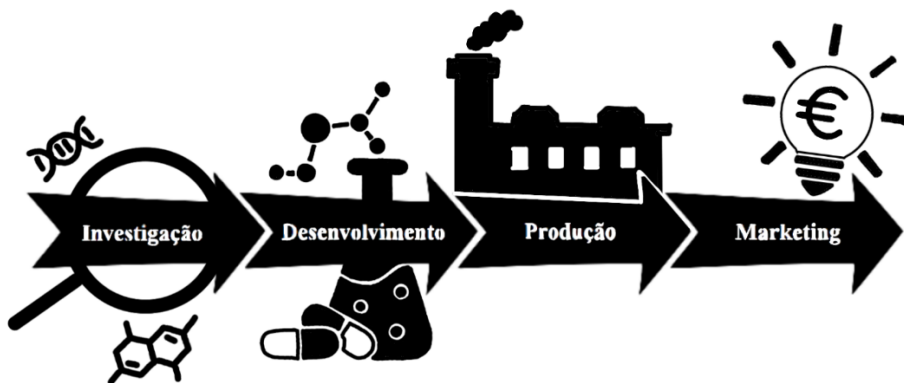


Figura 2- Fases de desenvolvimento de um biofármaco.

### 1.2.1. Investigação: IgY como agente Imunoprolático e Imunoterapêutico passivo

A produção de anticorpos específicos remete-nos para a teoria da Inoculação, onde, segundo McGuire [22], é possível a produção de um anticorpo específico a partir da injeção de um determinado agente patogénico, parte deste ou proteína recombinante que o caracterize, para ativar o sistema imunológico num determinado animal. Uma vez estimulada a resposta defensora do organismo, dar-se-á a produção de proteínas protetoras, neste caso os anticorpos específicos [22, 23].

No entanto, quando recorrendo a mamíferos, é necessária a recolha de grandes volumes de sangue dos animais inoculados, e devido a uma prática excessiva e abusiva deste método, em 1959, Russel e Burch [24] levantaram questões relevantes acerca do sofrimento causado nos animais, questionando valores éticos [24]. Aqui, o paradigma altera-se e avanços científicos levados a cabo por Klemperer e seus colaboradores [16], em 1893, ganharam interessantes proporções [16]. Estes autores reportaram na gema do ovo de galinhas inoculadas com a toxina *bacilo tetânico*, *Clostridium tetani*, causadora da infeção do Tétano, a presença de proteínas específicas (IgY) que, posteriormente, conferiram proteção a ratos em contacto com a toxina em questão [16]. Uma vez que a transferência de anticorpos específicos da galinha para o ovo se dá de forma natural, a produção de anticorpos específicos a partir deste animal não coloca em causa valores éticos relacionados com a recolha de grandes volumes de sangue dos animais. A Figura 3 sumaria o processo de obtenção de IgY a partir da gema de ovo de galinha.



Figura 3- Obtenção de IgY a partir de ovo de galinha.

Outro ponto que atraiu a comunidade científica foi o alto rendimento de anticorpos IgY obtido em cada ovo, uma vez que a quantidade de anticorpos presentes na gema de ovo produzidos por uma galinha durante um ano é igual à obtida por 20 coelhos, 4 cabras e 4 ovelhas no mesmo período de tempo [9], sendo possível recolher cerca de 100 a 150 mg de IgY por ovo, dos quais 2-8% são específicos para o antigénio administrado [25, 26].

Desde então, o número de novas aplicações terapêuticas para a IgY tem aumentado [16], tendo-se identificado um total de 297 novas patentes entre 2010 e 2019 [16]. Os anticorpos IgY estão a ser explorados nas mais diversas áreas, sendo que na Tabela 2 se encontra um resumo de trabalhos científicos com as respetivas aplicações terapêuticas visadas, tendo em vista a aplicação destes anticorpos em Humanos. Importa salientar que apenas uma destas aplicações conseguiu prosseguir para ensaios clínicos [27], contudo não passando na fase III dos mesmos.

Tabela 2- Aplicações terapêuticas de IgY.

<b>Agente patogénico / Distúrbio</b>	<b>Efeito da IgY</b>	<b>Ref</b>
<i>Candida Albicans</i>	Inibição da aderência da <i>Candida Albicans</i> , responsável por candidíase	[16, 28]
Disbiose	Promoção da regulação da microbiota intestinal	[16]
Hipercolesterolemia	Captação de colesterol, baixando a respetiva concentração	[16, 28]
<i>Streptococcus mutans</i>	Inibição da aderência do <i>Streptococcus mutans</i>	[16, 28]
<i>Helicobacter pylori</i>	Inativação da enzima urease impedindo a colonização do <i>Helicobacter pylori</i> , responsável pela ocorrência de úlceras gástricas	[16, 28, 29]
<i>Escherichia coli</i>	Inibição de colonização pela <i>Escherichia coli</i> O157:H7	[16] [14]
<i>Salmonella spp.</i>	Inibição da aderência da <i>Salmonella spp</i> na camada epitelial do intestino	[28, 30]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Prevenção de infeção respiratória em pacientes com fibrose quística	[28, 31, 32]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Proteção a macacos para a toxina <i>S.Aureus</i>	[28]
<i>Clostridium spp.</i>	Inibição de colonização pelo <i>Clostridium spp</i>	[28]
<i>Vibrio cholerae</i>	Inibição de infeções por <i>Vibrio cholerae</i> , responsável pela cólera	[28]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Redução da colonização e capacidade de aderência da <i>Klebsiella pneumoniae</i>	[33]
Vírus do Papiloma Humano (HPV)	Neutralização da Oncoproteína E7, responsável pelo desenvolvimento de cancro do colo do útero	[30]
SARS-CoV	Estabelecimento de ligação com as proteínas nucleocápside (NP), responsáveis pela replicação do vírus SARS-CoV	[30]

Hepatite A (HAV)	Utilização como imunofluorescente para detecção do vírus HAV	[30]
Hepatite B (HBV)	Reconhecimento da proteína HBsAg, presente na superfície do vírus da Hepatite B	[30]
Norovirus P	Bloqueio do vírus, impedindo que este se propague	[16, 30]
Rotavirus (RV)	Reconhecimento das proteínas espícula VP8, presentes na superfície do vírus, permitindo a sua sinalização	[16, 30]
Vírus Influenza	Reconhecimento do vírus, impedindo manifestação acentuada nos pulmões	[32]
Sars-CoV-2	Reconhecimento das proteínas espícula do vírus Sars-CoV-2, presentes na superfície do vírus, permitindo a sua sinalização	[34]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Produção de citocinas (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) induzindo resposta imunitária contra a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	[17]
Trypanosoma cruzi	Reconhecimento da presença do protozoário, impedindo a ocorrência de infecções	[35]

### 1.2.2. Desenvolvimento: Extração, Purificação, Estabilidade e Formulação

Uma vez analisado o potencial da IgY como agente terapêutico, segue-se a fase de desenvolvimento do biofármaco [4]. É extremamente importante que esta fase esteja altamente otimizada e com elevada reprodutibilidade, sendo que o foco agora reside não diretamente na SA (neste caso, a IgY), mas sim na forma como esta é obtida e no desenvolvimento de uma formulação que garanta a eficácia terapêutica [4].



### **1.2.2.1. Extração e Purificação**

Para abordar os métodos de extração e purificação é relevante, primeiramente, caracterizar a principal fonte da IgY: a gema do ovo [36]. No que toca à composição da gema do ovo, esta é composta por 51,1% de água, 30,6% de lípidos, 16,0% de proteínas, 0,6% de carboidratos e 1,7% de sais minerais [36]. Estruturalmente, a gema é uma suspensão, caracterizada por uma fase externa/contínua aquosa, denominada de plasma, onde o elemento predominante nesta fase são as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as proteínas globulares, como a IgY. Em suspensão é possível encontrar agregados e partículas esféricas maioritariamente compostas por lipoproteínas de alta densidade (HDL) e fosfoproteínas [36].

Devido à elevada complexidade da gema do ovo, têm sido desenvolvidos muitos métodos de extração e purificação, de forma a isolar a IgY, sendo que o recurso a técnicas de separação por adição de uma fase externa (precipitação seletiva) ou por atuação de campos de forças (centrifugação) revelam-se as técnicas mais eficazes e mais utilizadas pela comunidade científica [37-48].

Na Figura 4 encontram-se sumariados os principais métodos de extração e purificação da IgY descritos na literatura [37-39, 43-46, 48]. De notar que todos os métodos apresentam uma etapa comum: a separação da gema da clara e posterior lavagem desta com água, de forma a retirar o máximo de resíduos da proteína albumina (proteína presente na clara do ovo) da membrana que envolve a gema [37-39, 43-46, 48].

Em 1980, Polson e seus colaboradores [38] desenvolveram um método de purificação de IgY, conhecido na área como método de PEG. Este método utiliza o polietilenoglicol com massa molecular de  $6000 \text{ g/mol}$  (PEG6000) como principal agente de precipitação, a fim de purificar a IgY [38]. Os autores recorreram à adição de PEG, até uma concentração final de 3,5% (m/V), induzindo a precipitação das lipoproteínas, sendo possível obter um rendimento de 47% e um grau de pureza de 25% [37]. Na etapa da purificação, os autores recorreram a três precipitações seletivas, em série (duas com PEG 12% (m/V) e uma com sulfato de amónio 2M ou etanol 50% a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) [38]. De salientar que esta última precipitação tem o objetivo de remover vestígios de PEG que estejam a contaminar a amostra precipitada

[45]. No final da segunda precipitação (com PEG 12% (m/V)) registou-se um rendimento de 91% e um grau de pureza de 87% [37].

Em 1981, Jensenius e seus colaboradores [45] desenvolveram dois métodos alternativos para a purificação da IgY. Estes investigadores propuseram, para ambos os métodos, a mesma etapa de purificação - duas precipitações seletivas com sulfato de sódio ou sulfato de amónio [45]. No entanto, propuseram etapas de extração distintas, recorrendo, no primeiro método (método Dextrano-Sulfato), a uma precipitação seletiva com uma solução de sulfato de dextrano e cloreto de cálcio e, no segundo método (método de diluição em água), a uma diluição de nove vezes (v/v) da gema do ovo, em água, seguida de ajuste de pH para o valor 7 [45]. Com o primeiro método foi possível obter um rendimento de 71% em IgY [37], sendo que no segundo método não foi possível atingir este valor, permanecendo no intervalo entre os 50 e os 70% [45]. Após a segunda precipitação, os autores registaram um rendimento de 7,5 mg/mL e um grau de pureza de 87% [45].

Em 1984, Bade e seus colaboradores [39] desenvolveram um método de extração e purificação recorrendo a solventes orgânicos. Este método é caracterizado por uma série de precipitações seletivas, recorrendo a agentes de precipitação como o isopropanol e a acetona [39]. No entanto, estes investigadores, no final de uma sequência de cinco precipitações (três com isopropanol e duas com acetona), relataram a presença de impurezas, sugerindo uma posterior precipitação seletiva com PEG ou a passagem da amostra por uma coluna de cromatografia de troca iónica com uma resina de Dietilaminoetil-Celulose (com 5 mm de diâmetro e 23mm de altura) de modo a aumentar o grau pureza [39].

Para além de Bade [39], Ntakarutimana e seus colaboradores [43] também propuseram um método de purificação da IgY a partir do uso de técnicas cromatográficas [43]. Estes investigadores propuseram, primeiramente, uma precipitação seletiva com uso de clorofórmio seguida de duas precipitações seletivas com uso de sulfato de sódio (20 e 36 % m/v, respetivamente). Como método de purificação, os autores propuseram a passagem da amostra numa coluna de cromatografia com uma matriz de gel de agarose ativado com Divinil sulfona; no entanto, os autores propuseram a realização de um passo prévio de diálise de forma a remover o sulfato de sódio contaminante [43].

Em 1990, Hatta e seus colaboradores [44] recorreram à adição de gomas naturais (compostos utilizados em produtos alimentares) de forma a induzir a precipitação das lipoproteínas e, com isto, obter uma fase sobrenadante rica em IgY [44]. O método de

extração foi testado com doze gomas naturais diferentes, destacando-se a goma  $\lambda$ -Carregenina, uma vez que se registou um rendimento com cerca de 0,4% de lípidos no produto final [44]. No entanto, só submetendo este produto a uma coluna de cromatografia de troca iónica, a uma sequência de três precipitações seletivas com sulfato de sódio e ainda a uma diálise, é que foi possível registar um rendimento total de 70% e um grau de pureza de 98% [44].

Ao longo do tempo, os métodos que envolviam técnicas cromatográficas mostraram-se pouco adequados para aplicação industrial devido aos seus custos impraticáveis, [49] o que levou a que fossem desenhadas novas alternativas. Por conseguinte, em 1992, Akita e seus colaboradores [46] otimizaram um dos métodos de extração inicialmente proposto por Jensenius e seus colaboradores em 1981 [45], e propuseram o método de diluição em água com um pH de 5,2 [46]. O método otimizado consiste na diluição em seis vezes (v/v) da gema de ovo em água, e um ajuste de pH para 5,2 (em vez de sete, anteriormente proposto por Jensenius e seus colaboradores) [45]. Desta forma, registou-se um rendimento entre 93 e 96% e um grau de pureza entre os 15 e os 18% [46]. Os autores ainda compararam diferentes técnicas de purificação (técnicas de separação como precipitação seletiva, por adição de álcool ou sal, ultrafiltração, cromatografia de troca iónica e filtração em gel), concluindo que a sequência envolvendo precipitação seletiva com sulfato de amónio, seguido de ultrafiltração e, posteriormente, de uma filtração em gel, torna possível conduzir a rendimento de 98% e um grau de pureza superior a 99% [46]. Já em 1993, os mesmos autores [37] propuseram uma otimização do método apresentado anteriormente, onde aumentaram o fator de diluição para nove vezes, propuseram o sulfato de sódio como principal agente de precipitação e substituíram a técnica de ultrafiltração por precipitação seletiva [37]. Desta forma, aplicando o método de diluição em água, seguido de duas precipitações seletivas com sulfato de sódio, registou-se um rendimento de 83% e um grau de pureza de 82% [37].

Contudo, e uma vez que Akita e seus colaboradores, em 1992, teriam demonstrado as vantagens no uso da ultrafiltração como método de purificação da IgY, muitos cientistas desenvolveram vários sistemas de ultrafiltração de forma a otimizar esta técnica de separação, como foram os casos de Kim e seus colaboradores [48], em 1996, e de Hernandez e seus colaboradores [47], em 2010. Em ambos os trabalhos, foi possível registar valores de rendimento superiores a 90% [47, 48].

Inúmeros trabalhos se têm desenvolvido mais recentemente com o intuito de otimizar os métodos descritos, visando sempre o aumento do grau de pureza e rendimento de IgY [49]. De modo sumário, estes métodos consideram: 1) a variação do número de precipitações aplicadas ou concentrações de sulfato de amônio e de sulfato de sódio, utilizados como agentes de precipitação [50, 51]; 2) a manipulação do pH no método de extração de diluição em água [52, 53]; 3) a utilização de solventes orgânicos alternativos aos apresentados por Bade e seus colaboradores [39]; e 4) a variação da concentração de cloreto de sódio no método primeiramente apresentado por Jensenius e seus colaboradores [54, 55].

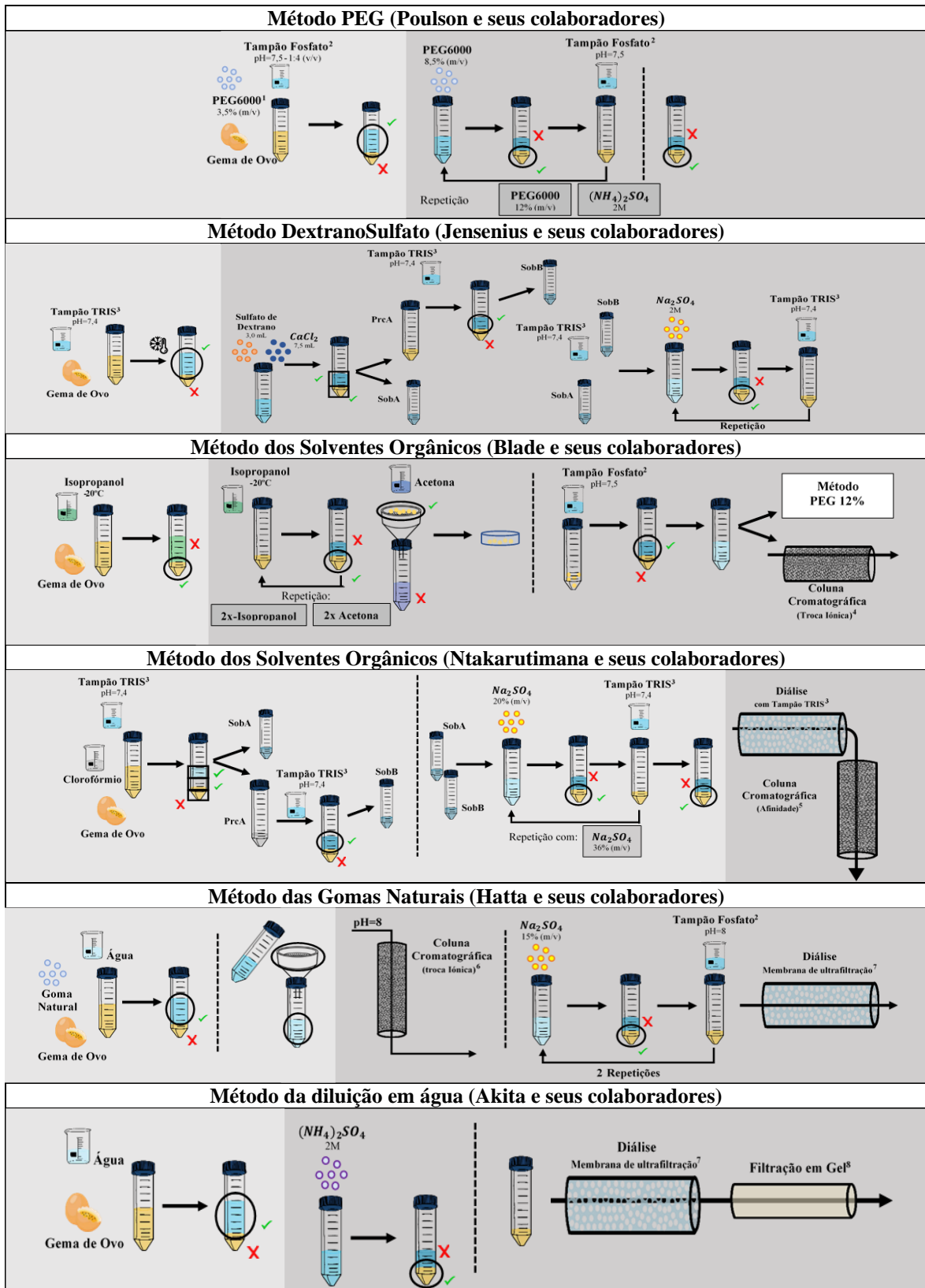


Figura 4- Principais métodos de Extração (zonas de cor cinzento-claro) e Purificação (zonas de cor cinzento-escuro)

Legenda: 1-Polietilenoglicol (Peso molecular de 6000 g/mol); 2- Solução com 0,01M NaCl e 0,01% NaN<sub>3</sub> 3-Tris(Hidroximetil)aminometano: 0,14M NaCl, 0,01M Tris/HCl, pH=7,4, 0,1% NaN<sub>3</sub>, 4- Enchimento: Resina de Dietilaminoetil- Celulose; Dimensões: diâmetro=5mm, altura= 23mm; 5- Enchimento: gel agarose ativado com Divinil sulfona Dimensões: diâmetro=3cm, altura=10cm. 6- Enchimento: DEAE-Sepharose; Dimensões: diâmetro=5cm, altura=10cm. 7-Membrana com poros de 100 KDa; 8- Enchimento: Gel superfino de Sephacryl S-200; Dimensões: diâmetro=2,5 cm, altura: 90 cm.

### 1.2.2.2. *Estabilidade*

Na fase de estabilidade é essencial que sejam definidas as condições ótimas de estabilidade do biofármaco, de forma que, quer durante o processo de produção, quer durante o desenvolvimento da formulação, a SA não seja exposta a condições que possam provocar a sua degradação [4]. De seguida, estão enumerados alguns parâmetros de estabilidade da IgY a ter em consideração durante as próximas fases.

- **Ponto Isoelétrico:** A IgY apresenta um ponto isoelétrico situado entre 5,7 e 7,6 [30].
- **pH:** A IgY é estável tanto em meio ácido como em meio alcalino, sendo aconselhável o intervalo de pH entre 4 e 9 [56]. Foram detetadas perdas de atividade em meios com pH inferior a 3,5 e degradação em meios com valores inferiores a 3 [57]. Para valores superiores a 9 foram detetados comportamentos semelhantes, ou seja, perda de atividade e/ou degradação [58].
- **Temperatura:** A IgY é estável no intervalo de temperaturas entre 40°C e 75°C [12, 30]. No entanto, quanto maior a temperatura de operação maior a perda de atividade registada [30].
- **Pressão:** A IgY é estável a variações de pressão, não sofrendo qualquer deformação a valores de pressão inferior a 3922 bar ( $4000 \text{ Kg/cm}^2$ ) [59].
- **Congelamento e liofilização:** O congelamento e a liofilização são os processos de eleição para o seu armazenamento, uma vez que são aqueles que provocam menor perda de atividade da IgY [60].

### 1.2.2.3. *Formulação*

Após a purificação de IgY segue-se a etapa de formulação. Esta etapa mostra-se fundamental no desenvolvimento de qualquer produto biofarmacêutico, uma vez que é nesta etapa que a SA irá ser associada a diversos excipientes, dando origem ao medicamento [4]. Quando nos referimos à formulação de um medicamento, não só englobamos a composição do mesmo, como também a forma farmacêutica mais adequada para a sua administração [4].

Uma vez otimizados os processos de extração e purificação, a etapa de formulação visa: 1) garantir as melhores condições para que haja uma administração eficiente da IgY, conferindo a proteção e estabilidade desejada no que respeita aos fatores externos, potenciais causadores de degradação (acidez, temperatura, radiação, enzimas); e 2) promover uma forma farmacêutica que seja bem aceite pelos pacientes, eficaz e segura, de forma a apresentar competitividade no mercado [4]. Posto isto, e para que o desenvolvimento da formulação seja bem-sucedido é essencial que se coloquem 3 questões fundamentais: Qual a via de administração mais adequada para a IgY? Qual a forma farmacêutica mais apropriada? E quais os melhores constituintes para a formulação [4]?

Relativamente à primeira questão, quando a absorção sistémica é desejada, é possível considerar essencialmente duas principais vias de administração: a via oral, na qual o fármaco deverá resistir às condições do trato gastrointestinal; e a via parentérica, na qual o medicamento é injetado através da via intramuscular, subcutânea ou intravenosa, evitando a passagem pelo sistema digestivo [61]. É importante salientar que existem outras vias de administração (via nasal, respiratória, oftálmica ou vaginal); no entanto, o recurso a estas para a administração de fármacos de elevada massa molecular, como as imunoglobulinas, é menos frequente [61].

Recorre-se à via de administração parentérica quando a SA não pode ser absorvida por via oral, é sensível ao trato gastro intestinal, quando se requer uma ação terapêutica rápida e quando o objetivo é ter um maior controlo da dose terapêutica real administrada [16]. No entanto, toda a forma farmacêutica parentérica deve estar altamente livre de qualquer tipo de contaminante, colocando nas indústrias uma grande responsabilidade [62].

Segundo a Farmacopeia Portuguesa 9 [63], as preparações parentéricas são preparações estéreis destinadas a serem injetadas, perfundidas ou implantadas no corpo humano ou dos animais. As preparações parentéricas subdividem-se em: preparações injetáveis, preparações para perfusão, preparações para injeção ou para perfusão após diluição, pós para injeção ou para perfusão, geles injetáveis e implantes.

De seguida, estão os principais requisitos que devem ser tidos em conta no desenvolvimento de um medicamento para administração por via parentérica [62]:

- Esterilidade
- Ausência de contaminantes pirogênicos (endotoxinas)
- Limpidez (no caso de soluções)

- Isotonia
- pH próximo do fisiológico
- Estabilidade física e química

Importa ainda reforçar que a via de administração parentérica requer cautela e conhecimento especializado, o que não se regista com a via de administração oral [61]. Portanto, devido não só à vertente da conveniência anteriormente mencionada, como também à vertente económica, a via de administração oral é normalmente escolhida, numa primeira linha terapêutica [61].

Porém, ao contrário de fármacos administrados por via parentérica, a eficácia terapêutica com fármacos administrados por via oral depende do estado do sistema gastrointestinal, que por sua vez é afetado pelo tipo de alimentação, hormonas, sistema nervoso autónomo e razões patológicas, tornando mais complexo o controlo da dose terapêutica que efetivamente alcança a via sistémica [61].

Como descrito anteriormente, a IgY é apontada como possível agente terapêutico para as mais diversas aplicações. [16, 17, 30, 32, 34, 35] Uma grande parte dos distúrbios apresentadas na Tabela 2 manifesta-se na via oral, o que levou a que o foco da comunidade científica residisse no desenvolvimento de formas farmacêuticas adequadas a esta via, tornando a IgY, não só um agente profilático como também imunoterapêutico [16].

Apesar da via oral apresentar vantagens incontestáveis, como uma maior facilidade de administração, um maior conforto e uma vertente não invasiva, esta apresenta, como referido, uma grande desvantagem: a passagem pelo trato gastrointestinal [64]. Uma vez que a atividade e a estrutura da IgY são afetadas drasticamente quando esta é exposta a condições altamente ácidas (pH=2) ou a atividade enzimática intensa, é fundamental que as formas farmacêuticas desenvolvidas para a IgY sejam altamente protetoras [64].

Face ao exposto, têm sido estudados os mais diversos sistemas de encapsulação da IgY, pois não só permitem conferir proteção à IgY, mantendo a sua integridade, como também permitem desenvolver mecanismos de libertação controlada, que poderão ser vantajosos após a sua administração [64].

Um dos sistemas de encapsulação publicados na literatura, e já testado com a IgY, baseia-se no uso de partículas de alginato [64-68]. Estruturalmente, o alginato é um biopolímero aniónico que pode ser encontrado na natureza, nomeadamente em várias



espécies de algas como *Phaeophyceae*, *Laminaria hiperborea*, *Laminaria digitata*, *Lmainaria japónica*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*, [69] e é um dos componentes mais utilizados na formação de micropartículas de hidrogel [70]. Este copolímero apresenta uma excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, o que fez com que inúmeros investigadores tenham recorrido a este composto para o desenvolvimento de sistemas de encapsulação [68]. Na presença de catiões divalentes, ocorrem fenómenos como a reticulação polimérica, que desencadeiam a formação de uma estrutura tipo “caixa de ovo” de tal forma complexa, que permite a encapsulação da IgY [70]. Bakhshi e seus colaboradores [68] aplicaram esta metodologia para a encapsulação de anticorpos específicos IgY contra a bactéria *Escherichia coli*. Estes investigadores obtiveram nanopartículas com diâmetro inferior a 100 nm e 99,84% de eficácia de encapsulação, com uma dose terapêutica de 1 mL de IgY [68]. No entanto, para doses terapêuticas superiores, 4 mL de IgY, obteve-se uma eficácia inferior (50,67%) [68]. Ainda assim, não foram registados quaisquer efeitos adversos relativamente à qualidade e atividade da IgY durante o processo de encapsulação [68].

O alginato pode ainda ser combinado com outros polissacarídeos [70], sendo que a reticulação deste biopolímero também ocorre na presença de outros positivamente carregados, como é o exemplo do quitosano, da carragenina ou da pectina [64-67, 71]. Li e seus colaboradores [65-67] testaram uma formulação com partículas de alginato e quitosano, uma vez que este polímero apresenta excelente capacidade de resistência às enzimas do sistema digestivo [71]. Neste trabalho, foi obtido 75% de eficácia de encapsulação para uma carga de 20% (m/m) de IgY. No entanto, quando exposta a uma solução gástrica simulada, durante 2 horas, apresentou uma perda de atividade da IgY de 25% [66]. Contudo ainda assim o complexo quitosano-alginato conferiu proteção à IgY, impedindo a degradação dos iões de hidrogénio ou de reações como a hidrólise peptídica [65]. No entanto, registou-se um aumento do grau de ionização do quitosano, podendo resultar em interações indesejáveis com a IgY e provocando um aumento do seu peso molecular [65].

Xing e os seus colaboradores [71] estudaram uma formulação com partículas de quitosano e pectina de forma a encapsular a IgY. Tendo em vista uma aplicação específica no cólon, nesta zona registou-se uma percentagem de libertação de 73% da IgY. Estes autores obtiveram partículas com diâmetros entre 1 e 1,43  $\mu$ m, para uma carga de 45% de IgY [71].

Gu e seus colaboradores [64] reportaram uma formulação com partículas de alginato e carragenina, obtendo, em comparação com uma formulação composta unicamente por partículas de alginato, um aumento na eficácia de encapsulação de 10%. Os resultados reportados devem-se ao alto teor em grupos carboxilo e hidroxilo presentes nos compostos utilizados, sendo possível promover uma reticulação mais eficiente dos biopolímeros [64].

Para além de sistemas de encapsulação a partir de biopolímeros, também foram reportados na literatura alguns trabalhos que recorreram a co-polímeros sintéticos [26, 72]. Kovacs-Nolan e seus colaboradores [72] desenvolveram uma formulação a partir do uso de 35% de ácido metacrílico-acrilato de etilo, registando uma perda da atividade da IgY de apenas 5%, quando exposta a uma solução gástrica simulada, durante 6 horas [72]. Já Torché e seus colaboradores [26] apresentaram um outro co-polímero, o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), para a encapsulação da IgY não tendo sido registada qualquer deformação da mesma [72].

Gujral e seus colaboradores [73] estudaram o uso de aditivos como o manitol, o sorbitol e a celulose microcristalina, já utilizados na indústria farmacêutica, como potenciais protetores da IgY, registando um aumento de cerca de 25% de IgY preservada, aquando do uso destes [73]. A formulação com manitol mostrou-se a mais estável, e quando exposta a uma solução gástrica simulada, durante 2 horas, a formulação contendo celulose microcristalina manteve a atividade da IgY em cerca de 86,3% [73].

Outro tipo de sistema de encapsulação da IgY, já publicado na literatura, são os lipossomas [74]. Uma das grandes vantagens apresentadas por este sistema é a versatilidade associada à encapsulação de substâncias ativas com diferente hidrofobia/hidrofilia [56]. Shimizu e os seus colaboradores [74], a partir de um sistema composto por colesterol e lecitina, procederam à encapsulação da IgY [74]. Apesar dos lipossomas apresentarem estabilidade e proteção da hidrólise peptídica, não se registou mais do que 30% de eficácia de encapsulação [74]. Os mesmos autores reportaram ainda outro sistema de encapsulação, desta vez baseado em emulsões múltiplas, mais concretamente um sistema água/óleo/água [75].

O uso de emulsões como sistema de encapsulação de fármacos tem-se revelado vantajoso, quando comparado a formulações mais convencionais, destacando-se a diminuição de efeitos colaterais e nefrotóxicos, tendo já demonstrado, no caso da aplicação

parentérica, uma menor dor local e uma redução da probabilidade de ocorrência de tromboflebites [76].

Comparando o uso de emulsões simples e de emulsões múltiplas, foi possível verificar que o uso de emulsões múltiplas se mostrou mais vantajoso. Contudo, e apesar de Shimizu e os seus colaboradores [75] terem obtido uma eficácia de encapsulação de 95%, registou-se uma perda de atividade de cerca de 84% da IgY. Segundo estes autores, a inativação da IgY verificou-se devido a um dos tensioativos utilizados (o HGCR), uma vez que provocou a ocorrência de fenómenos de adsorção da IgY na interface óleo-água, provocando a sua desnaturação [75]. Ainda assim, os autores sugeriram o estudo deste tipo de sistema de encapsulação dado o seu potencial, recorrendo, no entanto, a formulações com outro tipo de composição [75, 76].

### 1.2.3. Produção e Marketing

Findada a fase de desenvolvimento, segue-se a fase de produção [4]. Esta fase visa a produção em grande escala do medicamento, tendo como foco a integridade das condições de qualidade, segurança e eficácia [4]. Na procura de boas práticas de produção de produtos farmacêuticos, em 2005, surgiu o conceito de *Quality by Design* (QbD), como sendo uma iniciativa regulatória levada a cabo pela ICH (*International Council for Harmonisation*), cujo objetivo passa pelo desenho de uma estratégia de controlo processual ágil e flexível para garantia de uma produção robusta e de alta qualidade [77].

Esta fase inicia-se pela delineação do perfil ideal para o produto alvo, QTPP (do inglês *quality target product profile*) [77]. Nesta etapa sumarizam-se quais as especificações e características a ter em consideração durante a produção, de forma a garantir a qualidade, segurança e eficácia do medicamento (dose terapêutica, condições de estabilidade, via de administração e características farmacocinéticas) [12, 77]. Nesta fase é crucial que as entidades regulamentares competentes já tenham aprovado o medicamento [77]. Segue-se a identificação das características críticas do medicamento, CQA (do inglês *critical quality attributes*) [77]. Nesta etapa são delineadas quais as características químicas, físicas e biológicas que podem colocar em causa a segurança do doente [12, 77]. Ultrapassadas estas duas fases, define-se a zona de operação [77]. Segundo o ICH, a zona de operação (ou *Design Space*) é o resultado entre a “combinação e a interação entre as variáveis de entrada e os parâmetros do processo que promovem e asseguram a qualidade do produto” [78]. De seguida, define-se uma estratégia de controlo, baseada no *Know how* adquirido no desenvolvimento do processo, de forma a prever possíveis distúrbios inerentes ao mesmo [77]. Após a estratégia de controlo e a zona de operação estarem definidas, segue-se a validação do processo. Nesta etapa, o objetivo passa por averiguar se, com a estratégia de controlo adotada e com a zona de operação definida, é possível a produção do medicamento com o QTPP desejado [77, 79]. Uma vez aprovado o processo, é fundamental mantê-lo em frequente monitorização, revendo constantemente as CQAs, a fim de garantir que a zona de operação ou a estratégia de controlo adotada não necessitam de ser alteradas [77, 79].

Por fim, segue-se a fase de entrada do biofármaco no mercado [4]. Nesta fase é essencial que haja um canal ativo entre o mercado, onde o medicamento está inserido, e a

indústria de produção, para que esta possa realizar as alterações/ajustes necessários de acordo com as necessidades exigidas pelo mercado [4].

De seguida, encontram-se enumerados aspetos a ter em conta e que, usualmente, são abordados nesta fase, bem como o seu impacto nas etapas antecedentes [4].

- Quando um medicamento é comercializado, é fundamental que este seja atrativo para o paciente, pelo que é importante que os sistemas de distribuição apresentem flexibilidade e capacidade de adaptação às tendências do mercado onde o medicamento está inserido [2, 4].
- É necessária a realização de estudos do ciclo de vida do medicamento. Estes estudos visam apoiar a área de desenvolvimento e da produção, tendo em conta a procura do mercado, afetando fatores como a forma farmacêutica ou a forma de embalagem do medicamento [4].
- Uma vez que os custos de produção e de manutenção são, em parte, baseados na expectativa de mercado e no lucro desejado a médio/longo prazo, é importante que, nesta etapa, estes objetivos sejam cumpridos, de forma a viabilizar todo investimento realizado nas fases anteriores [2, 4].
- Devido à alta responsabilidade e exigência ética, é fundamental que a indústria mantenha uma relação estreita com o paciente, realizando estudos de farmacovigilância, de forma a, não só identificar possíveis efeitos adversos, como a avaliar o impacto da produção na ocorrência destes [4].

### **1.3. Enquadramento e objetivos**

Tal como referido anteriormente, a maior parte das aplicações terapêuticas descritas na literatura para a IgY têm em vista a sua administração por via oral, na qual o trato gastrointestinal demonstra ser o grande problema [64]. Alguns agentes terapêuticos, nomeadamente as proteínas, como é o caso da IgY, apresentam alguma sensibilidade inerente às características do trato gastrointestinal [80]. Mesmo com o desenvolvimento de estratégias de encapsulação foi possível, ainda assim, reportar perdas significativas de atividade da IgY [66]. Devido à sua fragilidade, é fundamental, que a formulação utilizada para veicular a IgY evite a sua eventual degradação. Desta forma, de todos os sistemas de encapsulação apresentados, a microemulsão múltipla parece destacar-se como a mais promissora [80].

Face ao exposto, esta dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de uma microemulsão múltipla com vista à administração parentérica de IgY, destacando-se que esta imunoglobulina foi obtida por um processo que permite um grau de pureza superior a 98% e um rendimento superior a 80%, não recorrendo a métodos cromatográficos [81].

## 2. Parte experimental

### 2.1. Materiais e equipamento

Nas Tabelas 3 e 4, encontram-se descritos, respetivamente, as matérias-primas/reagentes e os equipamentos utilizados no desenvolvimento do presente trabalho.

*Tabela 3- Reagentes e matérias-primas utilizados.*

<b>Material</b>	<b>Lote</b>	<b>Fornecedor</b>
Span <sup>®</sup> 80	131982-N-1	Acofarma
Miristato de Isopropilo	191437-P-1	Acofarma
Tween <sup>®</sup> 80	180974-P-2	Acofarma
Glicerina	190082-P-2	Acofarma
Kit de reagente BCA	-	Thermo Scientific
Água para preparações injetáveis	-	-
Pastilhas de preparação de tampão fosfato (PBS)	SLCF6818	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G-250	GR3386833-1	Sigma-Aldrich
Placas de gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio	-	Bio-Rad

Tabela 4- Equipamento utilizado.

<b>Equipamento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>	<b>Origem</b>
Agitador de alta velocidade	Jankel & Kunke	T25 Ultra-turrax	Alemanha
Agitador magnético	IKA	C-MAG HS 7	Alemanha
Balança	KERN	ABJ-NM/ABS-N	Alemanha
Centrífuga	Eppendorf	5804	Alemanha
Ultrassons	Sonics & Material Inc.	VCX 130	Estados Unidos da América
Homogeneizador de alta pressão	Stansted	SPCH-10	Reino-unido
Difratómetro laser	Malvern Instruments	Mastersizer 3000E	Reino-unido
Espectrofotómetro	Jasco	V-650	Japão
Potenciómetro	Hanna Instruments	2211	Estados Unidos da América
Aparelho de dissolução	Sotax AG	AT 7	Suíça
Banho termos-atado	Nahita	Auxilab S.L.	Espanha
Coluna de exclusão molecular	Shodex Protein	KW-802.5	Japão
Célula vertical de eletroforese	Bio-Rad	MiniPROTEAN®	Estados Unidos da América



## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Extração e Purificação de IgY

A IgY foi obtida segundo o método de extração e purificação descrito pela patente PCT/IB2019/057993 [81]. A partir do produto obtido, foi preparada uma solução de IgY numa solução comercial de tampão fosfato (PBS) (0,01 M, pH 7,4) (Solução 1), sendo que a quantidade de IgY obtida e a sua pureza foram determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e cromatografia líquida de alta eficiência com uma coluna de exclusão molecular (SE-HPLC).

Para os ensaios com SDS-PAGE, as amostras foram diluídas numa solução previamente preparada constituída por 6,25 mM de Tris-HCl, pH de 6,2, 2% de dodecilsulfato de sódio, 0,01% de bromofenol e 10% de glicerol, e sujeitas a desnaturação a 100° C durante 5 min, sendo que posteriormente os géis foram corados durante a noite.

Para os ensaios com SE-HPLC, as amostras foram diluídas 1:2 em tampão de corrida (100 mmol/L  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ , pH 7, 0.3 mol/L NaCl). O equipamento operou a um comprimento de onda de 280 nm, e a fase móvel correu de forma isocrática com um caudal de 0,5 L/min, ocorrendo uma injeção de 25µL de cada amostra. Pelos cromatogramas obtidos foi possível recolher as áreas dos picos de IgY ( $A_{IgY}$ ), dos agregados de IgY ( $A_{Agreg.IgY}$ ) e demais impurezas. A partir de uma reta de calibração de 1° ordem, calculou-se a concentração de IgY ( $[IgY]$ ), de acordo com a Equação 1:

$$[IgY] = \frac{A_{IgY} - b}{m \times f} \quad (1)$$

onde  $f$  corresponde ao fator de diluição,  $m$  corresponde ao declive da reta de calibração,  $b$  corresponde à ordenada na origem da reta de calibração e  $A$  corresponde à área do pico correspondente a IgY

A percentagem de pureza de IgY ( $\%PurezaIgY$ ) determinou-se a partir do quociente entre a área do pico de IgY e a área total de picos (IgY e impurezas,  $A_{Tot}$ ) dada a partir dos cromatogramas obtidos por HPLC, de acordo com a Equação 2:

$$\%PurezaIgY = \frac{A_{IgY}}{A_{Tot}} \times 100 \quad (2)$$

A percentagem de agregação de IgY (*%AgregaçãoIgY*) obtém-se a partir do quociente entre a área dos picos de agregados de IgY ( $A_{Agreg.IgY}$ ) e a área total dos picos correspondentes a IgY (agregados e monómeros,  $A_{Tot IgY}$ ) resultante dos dados obtidos por HPLC, pela equação 3:

$$\%AgregaçãoIgY = \frac{A_{Agreg.IgY}}{A_{Tot IgY}} \times 100 \quad (3)$$

### 2.2.2. Preparação de microemulsões múltiplas A/O/A

Por definição, uma emulsão é uma dispersão de dois líquidos imiscíveis [76]. Contudo, a estabilidade deste sistema é promovida pela adição de um terceiro componente: o tensoativo ou surfactante que evita a coalescência das gotículas da fase dispersa [76]. Os tensoativos são compostos anfifílicos, ou seja, apresentam, na sua estrutura, uma parte de natureza apolar e uma parte de natureza polar [76]. Por essa razão, os tensoativos assumem um papel fundamental no desenvolvimento de uma emulsão, posicionando-se na interface entre os dois líquidos de diferentes polaridades, permitindo que parte da sua estrutura (parte polar) interaja com os grupos hidrofílicos localizados na fase mais polar (também designada de fase aquosa), enquanto a sua parte apolar interage com os grupos hidrofóbicos localizados na fase menos polar (designada de fase oleosa) [80]. Desta forma, durante a produção de uma emulsão, dá-se a formação de agregados coloidais, designados de micelas [76].

De notar que a formação de uma emulsão dá-se quando o tensoativo atinge uma determinada concentração, também designada de concentração micelar crítica (CMC) [76]. Numa fase inicial, os tensoativos colocam-se à superfície da fase contínua, provocando um abaixamento da tensão superficial da mistura, sendo que, quando é atingida a CMC, dá-se a formação de micelas [76].

Existem diferentes tipos de emulsões: emulsões simples e emulsões múltiplas. Quando se trata de emulsões simples, referimo-nos a emulsões com apenas duas fases (a fase contínua e a fase dispersa), como é o exemplo de uma emulsão óleo/água ou água/óleo [76]. Quando nos referimos a emulsões múltiplas, o sistema apresenta mais do que duas fases [76]. Como exemplos temos os casos dos sistemas óleo/água/óleo ou água/óleo/água [75, 76].

As microemulsões são dispersões coloidais transparentes ou translúcidas, monofásicas, isotrópicas e termodinamicamente estáveis, de dois líquidos imiscíveis, compostas por óleo, água, tensoativos e co-tensoativos, com tamanhos de gotículas da fase interna entre os 10 e os 300 nm [82]. Tal como no caso das emulsões, as microemulsões também podem ser simples ou múltiplas.

### 2.2.2.1. Composição das microemulsões A/O/A

Na Tabela 5 encontra-se descrita a composição da microemulsão múltipla A/O/A, com e sem substância ativa (SA), desenvolvida neste trabalho, e a função de cada componente da formulação.

Tabela 5- Composição da microemulsão múltipla A/O/A.

	Matéria-prima	Quantidade (% m/m)		Função
		Com SA	Sem SA	
Fase 1	IgY	0,25	-	Substância ativa
	Água para preparações injetáveis	25,00	25,00	Fase aquosa
Fase 2	Span <sup>®</sup> 80	5,00	5,00	Tensioativo A/O
	Miristato de Isopropilo	69,75	70,00	Fase oleosa
Fase 3	Fase 1 + Fase 2	40,00	40,00	Fase dispersa
Fase 4	Tween <sup>®</sup> 80	10,00	10,00	Tensioativo O/A
	Glicerina	5,00	5,00	Co-Tensioativo
	Água para preparações injetáveis	45,00	45,00	Fase aquosa

### 2.2.2.2. Método de preparação das microemulsões A/O/A

Na Figura 5, encontra-se apresentado de forma esquemática o processo de preparação da microemulsão múltipla, sendo que o mesmo consistiu no seguinte procedimento:

- Adição da solução de IgY à água (Fase 1);

- Dissolução do Span<sup>®</sup>80 no Miristato de Isopropilo, com agitação constante e ligeiro aquecimento (para facilitar a dissolução do Span<sup>®</sup> 80) (Fase 2);

- 1ª Emulsificação (por agitação magnética ou utilizando um agitador de alta velocidade), misturando a Fase 1 com a Fase 2 (obtenção da Fase 3);

- Dissolução do Tween<sup>®</sup>80 e da glicerina na água, com agitação constante e ligeiro aquecimento (Fase 4);

- 2ª Emulsificação (por agitação magnética a 3000 rpm, durante 2 minutos ou utilizando um agitador de alta velocidade a 8000 rpm durante 2 minutos), misturando a Fase 3 com a Fase 4;

- Homogeneização (pelo método de sonicação ou pelo método de homogeneização a alta pressão) para reduzir o tamanho das gotículas da fase oleosa.

A etapa de emulsificação das fases foi realizada recorrendo a dois métodos distintos: o método de agitação magnética e o método de agitação a alta velocidade.

A etapa final de homogeneização foi realizada recorrendo também a dois métodos diferentes: o método de sonicação e o método da homogeneização a alta pressão. O método da homogeneização a alta pressão consiste na aplicação de uma pressão constante. O homogeneizador utilizado neste trabalho era do tipo de válvula em forma de anel. Este equipamento exerce pressões até 3500 bar, sujeitando a microemulsão a fenómenos de turbulência e cisalhamento intenso que levam à rotura da fase dispersa em gotículas de menor dimensão. O método de sonicação consiste na aplicação de um campo de ondas interfaciais acústicas, provocando a rotura das gotículas da fase dispersa da microemulsão.

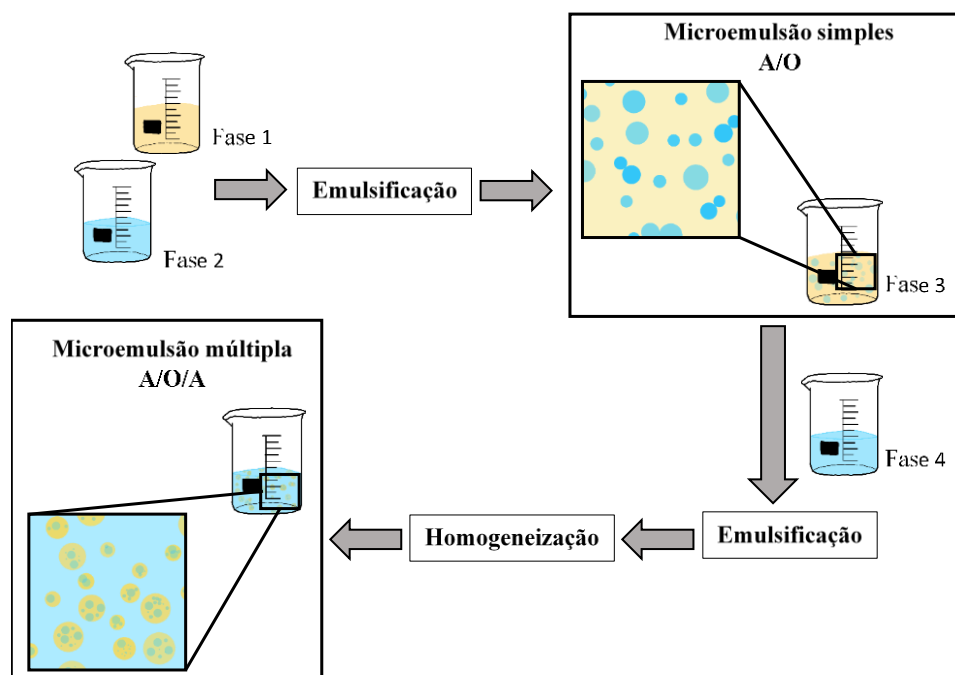


Figura 5- Esquema ilustrativo do processo de produção da microemulsão múltipla A/O/A.

### 2.2.3. Caracterização da microemulsão múltipla

Durante o desenvolvimento da formulação da microemulsão foi medido o pH, dada a importância deste parâmetro, não só numa perspectiva de estabilidade da SA, como devido à necessidade de o mesmo se situar num intervalo compatível com a via de administração parentérica. Para além do pH, determinou-se o tamanho das gotículas da fase oleosa da microemulsão, avaliou-se a estabilidade desta a partir de estudos de estabilidade acelerada por centrifugação, determinou-se a eficácia de encapsulação e realizaram-se estudos de libertação da IgY *in vitro*, tal como apresentado de seguida.

#### 2.2.3.1. Tamanho das gotículas da fase oleosa

O tamanho das gotículas da fase oleosa da microemulsão foi avaliado recorrendo a um método de difração da luz, que é uma das técnicas mais utilizadas para medir o tamanho de partículas/gotículas. Trata-se de um método rápido, fácil de usar, flexível e que pode ser

adaptado para medir amostras em diferentes formas físicas. Esta técnica baseia-se no fenómeno das partículas em suspensão dispersarem a luz em todas as direções com um padrão de intensidade que é dependente do tamanho das partículas [83].

Os resultados da avaliação do tamanho das partículas são geralmente apresentados na forma de uma distribuição estatística, sendo os tamanhos das partículas apresentados em percentis. Isto é, o tamanho obtido para  $D_v$  representa o tamanho onde  $v\%$  das partículas é inferior a esse valor. Neste trabalho, avaliaram-se os tamanhos correspondentes a  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  e  $D_{v90}$ . Associado a cada ensaio, é apresentado o valor do Span de forma a definir a distribuição de tamanhos registada em cada amostra. Este valor é calculado segundo a Equação 4.

$$Span = \frac{D_{v90} - D_{v10}}{D_{v50}} \quad (4)$$

Para uma correta medição, adotaram-se os parâmetros apresentados na Tabela 6.

*Tabela 6- Parâmetros utilizados para a determinação do tamanho das gotículas.*

<b>Parâmetros</b>	
Fase Dispersante	Água
Índice de retração do dispersante	1,330
Fase Dispersa	Miristato de Isopropilo
Índice de retração da fase dispersa	1,400
Nº de medições	5
Índice de Absorção*	0.001

\*Para fins de medição de difração de laser, a absorção de um material tem de ser especificada de acordo com a ordem de grandeza, que varia entre 1 e 0,001. De acordo com o tipo de partícula dispersa é possível estimar um índice de absorção, no caso de emulsões é aconselhado o valor de 0,001 [83].

No processo de preparação das microemulsões por sonicação foram efetuadas variações no tempo e na amplitude de sonicação para avaliar a influência destes parâmetros no tamanho das gotículas da fase oleosa. No método de homogeneização a alta pressão, avaliou-se a influência da submissão da microemulsão a vários ciclos de homogeneização no tamanho das gotículas da fase oleosa.

#### **Influência do tempo de sonicação**

Para a otimização do tempo de sonicação foram avaliados os tamanhos das gotículas da fase oleosa das microemulsões, submetendo-as a 15, 20, 25 e 30 minutos de sonicação.

#### **Influência da amplitude de sonicação**

Para a otimização da amplitude de sonicação foram avaliados os tamanhos das gotículas da fase oleosa das microemulsões, submetendo-as a amplitudes de sonicação de 60, 70 e 80%.

#### **Influência do número de ciclos de homogeneização a alta pressão**

Para a otimização do número de ciclos de homogeneização foram avaliados os tamanhos das gotículas da fase oleosa das microemulsões, utilizando 1, 2 e 3 ciclos de homogeneização.

### ***2.2.3.2. Estabilidade acelerada por centrifugação***

Para o estudo da estabilidade acelerada da microemulsão foram realizados testes de centrifugação a 4000 rpm, durante 30 minutos, seguida da avaliação de ocorrência de fenómenos de instabilidade, como coalescência e separação de fases.

### ***2.2.3.3. Eficácia de encapsulação***

Para o estudo da eficácia de encapsulação seguiu-se o seguinte procedimento:

-De forma a promover a instabilidade da microemulsão, procedeu-se à diluição desta numa solução de NaCl (0,9%, m/v) ou numa solução de tampão fosfato (0,01M, pH=7,4) e submeteu-se a uma centrifugação de 4000 rpm durante 30 minutos.

-Procedeu-se à recolha da fase aquosa inferior e quantificação da IgY na amostra. Como método de quantificação da IgY recorreu-se a um estudo de quantificação de proteínas totais, utilizando o reagente BCA (ácido bicinconínico). O método foi proposto por Smith [84] em 1985 e consiste na adição de um reagente (reagente BCA) que promove a formação de um complexo, proporcional à concentração de proteína na amostra (Figura 6), que apresenta um máximo de absorção a um comprimento de onda de 562 nm.

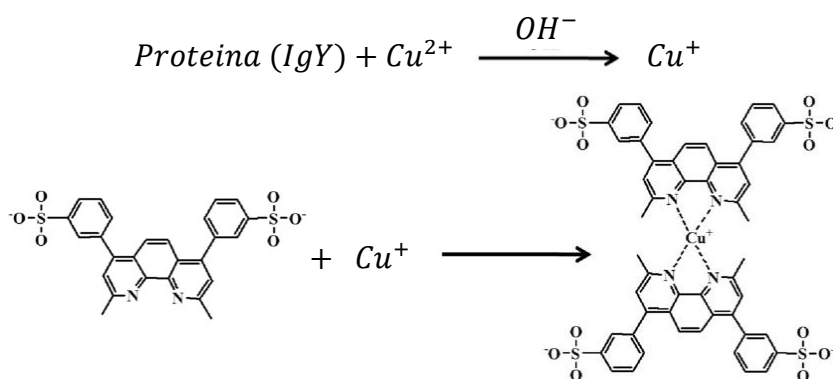


Figura 6- Reações principais que ocorrem no método BCA.

Para aplicação deste método realizou-se o seguinte procedimento:

-Preparação do reagente BCA, adicionando 1mL do reagente A a 50 mL do Reagente B, do respetivo kit do reagente BCA.

-Adição de 4 mL do reagente BCA por cada 200 µL de amostra proveniente da recolha da fase aquosa resultante da separação de fases, seguida de incubação em banho termostático a 37°C, durante 30 minutos.

-Finalizada a incubação foi realizada a leitura das absorvâncias, a 562 nm, utilizando um espectrofotómetro. Aplicando a equação da curva de calibração obtida a partir de soluções de IgY com concentrações entre 20 µg/mL e 1000 µg/mL, foi possível calcular a concentração de IgY na solução e de forma indireta aferir o teor de IgY encapsulada no interior das gotículas da fase oleosa da microemulsão. Foi também avaliada a interferência dos excipientes da microemulsão na absorvância da IgY. O valor final do doseamento da IgY na fase aquosa externa da microemulsão foi posteriormente corrigido, acautelando, portanto, a interferência dos excipientes da respetiva microemulsão sem SA.

Calculada a concentração da IgY na fase aquosa ( $[IgY]_{livre}$ ), procedeu-se ao cálculo da eficiência de encapsulação (%) a partir da Equação 5.



$$\text{Eficiência de encapsulação (\%)} = \frac{[IgY]_{total} - [IgY]_{livre}}{[IgY]_{total}} \times 100 \quad (5)$$

#### ***2.2.3.4. Estudos de libertação***

Os estudos de libertação foram realizados a partir da dispersão de 10g das microemulsões com (e sem) SA em 190 mL de solução tampão fosfato (0,01M, pH=7,4), a 37°C, submetida a uma agitação constante de 150 rpm. Em intervalos pré-determinados (15, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos) foram recolhidas amostras de 1 mL, sem reposição de volume. Seguidamente, procedeu-se à quantificação da IgY nas amostras, recorrendo ao método do reagente BCA, tendo em conta que o valor da IgY libertada a partir da microemulsão com SA foi posteriormente corrigido, acautelando, portanto, a interferência dos excipientes da respetiva microemulsão sem SA.

Paralelamente, o mesmo método foi aplicado a uma solução de IgY, de concentração conhecida, no seu estado livre, para a respetiva comparação com o perfil obtido com a microemulsão contendo IgY encapsulada.

## 2.3. Resultados e discussão

### 2.3.1. Extração e purificação da IgY

O método de extração e purificação utilizado permite obter IgY com um grau de pureza superior a 98% e um rendimento superior a 80% [81]. A partir do produto obtido, foi preparada uma solução de IgY em tampão fosfato (0,01 M, pH=7,4), sendo que de seguida analisou-se a amostra de forma a validar se o protocolo teria sido bem executado.

Recorrendo a métodos analíticos convencionais e comumente utilizados como a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e cromatografia líquida de alta eficiência com uma coluna de exclusão molecular (SE-HPLC), procedeu-se à análise da concentração ( $[IgY]$ ), percentagem de pureza ( $\%PurezaIgY$ ) e percentagem de agregação ( $\%AgregaçãoIgY$ ) de IgY.

Os perfis obtidos a partir da análise por SDS-PAGE do produto obtido após a execução do protocolo encontram-se na Figura 7. Analisando os resultados (poços 1 e 2) é possível verificar uma intensidade muito acentuada na banda correspondente a IgY, concluindo-se que a integridade da IgY foi mantida. Adicionalmente, uma vez que as restantes bandas se encontram com reduzida intensidade, pode concluir-se que a pureza da IgY de facto é claramente elevada, tal como reportado pela utilização do método utilizado [81].

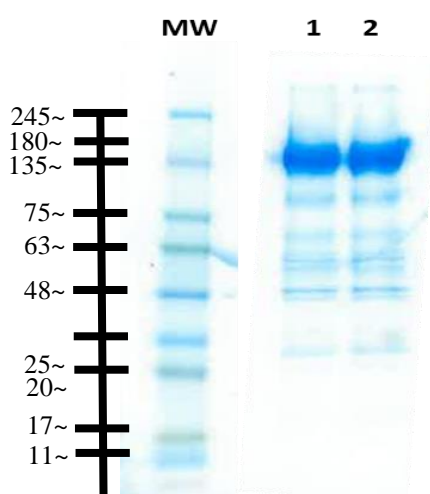


Figura 7- Perfis proteicos obtidos por SDS-PAGE após a extração e purificação de IgY.

O cromatograma obtido a partir da análise por SE-HPLC da solução obtida após a execução do protocolo pode ser encontrado na Figura 8. Pela análise do cromatograma identificam-se 2 picos principais: o pico correspondente a agregados de anticorpos com um tempo de retenção de 13,6 minutos e um segundo pico correspondente à forma monomérica dos anticorpos a um tempo de retenção de 15,2 minutos.

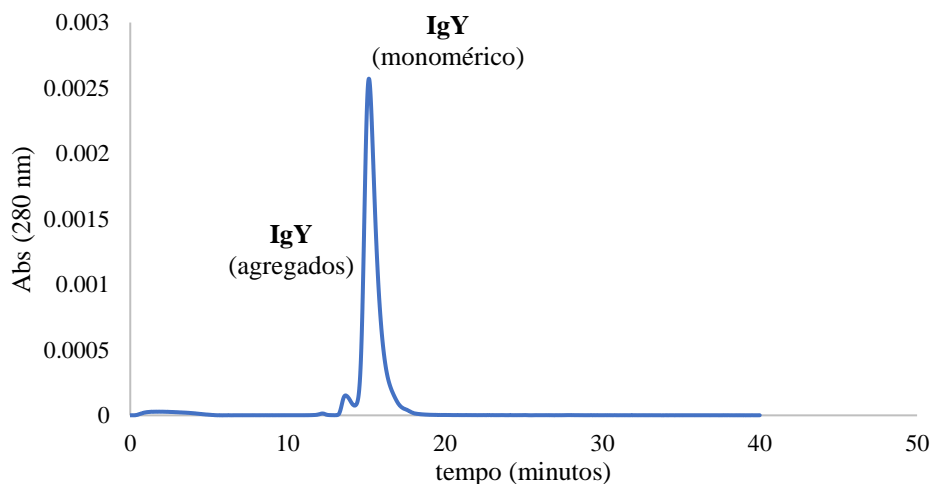


Figura 8- Cromatograma de SE-HPLC da solução obtida após a extração e purificação de IgY.

A partir da área dos picos foi possível obter os valores dos parâmetros selecionados, bem como o respetivo desvio padrão, estando estes sumariados na Tabela 7. De acordo com os resultados obtidos é possível confirmar a extração e purificação eficiente da IgY.

Registou-se, pela análise do primeiro pico, a ocorrência de agregados de IgY indo de encontro ao já reportado na literatura [85]. Desta forma, afirma-se que o método de extração e purificação foi bem executado, permitindo obter IgY com valores de pureza superiores a 90%.

Tabela 7- Valores da concentração, pureza e agregação obtidos após o processo de extração e purificação da IgY.

Parâmetro	Valor obtido	Desvio padrão
$[IgY] (mg/mL)$	17,27	0,39
%PurezaIgY(%)	93,06	0,02
%AgregaçãoIgY (%)	6,55	0,02

Os dados relativos à curva de calibração, bem como os cromatogramas obtidos nas réplicas realizadas podem ser consultados no Anexo A.1.

### 2.3.2. Tamanho das gotículas da microemulsão sem IgY

Durante a fase de desenvolvimento de uma microemulsão, o controle do tamanho das gotículas da fase dispersa apresenta bastante relevância. Segundo Buszello e Muller [76], o controle das propriedades físico-químicas da formulação, como o tamanho das gotículas da fase dispersa, pode conferir uma certa especificidade em termos de biodistribuição [76]. Outro motivo reside na estabilidade da microemulsão [76]. Fatores como a concentração de tensoativos e o tamanho das gotículas são preponderantes no retardamento de fenômenos de instabilidade da microemulsão, como a ocorrência de coalescência ou separação de fases [86].

Uma vez que o foco do trabalho residiu no desenvolvimento de um medicamento para administração por via parentérica, um dos requisitos exigidos, e já referenciado anteriormente, é a esterilidade [62]. A esterilização térmica e a esterilização por filtração são os métodos mais comuns para a obtenção de um produto estéril; no entanto, uma vez que a esterilização térmica comporta algum risco associado em termos de perda de estabilidade de IgY, a esterilização por filtração deve ser o método de eleição [62]. Posto isto, é fundamental que a microemulsão desenvolvida apresente gotículas da fase dispersa com tamanhos que permitam a realização de uma filtração esterilizante, isto é, tamanhos inferiores a 0,22  $\mu m$ .

Face ao exposto, neste capítulo apresenta-se a otimização do processo de produção da microemulsão múltipla sem substância ativa (SA), nomeadamente das condições de operação dos equipamentos nas etapas de Emulsificação e Homogeneização, de forma a obter as condições que permitissem obter o menor tamanho das gotículas da fase dispersa.

### 2.3.2.1. Influência da etapa de emulsificação

A etapa de emulsificação é uma etapa que ocorre em condições dinâmicas [87], ou seja, normalmente existe um processo de agitação que permite a mistura das duas fases, promovendo a colisão entre as gotículas e conseqüentemente a formação da emulsão [76].

O presente trabalho aborda o desenvolvimento de uma microemulsão múltipla, ou seja, com a realização de duas etapas de emulsificação. A primeira emulsificação foi realizada a partir da mistura da Fase 1 e da Fase 2 e a segunda emulsificação foi realizada a partir da mistura do produto obtido da primeira emulsificação (Fase 3) e da Fase 4.

Florence e Whitehill [88] estudaram os fenômenos de estabilidade de microemulsões múltiplas do tipo água/óleo/água, utilizando os mesmos tensoativos utilizados neste trabalho (Span<sup>®</sup>80 e Tween<sup>®</sup>80). Estes autores concluíram que o tamanho das gotículas internas não apresentam impacto na estabilidade da microemulsão, ou seja, não influenciam nem o tamanho das gotículas externas, nem as forças de atração entre estas, fatores estes importantes em fenômenos de coalescência [88]. Face ao exposto, o controle do tamanho das gotículas da fase interna resultantes da primeira emulsificação não foi avaliado uma vez que não se enquadrava no objetivo deste trabalho.

Durante as etapas da emulsificação, foram estudados dois tipos de agitação: 1- agitador magnético, com rotação de 3000 rpm, durante 2 minutos; e 2- agitador mecânico de alta velocidade, com uma rotação de 8000 rpm, durante 2 minutos. Posteriormente à segunda emulsificação, foram analisados os diâmetros das gotículas da fase hidrófoba, recorrendo a um difratômetro laser, encontrando-se os respectivos resultados na Tabela 8.

Tabela 8- Diâmetro das gotículas obtidos com diferentes agitadores durante a etapa de emulsificação.

	$D_{v10}$ (nm)	$D_{v50}$ (nm)	$D_{v90}$ (nm)	Span
<b>Agitador de alta velocidade</b> (8000 rpm, 2 minutos)	27,3±0,8	99,6±3,1	315,0±9,6	2,883
<b>Agitador magnético</b> (3000 rpm, 2 minutos)	58,0±1,7	126,0±3,6	364,2±10,0	2,963

Analisando os resultados obtidos é possível verificar que, quando utilizado o agitador mecânico de alta velocidade, foram registrados diâmetros de gotículas menores. Assumindo como referência o valor da mediana ( $Dv_{50}$ ), é possível verificar que, com o uso do agitador mecânico de alta velocidade, é possível registrar uma diminuição dos diâmetros das gotículas de cerca de 27% (agitador magnético – 126 nm, agitador mecânico de alta velocidade - 99,6 nm). Contudo, verifica-se que mesmo com o agitador mecânico de alta velocidade algumas gotículas apresentaram diâmetros até aos 315 nm.

Analisando os valores de Span obtidos, verifica-se que ambas as microemulsões analisadas apresentam variâncias muito idênticas, significando que apesar de com o agitador mecânico de alta velocidade ser possível obter tamanhos de gotículas menores, a amplitude do intervalo de tamanhos obtidos nas microemulsões obtidas pelos dois métodos de agitação é semelhante.

Da literatura, [89] sabe-se que a cinética de coalescência é influenciada pela frequência e probabilidade de colisão das gotículas. A frequência de colisão é função de variáveis como a viscosidade ou o volume da fase dispersa. Já a probabilidade de coalescência é função do quociente entre o tempo de drenagem ( $t_d$ ) e o tempo de colisão ( $t_{col}$ ) [89]. Operando com agitador mecânico de alta velocidade, uma vez que permite atingir rotações mais elevadas, o tempo de colisão entre as gotículas é curto, permitindo que as gotículas se separem antes que o filme de líquido entre estas atinja a espessura crítica, resultando numa probabilidade de coalescência mais baixa [89], tal como demonstra a Figura 9.

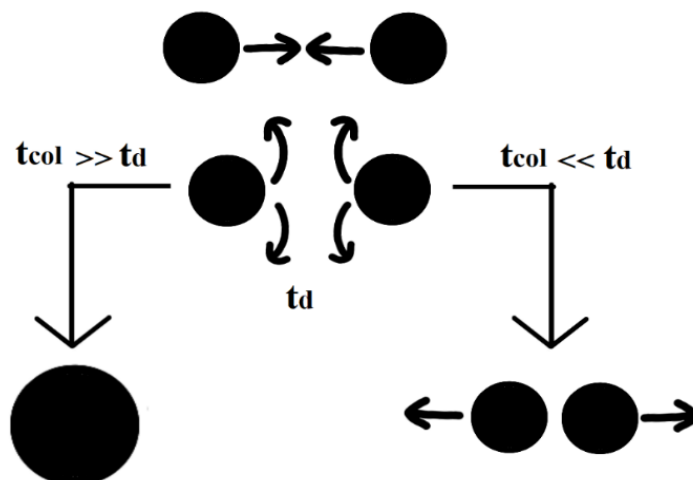


Figura 9- Esquema ilustrativo do fenómeno de coalescência numa emulsão.

Desta forma conclui-se que as melhores condições para a etapa de emulsificação são garantidas utilizando o agitador mecânico de alta velocidade a 8000 rpm durante 2 minutos.

### ***2.3.2.2. Influência da etapa de homogeneização***

Uma vez otimizada a etapa da emulsificação, seguiu-se a otimização da etapa da homogeneização. A etapa da homogeneização permite obter emulsões com gotículas mais pequenas e com uma gama de tamanhos mais estreita [90].

No presente trabalho procedeu-se à análise de dois métodos diferentes para a homogeneização da microemulsão: o método de sonicação, que consistiu na aplicação de um campo de ondas interfaciais acústicas, e o método da homogeneização a alta pressão, que consistiu na aplicação de uma pressão constante (3500 bar).

Segundo Danov e seus colaboradores [87], durante a etapa da homogeneização, o tamanho das gotículas de uma microemulsão é o resultado entre dois mecanismos opostos: o mecanismo de rotura das gotículas devido às forças de cisalhamento e de fenómenos de coalescência provocado pela colisão das gotículas [87]. Desta forma, o foco desta secção é o estudo do impacto dos diferentes tipos de forças inerentes a estes métodos, bem como a otimização das condições de operação nesta etapa.

Para a otimização das condições do sonicador foram realizados dois estudos: um primeiro estudo mantendo a amplitude de sonicação constante e variando o tempo de sonicação entre 15 e 30 minutos; e um segundo estudo onde foi mantido o tempo de sonicação constante e se variou a amplitude de sonicação entre 60 e 80%.

Para o primeiro estudo realizado, o sonicador operou a uma intensidade constante de 70%, e no segundo estudo o sonicador operou a um tempo de sonicação constante de 20 minutos. De salientar que para todos os estudos realizados, o volume de microemulsão utilizada foi constante (50 mL). Os resultados obtidos encontram-se sumariados na Figura 10.

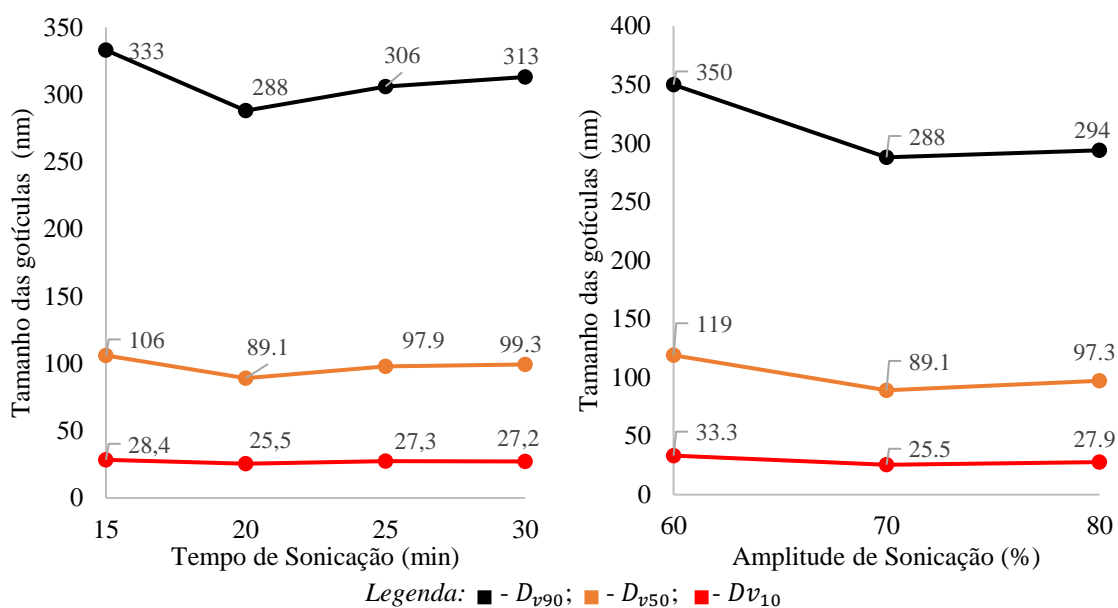


Figura 10- Estudo da influência das condições do sonicador.

Sendo o tamanho das gotículas de uma microemulsão, o resultado do equilíbrio entre os mecanismos de rotura das gotículas e os fenómenos de coalescência [87] é possível concluir que quando se dá o aumento seja do tempo de sonicação, seja da intensidade de sonicação, as forças de cisalhamento predominam sobre a ocorrência de fenómenos de coalescência, resultando numa diminuição do tamanho das gotículas. Contudo, à medida que se aumenta a intensidade e o tempo de sonicação o comportamento altera-se, existindo um ponto a partir do qual os fenómenos de coalescência predominam sobre as forças de cisalhamento exercidas pela sonicador. Este fenómeno resulta, na manutenção ou num ligeiro aumento do tamanho das gotículas. Esta variação é mais notória no caso dos resultados relativos ao percentil  $D_{v90}$ . Relativamente aos valores de Span, foi com um tempo de sonicação de 20 minutos e com 70% de amplitude de sonicação que se registou o menor valor, neste caso 2,946. Analisando a literatura [89] é possível encontrar resultados que apresentam um comportamento semelhante ao registado, em estudos da influência do tamanho das gotículas na estabilidade de emulsões.

Dos resultados das preparações obtidas por sonicação, conclui-se que operando com um tempo de sonicação de 20 minutos e a uma amplitude de sonicação de 70%, é possível obter gotículas com menor dimensão ( $D_{v10}=25,5$  nm;  $D_{v50}= 89,1$ nm;  $D_{v90} =288$  nm).

Para a otimização das condições do homogeneizador a alta pressão foi realizado um estudo com a variação do número de ciclos de homogeneização (1, 2 e 3 ciclos). Para este



estudo importa salientar que a quantidade de microemulsão submetida ao equipamento foi sempre a mesma, neste caso 10 mL. Os resultados encontram-se na Figura 11. A Tabela 9 sumaria os valores de Span obtidos de acordo com o número de ciclos de homogeneização de alta pressão.

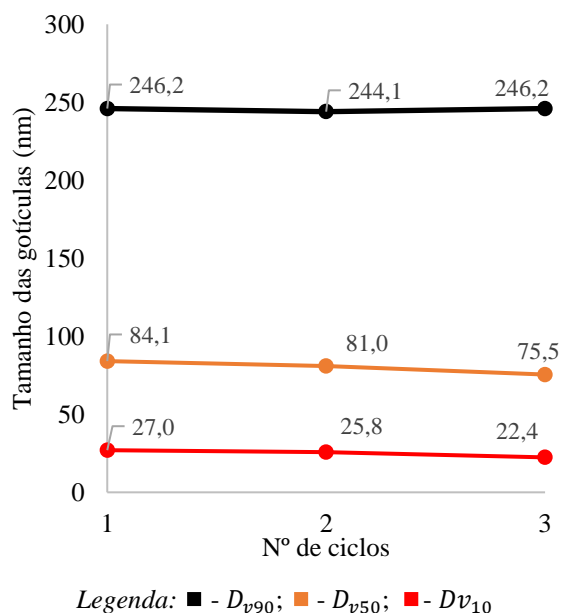


Figura 11- Estudo da influência do número de ciclos no homogeneizador de alta pressão.

Tabela 9- Valores de Span obtidos de acordo com o número de ciclos no homogeneizador de alta pressão.

Nº de Ciclos	1	2	3
Span	2,599	2,695	2,968

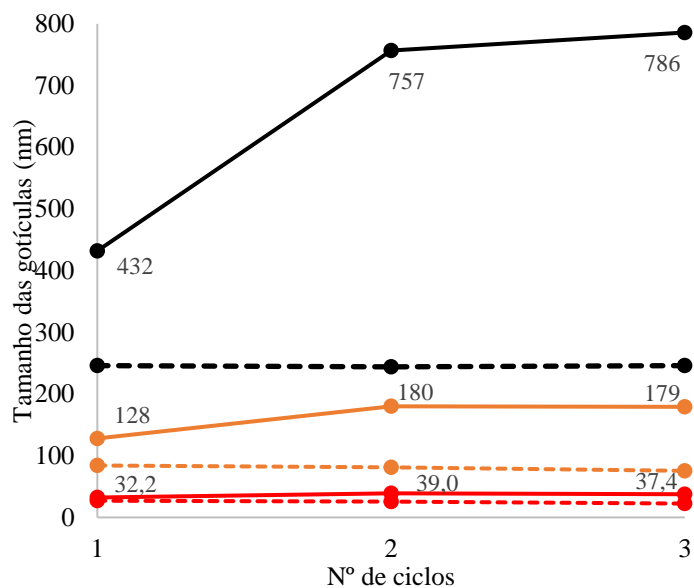
Relativamente ao tamanho das gotículas obtidas por homogeneização a alta pressão, não foram detetadas diferenças consideráveis com o aumento do número de ciclos de homogeneização. Analisando o  $D_{v90}$  verificou-se que, logo após a primeira homogeneização, o tamanho das gotículas obtidas era de cerca de 246,2 nm, após o segundo ciclo de homogeneização o tamanho reduziu para os 244,1 nm, e após três ciclos de homogeneização o tamanho das gotículas apresentou o mesmo valor de 246,2 nm, já registado após um ciclo de homogeneização. No caso do  $D_{v50}$  e  $D_{v10}$  verificou-se uma ligeira diminuição dos tamanhos das gotículas com o aumento do número de ciclos.

Analisando a Tabela 9, verifica-se que os valores de Span, aumentam com o número de ciclos de homogeneização, evidenciando que o número de ciclos de homogeneização provoca um aumento da dispersão de tamanhos obtidos na amostra. Desta forma é possível

concluir que operando com uma única passagem da emulsão pelo homogeneizador de alta pressão seria suficiente para se obterem as microemulsões com os melhores resultados, tal como reportado na literatura por Santos e seus colaboradores [91]. Além disso, tentou evitar-se submeter a formulação desenvolvida neste trabalho a vários ciclos para preservar a estabilidade da IgY.

Comparando os resultados obtidos por sonicação com os resultados obtidos por homogeneização a alta pressão, tem-se que as diferenças nos tamanhos das gotículas não são muito significativas. Em termos operacionais, o método de homogeneização a alta pressão gera pouco volume de preparação por cada ciclo executado (cerca de 10 mL por ciclo), enquanto a sonicação pode ser executada com um maior volume de amostra. O homogeneizador requer a realização de várias etapas, sendo necessário repetir os mesmos passos várias vezes até se homogeneizar todo o volume de amostra, enquanto o sonicador é um equipamento de utilização mais simples. Os processos de limpeza do equipamento são, também, incomparavelmente mais simples no processo de sonicação. No entanto, com o homogeneizador a alta pressão verificou-se uma maior homogeneidade no tamanho das gotículas, como pode ser comprovado pelos valores do Span (Sonicador- 2,946 e Homogeneizador de alta pressão- 2,599).

De seguida, avaliou-se o comportamento do tamanho das gotículas da fase oleosa após um período de armazenamento. Logo após a produção da microemulsão, os tamanhos das gotículas foram determinados, sendo esta posteriormente armazenada em frasco ambar no frigorífico (5-8°C) durante 60 dias. Após o período mencionado, realizou-se nova medição dos tamanhos das gotículas. Paralelamente a isto, avaliou-se também o possível impacto que o número de ciclos de homogeneização poderia ter no retardamento da ocorrência de fenómenos de instabilidade. Os resultados encontram-se na Figura 12.



Legenda: —  $-D_{v90}$  (após 60 dias); —  $-D_{v50}$  (após 60 dias); —  $-D_{v10}$  (após 60 dias)  
 - - -  $-D_{v90}$  (0 dias); - - -  $-D_{v50}$  (0 dias); - - -  $-D_{v10}$  (0 dias)

Figura 12- Representação dos tamanhos das gotículas após 60 dias de armazenamento.

Analisando os resultados obtidos é possível verificar que após 60 dias inevitavelmente ocorreu um aumento do tamanho das gotículas da fase oleosa. Relativamente aos valores do  $D_{v90}$  verificou-se um aumento muito acentuado dos tamanhos ao fim dos 60 dias, que pode ser indicativo da ocorrência de coalescência das gotículas. Contudo, as gotículas da microemulsão preparada com apenas um ciclo de homogeneização apresentaram o menor aumento, corroborando a conclusão anteriormente mencionada acerca do número ótimo de ciclos utilizado no processo de homogeneização a alta pressão.

O mesmo estudo foi ainda realizado com microemulsões que não tinham sido submetidas a homogeneização, tendo-se verificado, neste caso, uma total separação das fases, indo de encontro ao reportado na literatura [86] acerca da importância da etapa da homogeneização durante a produção das microemulsões.

### 2.3.3. Tamanho das gotículas da microemulsão com IgY

Uma vez otimizado o processo de produção da microemulsão múltipla, seguiu-se a preparação da microemulsão com IgY. Prepararam-se duas formulações com 0,1% (m/m) de IgY, com diferentes métodos de homogeneização e avaliaram-se os tamanhos das gotículas. Os resultados podem ser consultados na Tabela 10.

*Tabela 10- Diâmetro das gotículas obtidas com homogeneização com sonicador e homogeneizador de alta pressão.*

<b>Emulsificação</b>	<b>Homogeneização</b>	<b><math>D_{v10}</math> (nm)</b>	<b><math>D_{v50}</math>(nm)</b>	<b><math>D_{v90}</math>(nm)</b>	<b>Span</b>
Agitador mecânico de alta velocidade (8000 rpm, 2 minutos)	Sonicador (20 minutos, 70%)	24,6±0,8	81,7±2,9	268,0±9,0	2,736
	Homogeneizador de alta pressão (1 ciclo)	26,0±1,0	86,2±3,3	248,0±10,0	2,802

Comparando os resultados obtidos da microemulsão com e sem IgY verifica-se uma pequena diminuição no que toca aos resultados obtidos utilizando o sonicador, e uma variação pouco significativa quando utilizando o Homogeneizador de alta pressão.

Contudo, e tal como já verificado anteriormente, os resultados obtidos por sonicação e por homogeneização a alta pressão não apresentam diferenças consideráveis, mesmo na presença da IgY na fase aquosa mais interna da microemulsão. No entanto, para evitar a degradação da IgY devido à libertação de calor resultante da utilização do sonicador, os estudos prosseguiram recorrendo ao uso do homogeneizador de alta pressão na etapa da homogeneização.

Para além de se avaliar o impacto do agitador mecânico de alta velocidade e do homogeneizador de alta pressão no tamanho das gotículas da fase oleosa, avaliou-se também o impacto destes equipamentos na degradação da IgY. Para isso, submeteu-se uma solução de IgY em tampão fosfato (0,01 M, pH=7,4) a agitação de 8000 rpm durante 2 minutos utilizando o agitador mecânico de alta velocidade e a homogeneização a alta pressão de forma a avaliar a ocorrência de degradação da IgY. Não se tendo verificado diminuição nos

valores das absorvâncias da solução submetida aos diferentes procedimentos, pode-se então inferir que os mesmos não provocam a degradação da IgY. Importa salientar que estes resultados vão de encontro ao esperado uma vez que a pressão exercida pelo homogeneizador é de cerca de 3500 bar, enquadrando-se nos estudos levados a cabo por Chalghoumi e seus colaboradores [59], que reportam a não degradação de IgY quando exposta a pressões inferiores a 3922 bar.

### 2.3.4. Estabilidade acelerada por centrifugação

Os fenómenos de instabilidade, como a separação de fases ou a coalescência, devem ser avaliados após a produção da microemulsão [62] de forma a tentar ajustar algum parâmetro que possa não estar devidamente otimizado, ou até mesmo detetar fenómenos de instabilidade que possam ocorrer inoportunamente.

Seguiu-se o estudo da estabilidade acelerada por centrifugação. Para isso, a microemulsão foi sujeita a uma centrifugação a 4000 rpm, durante 30 minutos, sendo que posteriormente foi avaliada a ocorrência de fenómenos de instabilidade. Analisando as amostras obtidas, estas permaneceram homogéneas, não sendo possível o registo de qualquer fenómeno de instabilidade após a centrifugação, revelando que são estáveis quando expostas a condições de força centrífuga excessiva, tal como é possível observar na Figura 13.

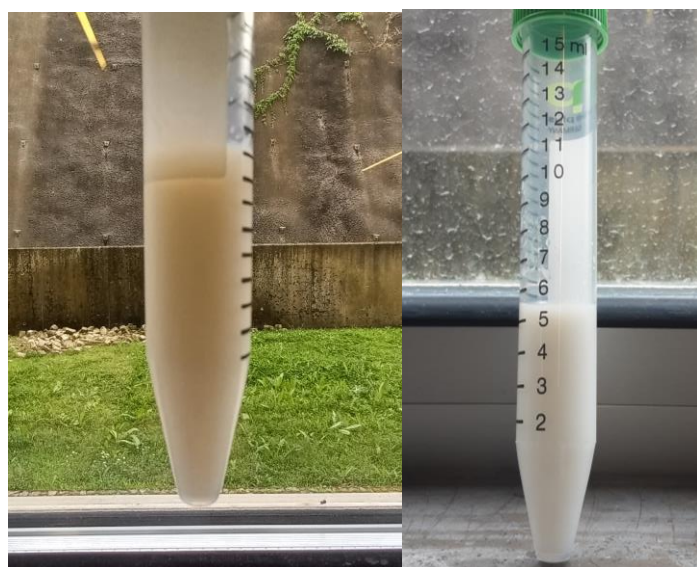


Figura 13- Microemulsão após centrifugação (4000 rpm, 30 minutos).

### 2.3.5. pH

Importa salientar que apesar do pH ser um parâmetro importante na estabilidade da IgY, a sua avaliação neste trabalho foi feita apenas no sentido de caracterizar as preparações obtidas. O pH das preparações parentéricas deve ser próximo de 7,4. Assim sendo, analisando a Figura 14 podemos verificar que o pH medido ao longo de 14 dias se manteve próximo do valor expectável.

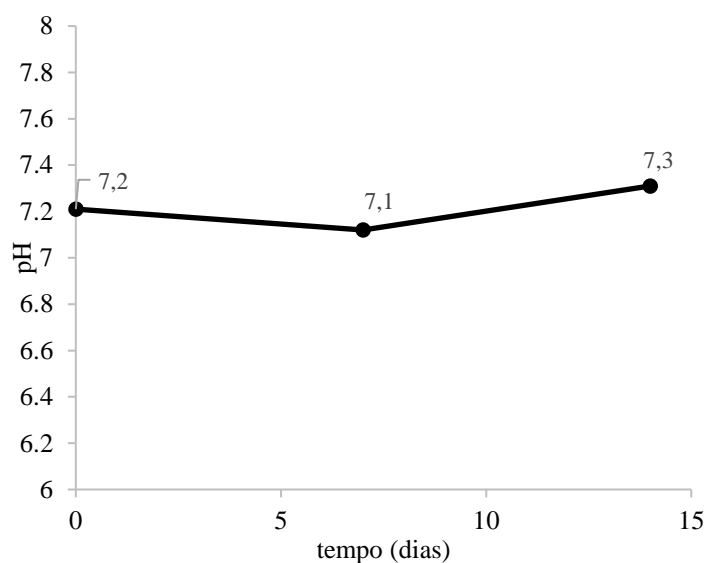


Figura 14- Variação do pH das microemulsões ao longo de 14 dias.

### 2.3.6. Quantificação da IgY na formulação

Uma vez otimizado todo o processo de produção da microemulsão múltipla, e avaliada a estabilidade desta, seguiram-se os estudos de eficácia de encapsulação e os ensaios de libertação *in vitro*. Uma vez tratarem-se de microemulsões, é condição *sinequanon* o uso de tensoativos, pelo que este aspeto dificultou a escolha de um método que permitisse a quantificação de IgY de forma adequada. Posto isto, neste capítulo abordar-se-ão os aspetos que levaram à escolha do método BCA para os estudos realizados.

A quantificação da IgY, após o processo de extração e purificação, foi realizada recorrendo a cromatografia líquida de alta eficiência com uma coluna de exclusão molecular (SE-HPLC). Contudo, devido à elevada percentagem de tensoativos presentes na microemulsão não foi possível a quantificação da IgY por SE-HPLC.

Uma vez a IgY tratar-se de uma proteína, estudou-se a possibilidade de proceder à quantificação de proteínas totais, nomeadamente pelo método de Bradford e pelo método de BCA. De maneira a avaliar a possibilidade de utilização de cada um destes métodos para a quantificação da IgY na microemulsão, prepararam-se duas formulações (com e sem IgY), sendo que pelo método do reagente de Bradford foram detetadas absorvâncias anómalas na formulação sem IgY, revelando a interferência de vários componentes da formulação neste método. Esta observação vai de encontro ao reportado na literatura [92]. Pelo método BCA verificou-se também alguma interferência dos tensoativos nos valores das absorvâncias; contudo, foi possível a quantificação da IgY na formulação através da subtração da absorvância da microemulsão sem IgY. No Anexo A.2 encontram-se todos os resultados obtidos a partir da análise por SE-HPLC e pelo reagente de Bradford que comprovam a ineficácia destes métodos na quantificação da IgY na formulação.

### **2.3.7. Eficácia de encapsulação de IgY**

Para o estudo da eficácia de encapsulação da IgY na microemulsão, promoveu-se primeiramente à instabilização da microemulsão e, por conseguinte, à separação de fases para se quantificar a IgY na fase aquosa. Para tal, dilui-se (1:19, v:v) a microemulsão em diferentes soluções (Tampão fosfato (0,01M, pH=7,4) e solução de NaCl 0,9% (m/v)), e a separação de fases foi promovida pela realização de centrifugação a 4000 rpm, durante 30 minutos. Uma vez promovida a separação de fases, procedeu-se à recolha da fase aquosa (fase inferior), e quantificação segundo o método BCA. Foi realizado o mesmo ensaio em formulações sem IgY, e assim, o valor final do doseamento da IgY na fase aquosa foi posteriormente corrigido, acautelando, portanto, a interferência dos excipientes da respetiva microemulsão sem SA. No Anexo A.3 encontra-se a curva de calibração obtida a partir de soluções de IgY com concentrações entre 20 µg/mL e 1000 µg/mL, que permitiu o cálculo da concentração de IgY na fase aquosa e determinar o teor de IgY encapsulada no interior das gotículas da fase oleosa da microemulsão.

Na amostra obtida após a centrifugação, pode-se verificar que a separação de fases é mais eficiente quando é utilizada a solução de NaCl, uma vez que permite obter uma solução ligeiramente mais límpida, tal como demonstra a Figura 15.

A Tabela 11 sumaria os resultados obtidos para a eficácia de encapsulação. Apesar dos valores obtidos de eficácia de encapsulação serem semelhantes, o valor obtido quando utilizada a solução de NaCl poderá considerar-se mais rigoroso uma vez que esta solução provocou uma maior instabilização da microemulsão e, por conseguinte, uma melhor separação de fases, permitindo minimizar a interferência dos excipientes da respetiva microemulsão sem SA.

Analisando os perfis obtidos a partir da análise por SDS-PAGE do produto obtido após a execução do protocolo quer com a solução de tampão fosfato quer com a solução de NaCl (poços 1 e 2, Figura A.4.1, Anexo A.4) é possível verificar a presença da banda correspondente à IgY, concluindo-se que a integridade da IgY foi mantida.

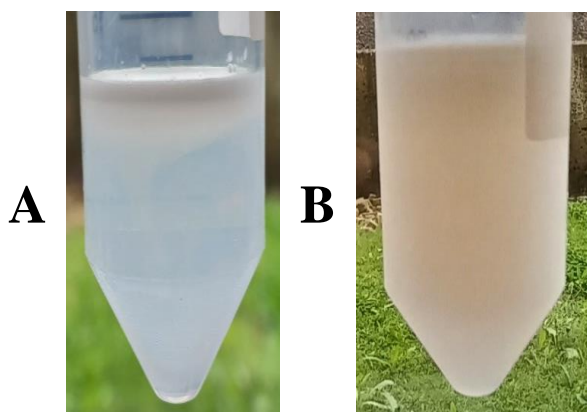


Figura 15- Amostras obtidas após diluição e centrifugação. A) utilizando a solução de NaCl; B) utilizando a solução de PBS (0,01M, pH=7,4).

Tabela 11- Eficácia de encapsulação após diluição com solução de NaCl (0,9% (m/v)) e com solução PBS (0,01M, pH=7,4).

<b>Eficácia de encapsulação (%)</b>	
<b>Solução de NaCl (0,9% (m/v))</b>	<b>Solução de PBS (0,01M, pH 7,4)</b>
<b>57,19±2,90%</b>	<b>59,34±3,28%</b>



### 2.3.8. Liberação de IgY

O ensaio de liberação *in vitro* permite perceber o impacto da microemulsão na liberação e biodisponibilidade de IgY. Para tal, foram dispersos 10 g de microemulsão em 190 mL de solução de tampão fosfato (0,01 M, pH 7,4), a uma temperatura de 37°C, e submetidos a uma agitação constante de 150 rpm. Periodicamente (ao fim de 15, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos), foram retiradas alíquotas de 1 mL do meio de dissolução e a IgY quantificada segundo o método BCA. O ensaio foi realizado em triplicado. Paralelamente, foi realizado, nas mesmas condições, o ensaio de liberação no qual a microemulsão contendo IgY foi substituída por uma solução de IgY na mesma concentração da microemulsão, bem como o ensaio com a microemulsão sem IgY (para anular a interferência dos excipientes nos valores das absorvâncias da microemulsão com IgY). Na Figura 16 encontram-se os perfis de liberação obtidos.

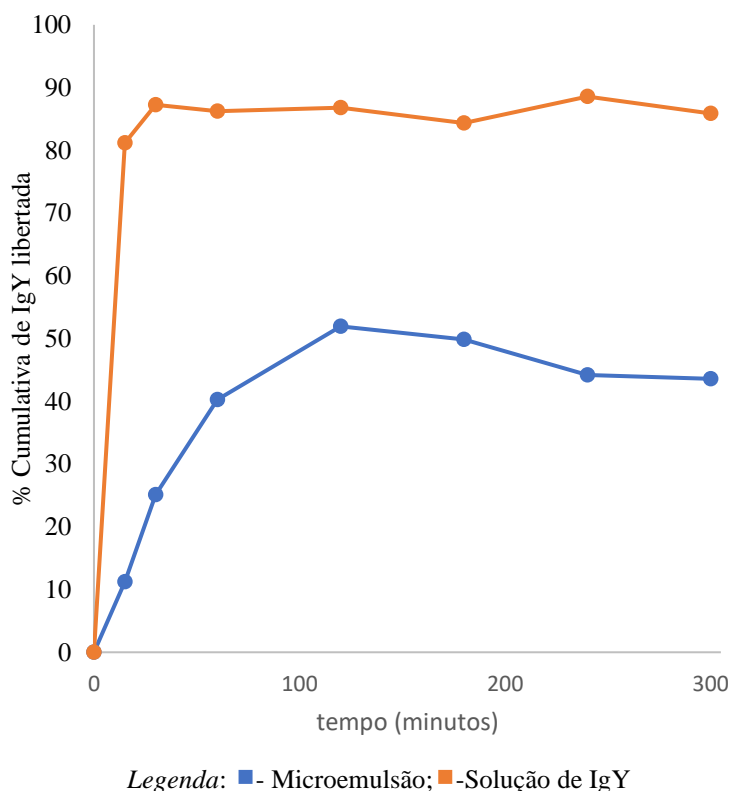


Figura 16- Perfil de liberação da IgY

Analisando os resultados obtidos, verifica-se que no caso da IgY livre ao fim de 15 minutos existe cerca de 82% de IgY disponível no meio de dissolução. Por outro lado, no caso da microemulsão a libertação da IgY ocorreu de forma gradual, mais prolongada, tendo sido libertados apenas cerca de 11% de IgY aos 15 minutos. Além disso, no caso da microemulsão, verificou-se que o máximo de libertação foi obtido ao fim de 120 minutos, correspondendo a quase metade do valor obtido com a IgY livre, verificando-se depois um ligeiro decréscimo até aos 300 minutos de ensaio.

Analisando os perfis obtidos a partir da análise por SDS-PAGE das amostras recolhidas durante os ensaios de libertação (poços 5 a 19, Figura A.4.1 e Figura A.4.2, Anexo A.4.) é possível verificar a presença da banda correspondente à IgY, concluindo-se que a integridade da IgY libertada foi mantida.

O uso de sistemas de encapsulação tem-se mostrado muito vantajoso pois permite prolongar a libertação e confere proteção à IgY, mantendo a sua integridade [64]. No caso de microemulsões múltiplas, o facto das gotículas internas contendo IgY estarem encapsuladas por gotículas de fase oleosa, permite que se crie uma camada hidrófoba em torno das gotículas da fase contendo IgY, assumindo um papel semelhante ao de uma membrana semipermeável [88]. Desta forma, a libertação da IgY pode ocorrer gradualmente, seja pela ocorrência de fenómenos de coalescência das gotículas internas constituídas pela solução de IgY, provocando a rotura da membrana de óleo que as circundam [86], seja pela separação de fases, provocando a libertação das gotículas internas para o meio de dissolução [88], ou seja até pela permeação das moléculas de IgY através da barreira constituída pela fase oleosa [86].

O desenvolvimento de mecanismos de libertação controlada, lenta e mais seletiva têm sido propostos, em resposta a problemas de segurança durante a administração de medicamentos [93]. Gulati e Gupta [94] salientaram um elevado desempenho das microemulsões como sistemas de libertação por via parentérica [94], uma vez que o facto da distribuição ser mais lenta e gradual, tal como demonstrado nos resultados obtidos, pode resultar num aumento de cerca de 1,5 a 2 vezes do tempo de residência do fármaco na corrente sanguínea, permitindo uma maior segurança durante a administração e evitando a necessidade de administrações frequentes do medicamento.

### 3. Conclusões e trabalhos futuros

Neste trabalho procedeu-se ao desenvolvimento e caracterização de uma microemulsão múltipla como possível sistema de encapsulação de IgY, tendo em vista a respetiva administração por via parentérica. A IgY foi extraída e purificada a partir da gema de ovo e posteriormente utilizada nas formulações.

Para a caracterização da microemulsão determinou-se o tamanho das gotículas da fase oleosa da microemulsão, avaliou-se respetiva estabilidade acelerada por centrifugação, determinou-se a eficácia de encapsulação, e realizaram-se estudos de libertação *in vitro* da IgY.

A partir da análise dos tamanhos das gotículas da fase oleosa da microemulsão, foi possível otimizar o processo de produção da mesma, nomeadamente no que diz respeito às condições a utilizar nas etapas de emulsificação e de homogeneização. Avaliando a estabilidade da microemulsão, verificou-se, ao fim de 60 dias de armazenamento, um ligeiro aumento do tamanho médio das gotículas da fase oleosa. Estes resultados sugerem a necessidade de adicionar um agente viscosificante à fase aquosa externa para evitar a coalescência das gotículas.

Apesar da dificuldade na quantificação de IgY na microemulsão devido à interferência dos excipientes nos métodos de doseamento, foi possível, utilizando o método BCA, determinar a eficácia de encapsulação, tendo sido obtido um valor próximo de 60%. Nos estudos de libertação *in vitro*, verificou-se, ao longo de 5 horas de ensaio, uma libertação prolongada e gradual de cerca 50% de IgY a partir da microemulsão, confirmando o potencial da utilização de microemulsões múltiplas como sistema de encapsulação de proteínas como a IgY.

Análises das amostras recolhidas por SDS-PAGE, quer durante a determinação da eficácia de encapsulação, quer durante os ensaios de libertação, permitiram concluir que a integridade da IgY não foi alterada, durante todos os estudos realizados.

Para trabalhos futuros e tendo em consideração a aplicação parentérica da formulação desenvolvida sugere-se a realização de ensaios de citotoxicidade com várias linhas celulares humanas e a utilização de anticorpos específicos para avaliar a atividade dos mesmos para um determinado agente patogénico após a libertação. Uma vez que as microemulsões demonstraram alguma instabilidade em termos de tamanhos das gotículas da fase oleosa

após 60 dias de armazenamento, poderá haver a necessidade de adicionar um agente viscosificante à fase aquosa externa para diminuir a coalescência das gotículas.

## 4. Referências

1. Capela, E.V., M.R. Aires-Barros, M.G. Freire, and A.M. Azevedo, *Monoclonal antibodies—addressing the challenges on the manufacturing processing of an advanced class of therapeutic agents*, in *Frontiers in Clinical Drug Research - Anti-Infectives*. 2017, Bentham e Books: United Kingdom. p. 142-203.
2. Rader, R.A., *(Re) defining biopharmaceutical*. *Nature Biotechnology*, 2008. **26**(7): p. 743-751.
3. Tsuji, K. and K. Tsutani, *Approval of new biopharmaceuticals 1999–2006: comparison of the US, EU and Japan situations*. *European journal of pharmaceutics biopharmaceutics*, 2008. **68**(3): p. 496-502.
4. Behme, S., *Manufacturing of pharmaceutical proteins*. 2nd ed. 2015, New Jersey, USA: Wiley Online Library.
5. Morrow, J.K. and E.S. Langer. *A Biopharma Year In Review — And A Look Ahead To 2020*. 2019 [2021, 30 March]; Available from: <https://www.biosimilardevelopment.com/doc/a-biopharma-year-in-review-and-a-look-ahead-to-0001>.
6. BioPlan associates, i., *16th Annual Report and Survey of Biopharmaceutical Manufacturing Capacity and Production*, in *Report and Survey of Biopharmaceutical Manufacturing Capacity and Production*. 2019, April. p. 51.
7. PharmaCompass, L. *FDA & EMA's New Drug Approvals (Mid-2020 Recap)*. 2021 [2021, 30 March].
8. Morrison, C. and R. Lähteenmäki, *Public biotech in 2016—the numbers*. *Nature Biotechnology*, 2017. **35**(7): p. 623-629.
9. Senior, M., *The biopharmaceutical anomaly*. *Nature Biotechnology*, 2020. **38**(7): p. 798-805.
10. Cox, M.M. and D.L. Nelson, *Lehninger principles of biochemistry*. Vol. 5. 2008, New York, USA.
11. Hanly, W.C., J.E. Artwohl, and B.T. Bennett, *Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry*. *Ilar Journal*, 1995. **37**(3): p. 93-118.
12. Almeida, A.M.R., *Purification of antibodies using aqueous two-phase systems*, in *Chemical Department*. 2013, University of Aveiro. p. 122.

13. Newcombe, C. and A.R. Newcombe, *Antibody production: polyclonal-derived biotherapeutics*. Journal of chromatography B, 2007. **848**(1): p. 2-7.
14. Wootla, B., A. Denic, and M. Rodriguez, *Polyclonal and monoclonal antibodies in clinic*, H.M. Antibodies, Editor. 2014. p. 79-110.
15. Michael, A., S. Meenatchisundaram, G. Parameswari, T. Subbraj, R. Selvakumaran, and S. Ramalingam, *Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies*. Indian Journal of Science and Technology 2010. **3**(4): p. 468-474.
16. Leiva, C.L., M.J. Gallardo, N. Casanova, H. Terzolo, and P. Chacana, *IgY-technology (egg yolk antibodies) in human medicine: A review of patents and clinical trials*. International immunopharmacology, 2020. **81**: p. 106269.
17. Sudjarwo, S.A., K. Eraiko, and K. Giftania Wardani Sudjarwo, *The activity of immunoglobulin Y anti-Mycobacterium tuberculosis on proliferation and cytokine expression of rat peripheral blood mononuclear cells*. Pharmacognosy research, 2017. **9**(Suppl 1): p. S5.
18. Hintao, J., R. Teanpaisan, V. Chongsuvivatwong, C. Ratarasan, and G. Dahlen, *The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus*. Oral microbiology immunology, 2007. **22**(3): p. 175-181.
19. Shofiqur, R.A., E.-S.M. Ibrahim, R. Isoda, K. Umeda, V.S. Nguyen, and Y. Kodama, *Effect of passive immunization by anti-gingipain IgY on periodontal health of dogs*. Veterinary Science Development, 2011. **1**(1): p. e8-e8.
20. Abdul-Careem, M.F., D.B. Hunter, M.D. Lambourne, L.R. Read, P. Parvizi, and S. Sharif, *Expression of cytokine genes following pre-and post-hatch immunization of chickens with herpesvirus of turkeys*. Vaccine, 2008. **26**(19): p. 2369-2377.
21. Pereira, E., M. van Tilburg, E. Florean, and M.J.I. Guedes, *Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review*. International immunopharmacology, 2019. **73**: p. 293-303.
22. Compton, J., *Inoculation theory*, in *The sage handbook of persuasion - Second Edition*. 2013. p. 220-237.

23. Monserrat-Martinez, A., Y. Gambin, and E. Sierceki, *Thinking outside the bug: molecular targets and strategies to overcome antibiotic resistance*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(6): p. 1255.
24. Russell, W.M.S. and R.L. Burch, *The principles of humane experimental technique*. 1959, London: Methuen & CO LTD.
25. Tan, S.H., A. Mohamedali, A. Kapur, L. Lukjanenko, and M.S. Baker, *A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure*. Journal of immunological methods, 2012. **380**(1-2): p. 73-76.
26. Torché, A.-M., M. Le Dimna, P. Le Corre, A. Mesplède, S. Le Gal, R. Cariolet, and M.-F. Le Potier, *Immune responses after local administration of IgY loaded-PLGA microspheres in gut-associated lymphoid tissue in pigs*. Veterinary immunology immunopathology, 2006. **109**(3-4): p. 209-217.
27. ClinicalTrials.gov. *Phase III Study to Evaluate Clinical Efficacy and Safety of Avian Polyclonal Anti-Pseudomonas Antibodies (IgY) in Prevention of Recurrence of Pseudomonas Aeruginosa Infection in Cystic Fibrosis Patients*. 2011, 18 October 2017, 6 July 2021, 20 April]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01455675>.
28. Zajac, M.S.J.D. and F. Horn, *IgY antibodies against bacterial infection, Development of candidate IgY antibodies against ESBL-producing gram-negative bacteria for oral therapy*, in *Institut für Klinische Immunologie* 2018, Universitätsklinikum Leipzig.
29. Mony, T.J., H.-S. Kwon, M.-K. Won, Y.-M. Kang, S.-H. Lee, S.-Y. Kim, D.-Y. Baek, and F. Elahi, *Anti-urease immunoglobulin (IgY) from egg yolk prevents Helicobacter pylori infection in a mouse model*. Food Agricultural Immunology, 2019. **30**(1): p. 662-676.
30. Lanzarini, N.M., G.A. Bentes, E.d.M. Volotão, and M.A. Pinto, *Use of chicken immunoglobulin Y in general virology*. Journal of Immunoassay Immunochemistry, 2018. **39**(3): p. 235-248.
31. Nilsson, E., H. Kollberg, M. Johannesson, P.-E. Wejåker, D. Carlander, and A. Larsson, *More than 10 years' continuous oral treatment with specific immunoglobulin Y for the prevention of Pseudomonas aeruginosa infections: a case report*. Journal of medicinal food, 2007. **10**(2): p. 375-378.

32. Abbas, A.T., S.A. El-Kafrawy, S.S. Sohrab, and E.I.A. Azhar, *IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections*. Human vaccines immunotherapeutics, 2019. **15**(1): p. 264-275.
33. Nilsson, E., A. Amini, B. Wretling, and A. Larsson, *Pseudomonas aeruginosa infections are prevented in cystic fibrosis patients by avian antibodies binding Pseudomonas aeruginosa flagellin*. Journal of Chromatography B, 2007. **856**(1-2): p. 75-80.
34. Constantin, C., M. Neagu, T.D. Supeanu, V. Chiurciu, and D.A. Spandidos, *IgY-turning the page toward passive immunization in COVID-19 infection*. Experimental Therapeutic Medicine, 2020. **20**(1): p. 151-158.
35. Grando, T.H., M.D. Baldissera, M.F. de Sá, G.M. do Carmo, B.C.Z. Porto, G.S. Aguirre, M.I. Azevedo, F.P. de Jesus, J.M. Santurio, and M.R. Sagrillo, *Avian antibodies (IgY) against Trypanosoma cruzi: Purification and characterization studies*. Journal of immunological methods, 2017. **449**: p. 56-61.
36. Huopalahti, R., M. Anton, R. López-Fandiño, and R. Schade, *Bioactive egg compounds*. 1 ed. 2007, Berlin, Heidelberg: Springer, .
37. Akita, E. and S. Nakai, *Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain*. Journal of immunological methods, 1993. **160**(2): p. 207-214.
38. Polson, A., T. Coetzer, J. Kruger, E. Von Maltzahn, and K. Van der Merwe, *Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens*. Immunological investigations, 1985. **14**(4): p. 323-327.
39. Bade, H. and H. Stegemann, *Rapid method of extraction of antibodies from hen egg yolk*. Journal of immunological methods, 1984. **72**(2): p. 421-426.
40. Liu, J., J. Yang, H. Xu, J. Lu, and Z. Cui, *A new membrane based process to isolate immunoglobulin from chicken egg yolk*. Food chemistry, 2010. **122**(3): p. 747-752.
41. Liu, J., J. Yang, H. Xu, H. Zhu, J. Qu, J. Lu, and Z. Cui, *Isolation of immunoglobulin from chicken egg yolk using single-stage ultrafiltration with 100-kDa regenerated cellulose membranes*. International Journal of Food Engineering, 2011. **7**(1): p. 8.
42. Polson, A., M.B. von Wechmar, and M. Van Regenmortel, *Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens*. Immunological communications, 1980. **9**(5): p. 475-493.



43. Ntakarutimana, V., P. Demedts, M. Van Sande, and S. Scharpe, *A simple and economical strategy for downstream processing of specific antibodies to human transferrin from egg yolk*. Journal of immunological methods, 1992. **153**(1-2): p. 133-140.
44. Hatta, H., M. Kim, and T. Yamamoto, *A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY"*. Agricultural biological chemistry, 1990. **54**(10): p. 2531-2535.
45. Jensenius, J.C., I. Andersen, J. Hau, M. Crone, and C. Koch, *Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG*. Journal of immunological methods, 1981. **46**(1): p. 63-68.
46. Akita, E.M. and S. Nakai, *Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification*. Journal of food science, 1992. **57**(3): p. 629-634.
47. Hernandez-Campos, F.J., E. Brito-De la Fuente, and B. Torrestiana-Sanchez, *Purification of egg yolk immunoglobulin (IgY) by ultrafiltration: effect of pH, ionic strength, and membrane properties*. Journal of agricultural food chemistry, 2010. **58**(1): p. 187-193.
48. Kim, H. and S. Nakai, *Immunoglobulin separation from egg yolk: a serial filtration system*. Journal of food science, 1996. **61**(3): p. 510-513.
49. Bizanov, G., *IgY extraction and purification from chicken egg yolk*. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 2017. **68**(3): p. 265-272.
50. Pulawy, B.V.I., *Production and purification of IgY from egg yolk after immunization of hens with pig IgG*. IMMUNIZATION, FROM EGG YOLK AFTER, 2003. **47**: p. 403-410.
51. Dai, Y.-C., Y.-Y. Wang, X.-F. Zhang, M. Tan, M. Xia, X.-B. Wu, X. Jiang, and J. Nie, *Evaluation of anti-norovirus IgY from egg yolk of chickens immunized with norovirus P particles*. Journal of virological methods, 2012. **186**(1-2): p. 126-131.
52. Chang, H.-M., T.-C. Lu, C.-C. Chen, Y.-Y. Tu, and J.-Y. Hwang, *Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides*. Journal of agricultural food chemistry, 2000. **48**(4): p. 995-999.
53. Kwan, L., E. Li-Chan, N. Helbig, and S. Nakai, *Fractionation of water-soluble and-insoluble components from egg yolk with minimum use of organic solvents*. Journal of Food Science, 1991. **56**(6): p. 1537-1541.

54. Ko, K. and D.U. Ahn, *Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography*. Poultry Science, 2007. **86**(2): p. 400-407.
55. Hodek, P., P. Trefil, J. Simunek, J. Hudecek, and M. Stiborova, *Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations*. International Journal of ELECTROCHEMICAL SCIENCE, 2013. **8**: p. 113-124.
56. Allen, T.M., *Liposomes*. Drugs, 1997. **54**(4): p. 8-14.
57. Shimizu, M., R.C. FITZSIMMONS, and S. NAKAI, *Anti-E. coli Immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient*. Journal of Food Science, 1988. **53**(5): p. 1360-1368.
58. Lee, K., S.-K. Chang, Y.-J. Lee, J.-H. Lee, and N.-S. Koo, *Acid Stability of Anti-Helicobacter pylori IgY in in Aqueous Polyol Solution*. BMB Reports, 2002. **35**(5): p. 488-493.
59. Chalghoumi, R., Y. Beckers, D. Portetelle, and A. Théwis, *Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review*. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 2009. **13**(3): p. 295-308.
60. Chalghoumi, R., Y. Beckers, D. Portetelle, and A. Théwis, *Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review*. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 2009. **13**(3): p. 295-308.
61. Ruiz, M.E. and S.S. Montoto, *Routes of drug administration*, in *ADME Processes in Pharmaceutical Sciences*. 2018, Springer. p. 97-133.
62. Felton, L., *Remington Essentials of Pharmaceutics*. 1st ed. 2013, United Kingdom.
63. Medicamento, I.-I.N.d.F.e.d., *Farmacopeia Portuguesa IX* ed. 2009, Lisbon: Infarmed.
64. Gu, L., D.J. McClements, J. Li, Y. Su, Y. Yang, and J. Li, *Formulation of alginate/carrageenan microgels to encapsulate, protect and release immunoglobulins: Egg Yolk IgY*. Food Hydrocolloids, 2021. **112**: p. 1-11.
65. Li, X.-Y., L.-J. Jin, T.A. McAllister, K. Stanford, J.-Y. Xu, Y.-N. Lu, Y.-H. Zhen, Y.-X. Sun, and Y.-P. Xu, *Chitosan– alginate microcapsules for oral delivery of egg*

- yolk immunoglobulin (IgY)*. Journal of agricultural food chemistry, 2007. **55**(8): p. 2911-2917.
66. Li, X.-Y., L.-J. Jin, J.E. Uzonna, S.-Y. Li, J.-J. Liu, H.-Q. Li, Y.-N. Lu, Y.-H. Zhen, and Y.-P. Xu, *Chitosan–alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): in vivo evaluation in a pig model of enteric colibacillosis*. Veterinary immunology immunopathology, 2009. **129**(1-2): p. 132-136.
  67. Li, X.-Y., L.-J. Jin, Y.-N. Lu, Y.-H. Zhen, S.-Y. Li, L.-H. Wang, and Y.-P. Xu, *Chitosan–Alginate Microcapsules for Oral Delivery of Egg Yolk Immunoglobulin (IgY): Effects of Chitosan Concentration*. Applied biochemistry biotechnology, 2009. **159**(3): p. 778-787.
  68. Bakhshi, M., F. Ebrahimi, S. Nazarian, J. Zargan, F. Behzadi, and D.S. Gariz, *Nano-encapsulation of chicken immunoglobulin (IgY) in sodium alginate nanoparticles: In vitro characterization*. Biologicals, 2017. **49**: p. 7.
  69. fernande, T.a.b., *Desenvolvimento de processo de encapsulamento de anticorpos igy visando manutenção da viabilidade*, in *Departamento acadêmico de alimentos*. 2018, Universidade tecnológica federal do paraná. p. 52.
  70. Paques, J.P., E. van der Linden, C.J. van Rijn, and L.M. Sagis, *Preparation methods of alginate nanoparticles*. Advances in colloid interface science, 2014. **209**: p. 163-171.
  71. Xing, P., Y. Shi, C. Dong, H. Liu, Y. Cheng, J. Sun, D. Li, M. Li, K. Sun, and D. Feng, *Colon-targeted delivery of IgY against Clostridium difficile toxin A and B by encapsulation in chitosan-ca pectinate microbeads*. AAPS PharmSciTech, 2016. **18**(4): p. 1095-1103.
  72. Kovacs-Nolan, J. and Y. Mine, *Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y*. Journal of immunological methods, 2005. **296**(1-2): p. 199-209.
  73. Gujral, N., R. Löbenberg, M. Suresh, and H. Sunwoo, *In-vitro and in-vivo binding activity of chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY) against gliadin in food matrix*. Journal of agricultural food chemistry, 2012. **60**(12): p. 3166-3172.
  74. Shimizu, M., Y. Miwa, K. Hashimoto, and A. Goto, *Encapsulation of chicken egg yolk immunoglobulin G (IgY) by liposomes*. Bioscience, biotechnology and biochemistry, 1993. **57**(9): p. 1445-1449.

75. Shimizu, M. and Y. Nakane, *Encapsulation of biologically active proteins in a multiple emulsion*. Bioscience, biotechnology, biochemistry, 1995. **59**(3): p. 492-496.
76. Nielloud, F. and G. Marti-Mestres, *Pharmaceutical emulsions and suspensions*. 2000, New York: Marcel Dekker, Inc.
77. Rathore, A.S., *Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products*. Trends in biotechnology, 2009. **27**(9): p. 546-553.
78. Peterson, J.J. and K. Lief, *The ICH Q8 definition of design space: A comparison of the overlapping means and the Bayesian predictive approaches*. Statistics in Biopharmaceutical Research, 2010. **2**(2): p. 249-259.
79. Bhanushali, J., J. Gilbert, and L. McDougald, *Simple method to purify chicken immunoglobulin G*. Poultry science, 1994. **73**(7): p. 1158-1161.
80. Benita, S., *Microencapsulation: methods and industrial applications*. 2nd ed. Vol. 158. 2006, Israel: CRC Press.
81. FREIRE MARTINS, M.G., S.C. DA SILVABERNARDO, and J.M. DA COSTA E ARAÚJO PEREIRA COUTINHO, *PROCESSO PARA PURIFICAR UM ANTICORPO A PARTIR DA GEMA DE OVO, SEUS PRODUTOS E USOS*, S. internacional, Editor. 2020: Portugal. p. 26.
82. Damasceno, B., J. Silva, E. Oliveira, W. Silveira, I. Araújo, and A.G.d.E. Oliveira, *Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis*. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2011: p. 9-18.
83. Ryzak, M. and A. Bieganski, *Methodological aspects of determining soil particle-size distribution using the laser diffraction method*. Journal of Plant Nutrition Soil Science, 2011. **174**(4): p. 624-633.
84. Smith, P.e., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D. Klenk, *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
85. Hernandez-Campos, F.J., E. Brito-De la Fuente, and B. Torrestiana-Sanchez, *Purification of egg yolk immunoglobulin (IgY) by ultrafiltration: effect of pH, ionic strength, and membrane properties*. Journal of agricultural food chemistry, 2010. **58**(1): p. 187-193.

86. Mataumoto, S. and W. Kang, *Formation and applications of multiple emulsions*. Journal of Dispersion Science Andtechnology 1989. **10**(4-5): p. 455-482.
87. Danov, K.D., P.A. Kralchevsky, and I.B. Ivanov, *Dynamic processes in surfactant stabilized emulsions*, in *Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology*. 2001, Marcel Dekker: New York. p. 621-659.
88. Florence, A. and D. Whitehill, *Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions*. Journal of Colloid Interface Science, 1981. **79**(1): p. 243-256.
89. Dickinson, E. and R. Miller, *Food colloids: fundamentals of formulation*. Vol. 258. 2001, United Kingdom.
90. Håkansson, A., C. Trägårdh, and B. Bergenståhl, *Dynamic simulation of emulsion formation in a high pressure homogenizer*. Chemical Engineering Science, 2009. **64**(12): p. 2915-2925.
91. da Silva Santos, P.S., *Desenvolvimento e Caracterização de Microemulsões e Microemulgeles contendo Ibuprofeno*, in *Pharmaceutical department* 2015, University of Porto.
92. Zaia, D.A., C.T.B. Zaia, and J. Lichtig, *Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes*. Química nova, 1998. **21**(6): p. 787-793.
93. Tiwari, G., R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, and S.K. Bannerjee, *Drug delivery systems: An updated review*. International journal of pharmaceutical investigation, 2012. **2**(1): p. 2.
94. Gulati, N. and H. Gupta, *Parenteral drug delivery: a review*. Recent patents on drug delivery Formulation, 2011. **5**(2): p. 133-145.

## 5. Anexos

### 5.1. Anexo A.1. Curva de calibração por SE-HPLC

Na Figura A1.1 encontra-se a representação gráfica da curva de calibração e respectivos parâmetros para o cálculo da concentração de IgY por SE-HPLC.

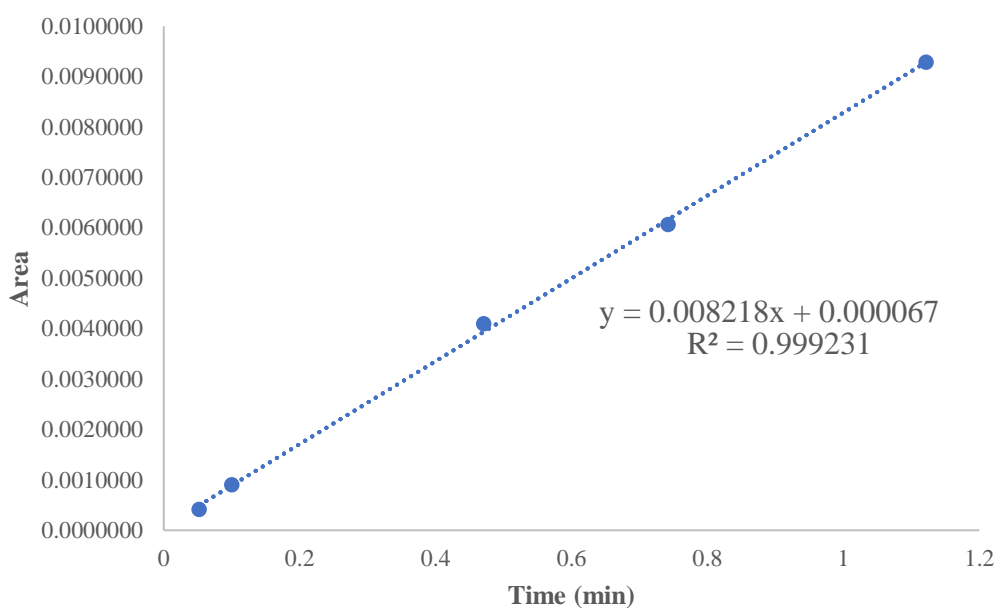
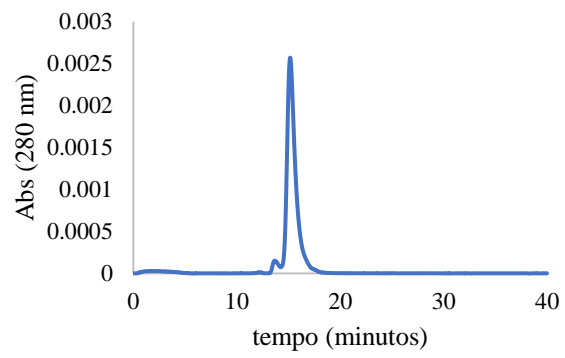
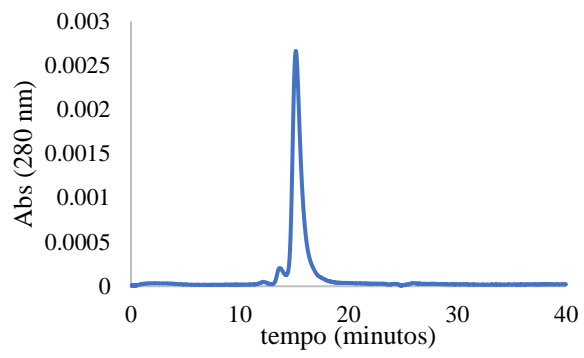


Figura A1.1- Curva de calibração de IgY por SE-HPLC.

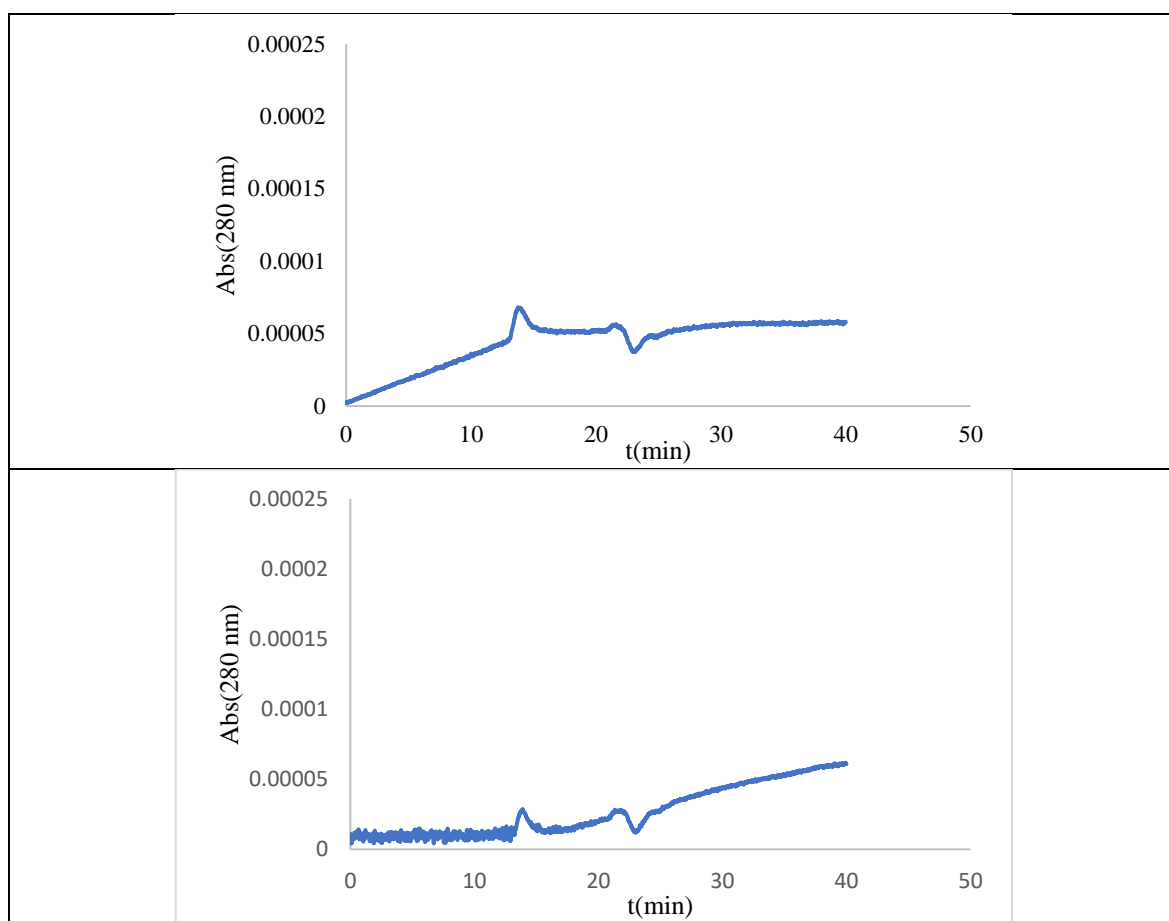
Na Figura A1.2 encontram-se os cromatogramas, relativos às replicas realizadas, para a quantificação da IgY após o método de extração e purificação da gema de ovo.



*Figura A1.2- Cromatogramas relativos às replicas para a quantificação de IgY por SE-HPLC.*

## 5.2. Anexo A.2. Quantificação de IgY por SE-HPLC e Método de Bradford

Na Figura A2.1 encontram-se exemplos de cromatogramas por SE-HPLC para as soluções após libertação de IgY. Na Tabela A2 encontram-se os valores de absorvância para as formulações com e sem IgY pelo método de Bradford.





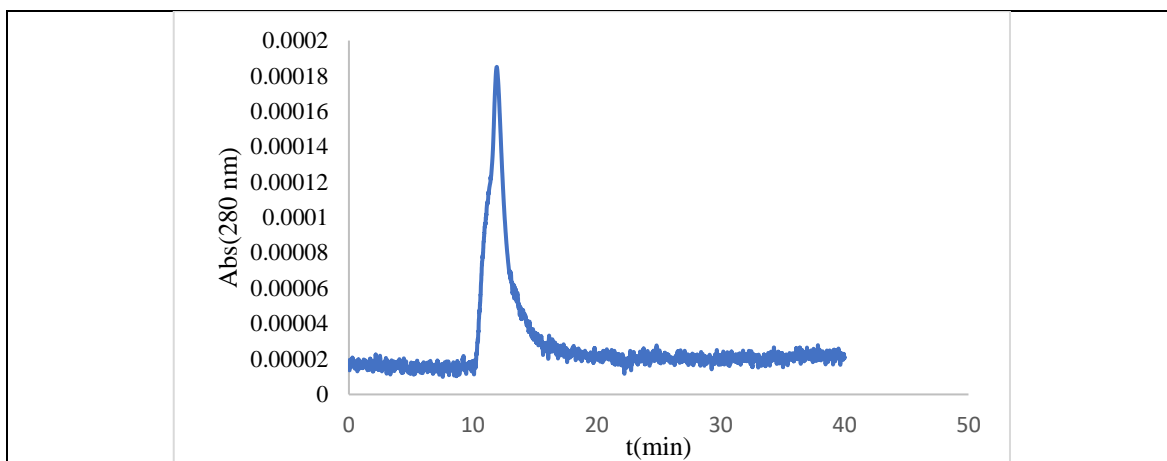


Figura A2.1- Cromatogramas de SE-HPLC para quantificação de IgY na microemulsão.

Tabela A2- Absorvâncias obtidas para formulação com e sem IgY pelo método de Bradford.

Absorvância					
Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
Formulação sem IgY	Formulação com IgY	Formulação sem IgY	Formulação com IgY	Formulação sem IgY	Formulação com IgY
0,6496	0,5007	0,5897	0,5574	0,6075	0,5984

### 5.3. Anexo A.3. Curva de Calibração por BCA

Na Figura A3.1 encontra-se a representação gráfica da curva de calibração e respectivos parâmetros para concentrações de IgY entre 20 µg/mL e 1000 µg/mL.

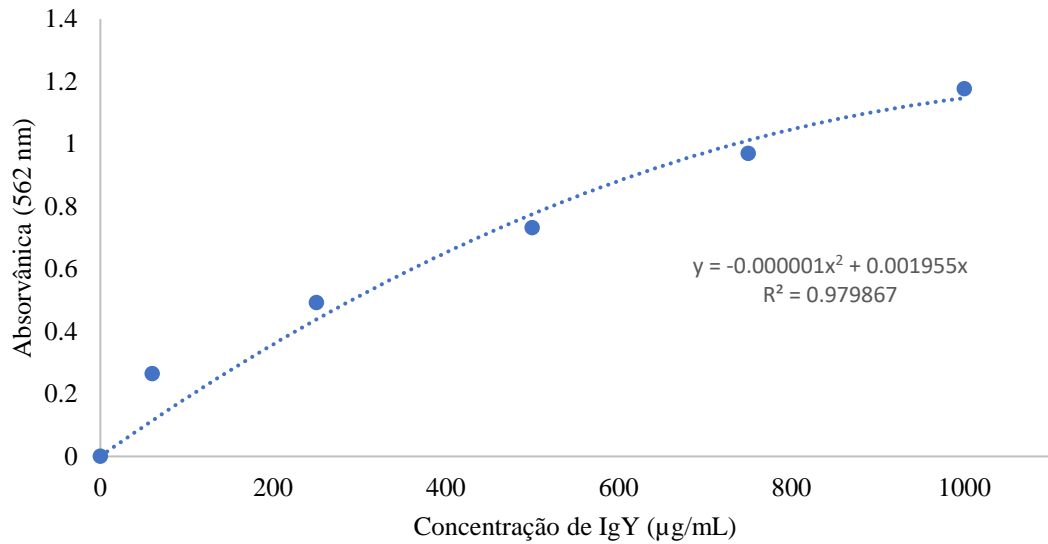


Figura A3.1- Curva de calibração de IgY segundo o método BCA.

## 5.4. Anexo A.4. Avaliação da integridade da IgY por SDS-PAGE

Na Figura A.4.1 e na Figura A.4.2 encontram-se os perfis obtidos por análise de SDS-PAGE. Na Figura A.4.1 os poços 1 e 2 correspondem às amostras recolhidas nos ensaios de eficácia e encapsulação, a partir da solução de tampão fosfato e solução NaCl 0,9% respetivamente. Os poços 5, 7 e 9 correspondem as amostras recolhidas com a microemulsão durante os ensaios de libertação aos 15, 30 e 60 minutos, respetivamente. Os poços 6 e 8 correspondem as amostras recolhidas com a solução de IgY 0,1% (m/m) durante os ensaios de libertação aos 15 e 30 minutos, respetivamente.

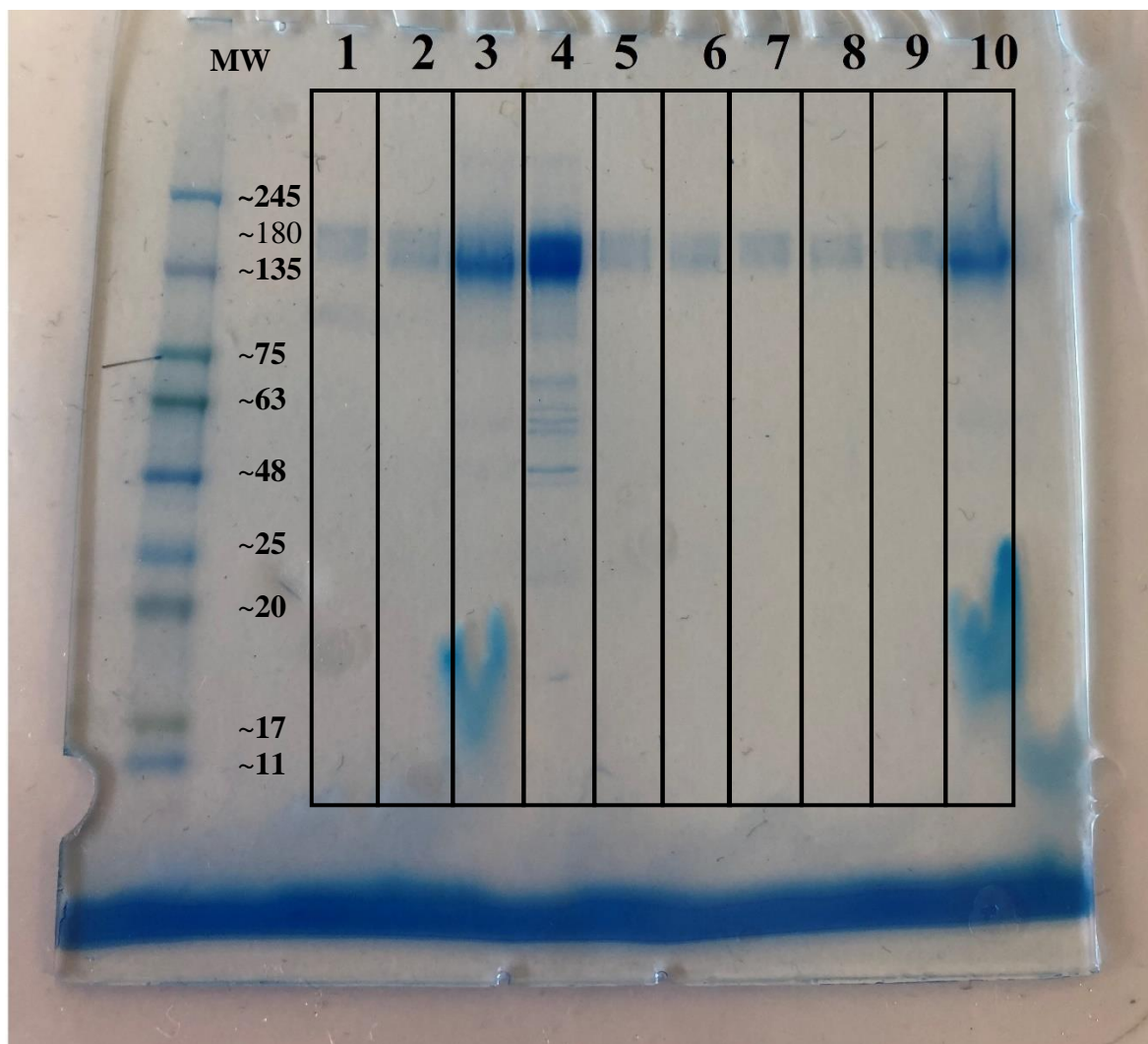
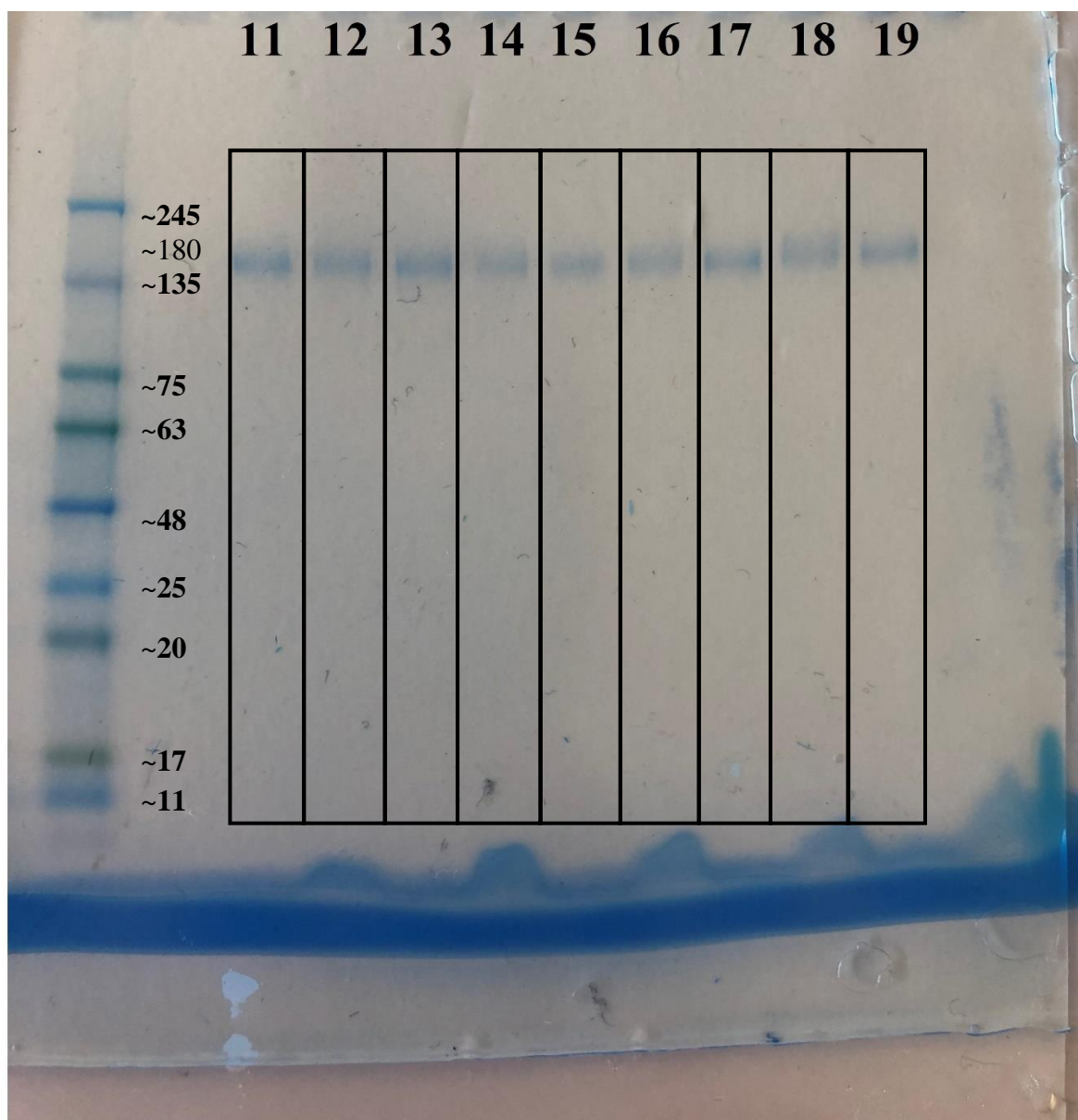


Figura A4.1- Perfis proteicos obtidos por SDS-PAGE, para ensaios de eficácia de libertação e após ensaios de libertação.

Na Figura A.4.2, os poços 12, 14, 16 e 18 correspondem às amostras recolhidas com a microemulsão durante os ensaios de libertação aos 120, 180, 240 e 300 minutos, respetivamente. Os poços 11, 13, 15, 17 e 19 correspondem às amostras recolhidas com a solução de IgY 0,1% (m/m) durante os ensaios de libertação aos minutos 60, 120, 180, 240 e 300 minutos, respetivamente.



*Figura A4.2- Perfis proteicos obtidos por SDS-PAGE após ensaios de libertação.*