

Tecnología de Encapsulación y su Aplicación en Ciencias Veterinarias.

Carolina Valenzuela V, Valesca Hernández G, Felipe Rodríguez S, Raúl Carrillo G.

Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias,
Universidad de Chile.

Avda. Santa Rosa 11.735, La Pintana, Casilla 2, correo 15, La Granja. Santiago, Chile.

Email: cvalenzuelav@u.uchile.cl.

Resumen

La microencapsulación es una tecnología de recubrimiento de materiales sólidos, líquidos o gases, en la cual se logra proteger los materiales activos, dirigirlos de manera controlada a su sitio de liberación, transformar el estado del activo para su mejor incorporación en diferentes matrices, entre otras ventajas. Mediante la encapsulación se pueden obtener diferentes tipos de preparados como liposomas, micro o nano partículas, esferas, y matrices principalmente. Entre los materiales utilizados como recubrimiento se encuentran biopolímeros como polisacáridos, proteínas, compuestos hidrofóbicos, y también polímeros artificiales. Esta técnica está revolucionando diferentes áreas del conocimiento, y para el caso particular de las ciencias veterinarias, la investigación se ha centrado principalmente en la nutrición animal, diagnósticos, administración de agentes terapéuticos, desarrollo de vacunas, y la reproducción, las cuales serán revisadas en el presente artículo.

Palabras clave: encapsulación, medicina veterinaria, nutrición, inmunidad, reproducción.

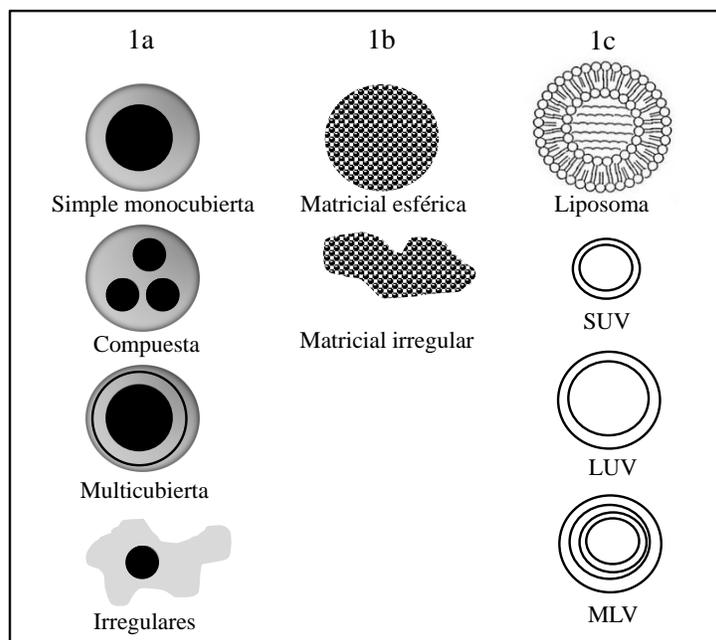
1. Introducción

La microencapsulación es una tecnología de recubrimiento utilizada para encapsular variados materiales activos, en diferentes estados físicos como sólidos, líquidos o gaseosos, que se introducen en una matriz de naturaleza polimérica formando micropartículas (Gibbs *et al.*, 1999; Desai y Park, 2005), de tamaños variables de nm a pocos mm (Fang y Bhandari, 2010). Por tanto, una micropartícula posee una estructura compuesta por dos elementos; el material encapsulado (núcleo, activo o fase interna) y el agente encapsulante (material pared o muralla), el cual también puede estar constituido por uno o más polímeros. Existen varios tipos de micropartículas como se muestran en la Figura 1: 1a) Microcápsulas, que presentan una definición marcada entre el núcleo y pared, y pueden ser simples (un núcleo) o compuestas (multinúcleos), o presentar monocubierta o multicubierta. 1b) Microesférulas, que son un sistema tipo matricial, en donde el activo se encuentra disperso o solubilizado en el interior de una matriz polimérica (Fang y Bhandari, 2010). Ambos tipos de micropartículas pueden presentar diferentes formas como se observa en la Figura 1. Finalmente en 1c) se muestran los liposomas, bastante utilizados en diversas áreas de las ciencias veterinarias, estos se caracterizan

por ser formaciones micelares a partir de bicapas de fosfolípidos, y según el método empleado en su preparación, pueden obtenerse desde pequeños liposomas unilamelares (SUV, *small unilamellar vesicles*), grandes (LUV, *larges unilamellar vesicles*), hasta liposomas compuestos por múltiples bicapas concéntricas (MLV, *multilamellar vesicles*).

Las ventajas de la microencapsulación han sido por una parte otorgar protección al material núcleo del medio ambiente, en particular de ciertas condiciones como: humedad, temperatura, pH, oxidación, luz, entre los principales factores, proteger algunos ingredientes sensibles como moléculas bioactivas (antioxidantes, pigmentos, aceites poliinsaturados, vitaminas, minerales, etc), células (vacunas, probióticos), medicamentos, entre otros (Wandrey *et al.*, 2009; Vos *et al.*, 2010). También provee liberación de los materiales activos de manera controlada y prolongada en el tiempo, a un sitio específico del organismo bajo ciertas condiciones (McClements y Lesmes, 2009). Además de lo anterior, la encapsulación se puede aplicar para modificar las características físicas de los material activos con el fin de permitir un manejo más sencillo, ayudar a separar los componentes de una mezcla para evitar que reaccionen unos con otros, y proporcionar una concentración adecuada y dispersión uniforme de un agente activo (Desai y Park, 2005).

Figura 1. Diferentes tipos de micropartículas y liposomas.



En relación a los materiales encapsulantes los criterios más importantes para su selección son la funcionalidad que deben proporcionar al producto final, que sean capaces de formar una barrera protectora, y ser inocuos, estables, biodegradables y de bajo costo (Fang y Bhandari, 2010). Los agentes encapsulantes utilizados son muy variados desde biopolímeros a polímeros sintéticos o copolímeros (Patel *et al.*, 2010). Dentro de los primeros, que a su vez son los más usados, se mencionan polisacáridos (almidones, maltodextrinas, quitosanos, alginatos, celulosas, gomas etc.) (Huang *et al.*, 2010; Sarkar *et al.*, 2013), proteínas (gluten, caseínas, gelatina, albúminas etc.) (Nesterenko *et al.*, 2013), lípidos (ceras, ácidos grasos, parafinas, diglicéridos, fosfolípidos etc.) (McClements *et al.*, 2007; Fang y Bhandari, 2010). Las principales ventajas de los polisacáridos son su buena solubilidad en agua, que aportan viscosidad y capacidad formadora de películas. A menudo, los hidratos de carbono se mezclan con proteínas para mejorar las propiedades emulsionantes. Los materiales lipídicos proveen buenas barreras al vapor de agua y transporte en medios liposolubles (Fang y Bhandari, 2010). Los polímeros sintéticos son derivados del petróleo como poliestirenos, poliamidas, poliuretanos, poliacrilatos, polímeros fenólicos y polietilenglicoles (Dubey *et al.*, 2009).

Hay una serie de técnicas disponibles para la encapsulación de materiales activos, entre los cuales se mencionan métodos físicos: coextrusión, secado por aspersión, disco rotatorio, lecho fluido; y fisicoquímicos: polimerización *in situ*, precipitación, evaporación del solvente, polimerización interfacial, coacervación simple y compleja, atrapamiento en liposomas y gelación iónica (Gouin, 2004; Zuidam y Heinrich, 2009). Sin embargo, las más utilizadas son secado por aspersión “*spray drying*”, liposomas, y extrusión (Gouin, 2004). La selección del proceso de encapsulación para una aplicación considera el tamaño de la partícula requerida, las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material encapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo de producción.

La encapsulación se ha desarrollado bastante en las últimas décadas y tiene diferentes aplicaciones en la industria alimenticia, ciencias biomédicas, ingeniería, y cosmética, así como en la agricultura y ciencias veterinarias. Esta última se revisó en este artículo. En la Tabla 1 se presenta un resumen de las aplicaciones de la tecnología de encapsulación en cuatro áreas prioritarias de la producción animal, en las cuales se ha generado su mayor desarrollo, siendo la nutrición animal, medicina enfatizando el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, inmunidad, y reproducción.

Tabla 1: Resumen de aplicaciones de la tecnología de encapsulación en diferentes áreas de las ciencias veterinarias.

Aplicaciones en nutrición			
Autor (es)	Tipo de micropartícula	Material activo	Uso/efecto
Bontempo <i>et al.</i> (2000)	Liposomas	α -tocoferol	Suplementación oral para cerdos
Wang <i>et al.</i> (2009)	Nanocompuestos	Cromo	Suplementación oral para cerdos
Wang <i>et al.</i> (2011)	Nanopartículas	Cobre	Suplementación oral para pollos broiler
Sacadura <i>et al.</i> (2008)	Micropartículas	Vitaminas (B)	Suplementación oral para bovinos de leche
Garrett <i>et al.</i> (2005a)	Micropartículas	B ₁ , C y K ₃	Elaboración de premix para raciones animales
Piepenbrink y Overton (2003) Hartwell <i>et al.</i> (2000)	Diferentes tipos de micropartículas	Colina	Suplementación oral para bovinos
Marchetti <i>et al.</i> (1995)	Micropartículas	Vitaminas E y C	Suplementación oral para bovinos
Marchetti <i>et al.</i> (1999)	Micropartículas	Vitaminas	Dietas de peces

Huntington <i>et al.</i> (2006), Xin <i>et al.</i> (2010), Taylor-Edwards <i>et al.</i> (2009)	Microcápsulas y micropartículas	Urea	Suplementación oral para bovinos
Mowat y Deelstra (1972), Mata <i>et al.</i> (1995), Wiese <i>et al.</i> (2003)	Microesferas y micropartículas	Metionina	Suplementación oral para corderos
Vandenberg <i>et al.</i> (2011)	Micropartículas	Fitasa	Suplementación oral para trucha arcoiris
Collins <i>et al.</i> (2011)	Liposomas	Aceite de linaza	Suplementación oral para trucha arcoiris
Perfield <i>et al.</i> (2004)	Liposomas	Ácido linoleico conjugado	Suplementación oral para rumiantes
Soto <i>et al.</i> (2011)	Macrocapsulas	Probióticos	Suplementación oral para rumiantes
Yuan <i>et al.</i> (2013)	Liposomas	Hierro	Suplementación para roedores
Aplicaciones en medicina veterinaria			
Autor (es)	Tipo de micropartícula	Material activo	Efecto
Fattal <i>et al.</i> (1991)	Nanopartículas	Ampicilina	Disminuye infección en ratones por listeriosis y salmonelosis
Poirier <i>et al.</i> (2002)	Liposomas	Doxorrubicina	Tratamiento de sarcoma en gatos
Weiss <i>et al.</i> (1993)	Liposomas	Ribavirina	Tratamiento de peritonitis infecciosa felina
MacLeod and Prescott (1988)	Liposomas	Gentamicina	Tratamiento de mastitis en bovinos
Lynn <i>et al.</i> (2004)	Liposomas	Diclofenaco	Analgesia en bovinos
Boscan <i>et al.</i> (2010)	Microemulsión	Propofol	Anestesia en equinos
Klei <i>et al.</i> (1984)	Microemulsión	Ivermectina	Tratamiento de <i>Strongylus vulgaris</i> en equinos
Marques <i>et al.</i> (2008)	Liposomas	Trifluralina	Tratamiento de leishmaniosis en caninos
Aplicaciones en vacunas			
Autor (es)	Tipo de micropartícula	Vía de administración	Enfermedad o agente/especie
Cubillos <i>et al.</i> (2008)	Dendrímero	IM	Fiebre aftosa/cerdos
Greenwood <i>et al.</i> (2008)	Nanoperlas	Intradérmico	Fiebre aftosa/ovinos
Vandamme <i>et al.</i> (2011)	Nanopartículas	Oral	Vacuna contra fimbrias de <i>E. coli</i> /cerdos
Florindo <i>et al.</i> (2009)	Nanoesferas	Intranasal	Vacuna contra <i>Streptococcus equi</i> /equinos
Cauchard <i>et al.</i> (2006)	Nanopartículas	IM	Vacuna contra <i>Rhodococcus equi</i> /equinos
Hiszczynska <i>et al.</i> (2011)	Liposoma	IM	Vacuna contra <i>Toxoplasma gondii</i> /equinos
Usui <i>et al.</i> (2003)	Liposoma	IM	Leucemia bovina/ovinos
Amorena <i>et al.</i> (1994)	Liposoma	IM	Mastitis estafilocócica/ovinos
Zhang <i>et al.</i> (2010)	Nanoesferas	IM	Enfermedad de Newcastle/ovinos
Yaguchi <i>et al.</i> (2009)	Liposoma	Intraocular	Colibacilosis/aves de corral
Li <i>et al.</i> (2004)	Liposoma	Intraocular	Vacuna contra <i>Salmonella enteritidis</i> /aves de corral

Barbour y Newman (1990)	Liposoma	Subcutánea	Vacuna contra <i>M. gallisepticum</i> /gallinas de postura
Aplicaciones en reproducción			
Autor (es)	Tipo de micropartícula	Material activo	Uso
Ghidoni <i>et al.</i> (2008)	Micropartículas	Espermatozoides	Conservación de semen/porcino, bovino, ovino, canino y humano
Weber <i>et al.</i> (2006)	Micropartículas	Espermatozoides	Aumento de fertilidad/hembras bovinas
Shah <i>et al.</i> (2010)	Micropartícula de alginato y Poli-L-lisina	Espermatozoides	Mantenimiento de viabilidad y motilidad/roedores
Röpke <i>et al.</i> (2011)	Liposomas	Espermatozoides	Estabilidad espermática/bovinos
Kreeger <i>et al.</i> (2005)	Micropartículas	Ovocitos	Mantenimiento y maduración ovocitaria/roedores
Krentz <i>et al.</i> (1993)	Micropartículas	Embriones	Cultivo y obtención/roedores

2. Desarrollo

2.1. Microencapsulación y nutrición animal

La industria de la nutrición animal ha incorporado en sus procesos la tecnología de microencapsulación como se presenta en la Tabla 1. La aplicación de esta técnica, representa una potencial herramienta para mejorar la salud animal y asegurar una adecuada calidad biológica de los productos destinados al consumo humano. En nutrición la encapsulación es una técnica seleccionada por variados motivos: (1) puede proteger el material núcleo de su degradación, oxidación, disminución de su actividad específica, lixiviación, o la degradación bacteriana durante su almacenamiento en un alimento obteniendo productos alimenticios con mejores características sensoriales y nutricionales. Como también aumentar la estabilidad de ciertas sustancias bioactivas durante el procesamiento. (2) Genera reducción de su reactividad con el ambiente durante el paso por el aparato gastrointestinal en animales no-rumiantes y una especie de *bypass* ruminal para animales rumiantes, incrementando la biodisponibilidad de algunos activos.

(3) Las características físicas del activo pueden ser modificadas, por ejemplo pudiendo pasar de líquidos a sólidos con la utilización de secado por aspersión o liofilización, lo que facilita su incorporación en suplementos, dietas, y raciones (por ejemplo, reducción del polvo de las formulaciones, mejorar la formulación de compuestos incompatibles). También incrementa la aceptabilidad, palatabilidad y consumo de alimentos concentrados para animales. (4) Se puede utilizar también para controlar la liberación de una sustancia, de forma de entregarla a un sitio específico en el tracto gastrointestinal para que ejerza su acción. (5) Algunas propiedades sensoriales de los materiales núcleo se pueden enmascarar evitando cambios organolépticos en los alimentos. La microencapsulación ha permitido en el área de la nutrición la entrega de moléculas bioactivas de rápida degradación como: antioxidantes, minerales, vitaminas, fitosteroles, luteína, ácidos grasos, licopeno, prebióticos, aminoácidos, enzimas entre otras, y de células vivas como probióticos, a través de los alimentos, agua de bebida o suplementación oral, cuyo principal objetivo es la protección de estas moléculas y células, como también la entrega

controlada a un sitio específico del tracto gastrointestinal (Augustin y Hemar, 2009; Betoret *et al.*, 2011; Nedovic *et al.*, 2011).

Para el caso de las vitaminas la razón más común para su encapsulación es extender su vida útil, evitando en parte su oxidación y reacciones con otros compuestos de la dieta como minerales traza u otras vitaminas que disminuyen su biodisponibilidad (Marchetti *et al.*, 1995). También las protege de los daños causados por el calor y el vapor en variados procesos tecnológicos como el de extrusión (Li *et al.*, 1996). Las vitaminas más susceptibles a la pérdida de actividad durante la fabricación de alimentos son el ácido ascórbico (vitamina C), ácido fólico (B₉) y piridoxina (B₆) (Marchetti *et al.*, 1999). Una segunda razón para encapsular vitaminas es evitar su degradación en el rumen por las bacterias ruminales (Sacadura *et al.*, 2008), principalmente colina, niacina (B₃), ácido fólico (B₉) y riboflavina (B₂) (Santschi *et al.*, 2005). La mayoría de la investigación con vitaminas encapsuladas se ha centrado en la colina y vitamina C. La vitamina C es sensible al calor, humedad y la luz, y durante la fabricación de alimentos para animales y su almacenamiento la forma cristalina de la vitamina C se somete a oxidación intensa, generando pérdidas entre un 70 a 80% de la actividad original. Además es degradada en el rumen por las bacterias ruminales. Algunos trabajos en los cuales, se encapsuló vitamina C sugieren que los terneros de carne y leche responden eficientemente a su suplementación (Cusack *et al.*, 2005, Garrett *et al.*, 2005a). Para el caso de la colina se han realizado varios estudios, los que han determinado que la encapsulación de esta vitamina tiene efectos positivos sobre reproducción, función hepática y producción láctea (Hartwell *et al.*, 2000; Piepenbrink y Overton, 2003).

En relación a algunos minerales que presentan baja biodisponibilidad debido a su alto nivel de interacción durante el paso por el tracto gastrointestinal o por algunos factores intraluminales que afectan su absorción como es el caso del cobre, zinc, calcio y hierro, éstos al ser encapsulados aumentan significativamente su biodisponibilidad (Wang *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2013).

Otro compuesto bastante estudiado en nutrición de rumiantes es la urea encapsulada o también denominada urea protegida, debido a la lenta liberación del amoníaco en el rumen que genera, disminuyendo las altas concentraciones postprandiales de este compuesto, que conducen a su ineficiente utilización por microorganismos ruminales, y el aumento de su absorción a nivel ruminal, que puede terminar en cuadros de intoxicación por urea. Por otra parte, también tiene la ventaja de disminuir las emisiones de amoníaco al medio ambiente (Huntington *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2010). Actualmente existen productos en el mercado de urea protegida con poliuretano (Xin *et al.*, 2010), y encapsulada con polímeros naturales (Taylor-Edwards *et al.*, 2009). Algunos productos comercializados son Rumapro® y Optigen®.

Los aminoácidos también han sido foco de estudios de encapsulación desde hace varias décadas, siendo los aminoácidos azufrados y la lisina los más estudiados, por ser considerados como aminoácidos limitantes en las dietas de animales productivos (Rossi *et al.*, 2003). Algunos autores han demostrado que la encapsulación de metionina con caolín es exitosa en términos productivos en rumiantes (Sibbald *et al.*, 1967), y corderos (Mowat y Deelstra, 1972). En corderos también se reportó que si bien la suplementación con metionina no generó efectos en parámetros

productivos, esta produjo una reducción de la grasa del lomo (*Longissimus dorsi*) (Wiese *et al.*, 2003). La encapsulación de aminoácidos azufrados también ha sido probada para la producción de animales que generan lana o pelo (ovejas, cabras y conejos de Angora), los cuales presentaron un aumento de la producción de fibra post-suplementación (McGregor y Hodge, 1989; Mata *et al.*, 1995). La encapsulación de lisina ha generado productos como lisina protegida y también ha sido investigada por varios autores, quienes reportaron beneficios productivos en ganado (Oke *et al.*, 1986; Williams *et al.*, 1999).

La encapsulación de ácidos grasos ha generado gran interés principalmente debido a la disminución de la oxidación y mejora de la estabilidad de los ácidos grasos poliinsaturados. Aceites de pescado ricos en ácidos grasos insaturados y omega-3 se han microencapsulado y se comercializan actualmente en los EE.UU., Europa, Israel y Australia para alimentación animal (Ackman, 2006). En el caso de animales rumiantes se ha logrado la protección de los ácidos grasos de la hidrogenación en el rumen a través de la encapsulación del ácido linoleico conjugado (CLA) (Perfield *et al.*, 2004). Collins *et al.* (2011) encapsularon aceite de linaza para aumentar su estabilidad en dietas para peces, reportando una mejor aceptación de los filetes de trucha por los panelistas al análisis sensorial.

La técnica de microencapsulación también ha sido aplicada a la encapsulación de enzimas térmicamente inestables, lo que resulta en la pérdida de actividad a temperaturas de procesamiento de $> 80^{\circ}\text{C}$, que se incluyen en las dietas de los animales productivos para mejorar la biodisponibilidad de ciertos nutrientes como fósforo fítico y oligosacáridos (Heijal-Segal *et al.*, 1995; Vandenberg *et al.*, 2011).

La encapsulación se está implementando actualmente para mantener la viabilidad de las bacterias probióticas. Esto consiste en retener los microorganismos dentro de una matriz polimérica o una membrana semipermeable (Dembezynski y Jankowski, 2002). El revestimiento aumenta la supervivencia de las células mediante la protección de los efectos adversos de las bacterias del medio ambiente, disminuyendo la competencia (Doleyres y Lacroix, 2005), y también protege de los daños causados por los procesos como el secado de las micropartículas para su almacenamiento. Además la microencapsulación proporciona ventajas tales como una mayor resistencia a las condiciones gástricas e intestinales simuladas *in vitro* (Lian *et al.*, 2003). Los probióticos encapsulados pueden ser entregados en dietas convencionales, agua de bebida o como suplementación por medio de alimentos funcionales, en la alimentación de distintas especies productivas (Soto *et al.*, 2009; Soto *et al.*, 2011), con lo que se fortalece la flora intestinal benéfica como *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., en detrimento del desarrollo de una microbiota patógena oportunista fortaleciendo la inmunidad del sistema digestivo, otorgando un mejor desempeño productivo y la retención de nutrientes (Shim *et al.*, 2010; Baffoni *et al.*, 2012).

2.2. Microencapsulación en medicina veterinaria

El desarrollo y la aplicación de la tecnología de encapsulación en la medicina veterinaria se ha estudiado a dos niveles principalmente: diagnóstico y en tratamientos médicos, las cuales se describen a continuación.

2.2.1. Diagnóstico

En los últimos años se han realizado varias investigaciones para desarrollar sistemas basados en la encapsulación, principalmente del tipo nanopartículas, con el objetivo de la identificación subclínica de una determinada enfermedad. El diagnóstico basado en nanopartículas *in vivo* se ha realizado a través de imágenes de alta resolución, en donde ha sido posible detectar pequeños agregados de células atípicas dentro de un organismo, y revelar tejidos patológicos mediante la entrega pasiva de diversos ligandos como anticuerpos, péptidos, polisacáridos, entre otros, que se dirigen a un tipo de célula determinado (Underwood y Eps, 2012). También algunos nanocompuestos, tales como nanopartículas de oro y de perfluorocarbono, tienen propiedades innatas de formación de imágenes, mientras que otros como liposomas pueden ser usados como agentes de contraste de imágenes para permitir detección de tejidos patológicos (Matteucci y Thrall, 2000; Bentolila *et al.*, 2009).

El uso de las nanopartículas en diagnóstico veterinario es reciente y son necesarias más investigaciones, sin embargo, en la actualidad existen varios tipos de nanopartículas desarrolladas como sistemas de detección temprano de enfermedades provocadas por patógenos y neoplasias en el sector veterinario (Kumanan *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009). Un ejemplo es la encapsulación de Tecnecio-99m utilizado en medicina nuclear para la obtención de imágenes de sarcoma de gatos y también en equinos (Matteucci y Thrall, 2000).

2.4.3. Tratamientos

En el área de la medicina la encapsulación ha despertado gran interés respecto del tratamiento de ciertas patologías relacionándose con la biodisponibilidad y farmacocinética de algunas terapias farmacológicas. Micro y nanopartículas se han utilizado ampliamente en los sistemas de administración de fármacos, incluso ya están disponibles en el mercado veterinario, y cada vez se van haciendo más asequibles para su aplicación y comercialización. Las micro y nanopartículas mejoran el índice terapéutico de los productos farmacéuticos a través de los siguientes mecanismos: la encapsulación confiere solubilidad y estabilidad a los fármacos, aumenta la concentración de fármacos en su sitio blanco de acción, lo que resulta en un aumento de la eficacia, reducen la toxicidad sistémica y la concentración del fármaco en los tejidos sanos, y proporcionan una forma de liberación controlada y sostenida durante días a semanas (Sahoo y Labhasetwar, 2003). En la Tabla 1 se presentan algunas de las aplicaciones de la nanoencapsulación. Esta tecnología se ha utilizado en la administración de fármacos en terapias contra diferentes tipos de cáncer como: adenocarcinomas, fibrosarcomas, osteosarcomas, metástasis, hemangiosarcoma, neoplasias pulmonares, melanomas, y de infecciones producidas por virus (fiebre aftosa), bacterias (*Brucella*, *Salmonella*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *S. aureus*, *E. coli*), hongos (candidiasis), protozoos (leishmaniasis, babesiosis) e incluso parásitos (*Strongylus vulgaris*), y también para la vehiculización de anestésicos y analgésicos (Iriache *et al.*, 2011; Underwood y Eps, 2012).

La propiedad de liberación prolongada del contenido de las micropartículas, en el campo de la medicina

veterinaria genera grandes expectativas en términos de terapia antibiótica (Barba *et al.*, 2012), en donde muchas veces las condiciones naturales de una especie animal dificultan la aplicación reiterada de un fármaco. De esta manera se ha reportado la utilización de ceftiofur encapsulado para terapia de secado en bovinos de lechería, y de oxitetraciclina para terapia prolongada, contra algunas infecciones. Una patología grave que se presenta en vacunos y equinos es la artritis séptica, y el tratamiento mediante artrocentesis con aplicación reiterada de antibióticos y antiinflamatorios en la zona afectada, puede generar mayores daños. Una solución prometedora es el uso de implantes de polímeros sintéticos impregnados con una mezcla de antibióticos en la articulación, incluso pruebas *in vivo* han dado excelentes resultados; sin embargo, condiciones externas tales como la anestesia para la aplicación/retiro de las micropartículas y alteraciones en los períodos de resguardo para el consumo de aquellos animales, dificulta su uso (Haerdi-Landerer *et al.*, 2010).

Por otra parte, la búsqueda de tratamientos que otorguen una cura definitiva o prolongada a patologías altamente prevalentes a nivel mundial como la diabetes mellitus tipo 1, han utilizado esferas de alginato como medio encapsulante de células pancreáticas de cerdo, y han sido evaluadas en modelo rata y cerdo, mediante injertos subcutáneos, los cuales han logrado buenos resultados estabilizando la glucosa sanguínea en un período de entre treinta días a seis meses (Gianello y Dufrane, 2007).

2.3. Microencapsulación e inmunidad animal

La encapsulación se ha aplicado intensivamente con fines de inmunización frente a enfermedades. De esta forma, su uso para generar vacunas representa un alto

potencial debido a la propiedad de liberación controlada de un antígeno a través del tiempo (Murillo *et al.*, 2002), gracias a esto una sola aplicación otorgaría una inmunidad prolongada (Arenas-Gamboa *et al.*, 2008). Además de la posibilidad de generar nuevos adyuvantes mediante nanotecnología que pueden ser diseñados para una dosificación con reducida frecuencia a través de una vía de administración conveniente con el fin de provocar una respuesta inmune específica, por ejemplo, inmunidad mucosa, lo que trae bastantes ventajas a la medicina veterinaria, ya que generalmente las vacunas se deben aplicar a un gran número de animales, o cuando la vacunación por medios convencionales es un inconveniente debido a la mala gestión o accesibilidad (animales silvestres) (Underwood y Eps, 2012). Algunos adyuvantes nanométricos aprobados para su uso veterinario incluyen emulsiones, liposomas, complejos inmunoestimulantes, y nanopartículas inertes (Scheerlinck *et al.*, 2006; Vandamme *et al.*, 2011). Por otra parte, la encapsulación ha permitido generar vacunas en base a proteínas recombinantes virales, evitando el uso de virus completos que tienen algunos inconvenientes graves, como la posibilidad de infección accidental antes de la inactivación, la reversión de inactivación de la mutación y, en el caso de los virus atenuados, el potencial de causar daños en los individuos inmunocomprometidos (Scheerlinck y Greenwood, 2008). Actualmente el control de enfermedades en animales a través del uso de vacunas elaboradas con la tecnología de encapsulación se encuentra bastante diversificada y ha colaborado con el control de más de 40 patologías.

Por otra parte, la industria farmacéutica ha logrado elaborar micropartículas con funciones específicas tisulares o celulares en base a inmunoliposomas, que corresponden a micro-empaquetamientos en bicapas

fosfolípidicas semipermeables unidas a anticuerpos o sus fragmentos, que promueven la unión con antígenos específicos, y mejora la respuesta inmune, promoviendo una mayor actividad de células dendríticas y linfocitos T (Copland *et al.*, 2003). Así mismo, se ha corroborado por investigaciones realizadas en ratas, que la encapsulación de complejos citoquinas-ciclodextrinas con geles liposomales a nano escala, han permitido retrasar el crecimiento de tumores gracias a liberaciones sostenidas y específicas de IL-2 que actúa como inhibidor del factor de crecimiento transformante- β (FGF- β); además, de potenciar la acción de células natural killer, CD8⁺ y linfocitos T en el microambiente tumoral (Park *et al.*, 2012).

También existen formulaciones de micropartículas, también llamadas esferas o perlas, en base a copolímeros como el alginato de sodio (Barba *et al.*, 2012), su origen natural derivado de algas pardas le confieren características tales como elevada biocompatibilidad e inocuidad; además su capacidad gelificante permite que al interactuar con cationes divalentes se formen matrices con permeabilidad selectiva gracias a sus cualidades fisicoquímicas, permitiendo o inhibiendo el intercambio de moléculas como inmunoglobulinas G (Capone *et al.*, 2013). Estas cualidades han sido utilizadas para disminuir reacciones adversas generadas a partir del sistema inmune post-trasplantes; lo que se demostró en ensayos en ratas, a las cuales se les implantaron vía subcutánea células hepáticas (HepG2/C3A) encapsuladas en esferas de alginato-Ca⁺² en combinación con colágeno tipo I, regulando la respuesta inflamatoria (Ghidoni *et al.*, 2008; Capone *et al.*, 2013).

Mediante el uso de la encapsulación ha sido posible evitar el rechazo que genera la interacción celular en el huésped. Un factor descrito en la mayoría de los mamíferos que se encuentra presente en las reacciones hiperagudas de rechazo a injertos celulares o tisulares, es la presencia de α -Gal un sacárido que actúa como antígeno de membrana celular, el que es posible de manejar mediante esta biotecnología (Krishnamurthy y Gimi, 2011).

2.4. Microencapsulación en reproducción

La creciente utilización de biotecnologías reproductivas en medicina veterinaria, ha hecho necesaria una constante revisión y perfeccionamiento de los métodos y técnicas de su aplicación. La inseminación artificial (IA) es utilizada en prácticamente todos los sectores pecuarios. Sin embargo, en producción bovina, esta técnica presenta desventajas considerables en la supervivencia espermática y por ende sobre las tasas de fecundación y fertilidad (Weber *et al.*, 2006). En este ámbito se ha incorporado la técnica de encapsulación para la conservación de semen, que consiste en el recubrimiento de células espermáticas con una membrana polimérica semi-permeable (Rathore *et al.*, 2013). La biotecnología de microencapsulación espermática ha sido probada con éxito en la especie porcina, bovina, ovina, canina y humana (Tabla 1), y la principal ventaja descrita se encuentra un mayor tiempo de conservación del semen, el cual mantiene sus características y viabilidad (Ghidoni *et al.*, 2008). Una de las principales ventajas del semen encapsulado es que permite una liberación controlada de los espermatozoides en el útero, alcanzando mayores concentraciones de espermatozoides (Ghidoni *et al.*, 2008), mayor adhesión endometrial, otorgando tiempo para una óptima maduración espermática, prolongando

el período de fertilización competitiva; característica de gran relevancia para poder aumentar la fertilidad en hembras con estros prolongados o de difícil detección (Weber *et al.*, 2006). Además, de evitar la ocurrencia de desplazamientos retrógrados y la fagocitosis de los espermatozoides por los macrófagos (Weber *et al.*, 2006). La elaboración de las micropartículas con fines de conservación de semen y mantención de la viabilidad y motilidad progresiva de los espermatozoides basada en la utilización de alginato de sodio al 1% y Poli-L-lisina como material de recubrimiento, resultan la composición que ha logrado mejores resultados (Shah *et al.*, 2010). Así también se ha descrito que espermatozoides microencapsulados en alginato disuelto en sales de bario mejoran su viabilidad en condiciones estáticas (Ghidoni *et al.*, 2008). Otro material altamente demandado en microencapsulados de semen bovino, son los liposomas, gracias a su elevada criostabilidad dada por la interacción entre las regiones cargadas de los grupos fosfatidilglicerol de estos y las membranas espermáticas, coexistiendo un intercambio de colesterol y lípidos entre ambos (Röpke *et al.*, 2011).

Otros avances importantes en reproducción se relacionan con la confección de los sistemas para la maduración de ovocitos y la fecundación *in vitro* en hembras mamíferas. En ratas, por ejemplo a través del co-cultivo tridimensional que ofrecen los microencapsulados de ovocitos y células del cúmulo enriqueciendo el medio con hormona folículo estimulante, se ha facilitado el manejo y obtención de ovocitos en distintas etapas de maduración (Kreeger *et al.*, 2005). Además, la progenie obtenida mediante fecundación con esta biotecnología ha demostrado ser viable.

Continuando con las aplicaciones en el área reproductiva, estudios *in vitro* en ratones prueban la viabilidad de cultivar en micropartículas embriones, mejorando también los índices de gestación con su aplicación en fecundaciones asistidas. El cultivo de células en estado de mórula en polímeros sintéticos como el alginato o poli-L-lisina, optimiza el ambiente extracelular para la maduración y desarrollo de los embriones (Krentz *et al.*, 1993).

3. Conclusiones

La microencapsulación es una tecnología que permite mejorar las características, ya sea física, química y/o biológica de una sustancia activa, además, provee protección y facilita la vehiculización de la misma. Gracias a las ventajas que posee esta tecnología, se ha investigado su utilización en el desarrollo de variadas aplicaciones para las distintas áreas veterinarias con muy buenos resultados. Estos hechos demuestran el potencial de la microencapsulación, el cual, puede ser aprovechado en el desarrollo de aplicaciones futuras que solucionen o faciliten algunos desafíos a los cuales se enfrentan los diferentes ámbitos en la medicina veterinaria actual.

Agradecimientos: A los proyectos de investigación FIV DI-FAVET, Programa de Inserción de Capital Humano en la Academia 7912010043, y Proyecto U-INICIA VID.

4. Referencias

1. Ackman, R. 2006. Marine lipids and omega-3 fatty acids. In: Akoh, C (Ed.). Handbook of Functional Lipids. CRC Press; Taylor and Francis Group. Florida, EE.UU. p. 311-324.
2. Amorena, B.; Baselga, R.; Albizu, I. 1994. Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. *Vaccine* 12(3), 243-249.
3. Arenas-Gamboa, A.; Ficht, T.; Kahl-Mcdonagh, M.; Rice-Ficht, A. 2008. Immunization with a single dose of a microencapsulated *brucella melitensis* mutant enhances protection against wild-type challenge. *Infect. Immun.* 76(6), 2448-2455.
4. Augustin, M.; Hemar, Y. 2009. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chem. Soc. Rev.* 38(4), 902-912.
5. Baffoni, L.; Gaggia, F.; Di Gioia, D.; Santini, C.; Mogna, L.; Biavati, B. 2012. A Bifidobacterium-based synbiotic product to reduce the transmission of *C. jejuni* along the poultry food chain. *Int. J. Food Microbiol.* 157(2), 156-161.
6. Barbour, E.; Newman, J. 1990. Preliminary data on efficacy of *Mycoplasma gallisepticum* vaccines containing different adjuvants in laying hens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 26(2), 115-123.
7. Barba, A.; Dalmoro, A.; D'Amore, M. 2012. An engineering approach to biomedical sciences: advanced strategies in drug delivery systems production. *Transl. Med. UniSa.* 4, 3-11.
8. Bentolila, L.; Ebenstein, Y.; Weiss, S. 2009. Quantum dots for in vivo small-animal imaging. *J. Nucl. Med.* 50(4), 493-496.
9. Betoret, E.; Betoret, N.; Vidal, D.; Fito, P. 2011. Functional foods development: trends and technologies. *Trends Food Sci. Technol.* 22(9), 498-508.
10. Bontempo, V.; Baldi, A.; Cheli, F.; Fantuz, F.; Politis, I.; Carli, S.; Dell'Orto, V. 2000. Kinetic behavior of three preparations of alpha-tocopherol after oral administration to postpubertal heifers. *Am. J. Vet. Res.* 61(5), 589-593.
11. Boscan, P.; Rezende, M.; Grimsrud, K.; Stanley, S.; Mama, K.; Steffey, E. 2010. Pharmacokinetic profile in relation to anaesthesia characteristics after a 5% micellar microemulsion of propofol in the horse. *Br. J. Anaesth.* 104(3), 330-337.
12. Cauchard, J.; Taouji, S.; Sevin, C.; Duquesne, F.; Bernabe, M.; Laugier, C.; Ballet, J. 2006. Immunogenicity of synthetic *Rhodococcus equi* virulence-associated protein peptides in neonate foals. *Int. J. Med. Microbiol.* 296(6), 389-396.
13. Collins, S.; Shandb, P.; Drewa, M. 2011. Stabilization of linseed oil with vitamin E, butylated hydroxytoluene and lipid encapsulation affects fillet lipid composition and sensory characteristics when fed to rainbow trout. *Anim. Feed Sci. Technol.* 170, 53-62.
14. Copland, M.; Baird, M.; Rades, T.; Mckenzie, J.; Becker, B.; Reck, F.; Tyler, P.; Davies, N. 2003. Liposomal delivery of antigen to human dendritic cells. *Vaccine.* 21(9-10), 883-890.
15. Cubillos, C.; De la Torre, B.; Jakab, A.; Clementi, G.; Borrás, E.; Barcena, J.; Andreu, D.; Sobrino, F.; Blanco, E. 2008. Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide. *J. Virol.* 82(14), 7223-7230.

16. Cusack, P.; McMeniman, N.; Lean, L. 2005. The physiological and production effects of increased dietary intake of vitamins E and C in feedlot cattle challenged with bovine herpes virus 1. *J. Anim. Sci.* 83(10), 2423-2433.
17. Dembezynski, R.; Jankowski, T. 2002. Growth characteristics and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules. *Enzyme Microb. Tech.* 31(1-2), 111-115.
18. Desai, K.; Park, H. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technol.* 23(7), 1361-1394.
19. Doleyres, Y.; Lacroix, C. 2005. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *Int. Dairy J.* 15(10), 973-988.
20. Dubey, R.; Shami, T.; Bhasker-Rao, K. 2009. Microencapsulation technology and application. *Defence Sci. J.* 59, 82-95.
21. Fang, Z.; Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 21(10), 510-523.
22. Fattal, E.; Rojas, J.; Youssef, M.; Couvreur, P.; Andremont, A. 1991. Liposome-entrapped ampicillin in the treatment of experimental murine listeriosis and salmonellosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35(4), 770-772.
23. Florindo, H.; Pandit, S.; Goncalves, L.; Videira, M.; Alpar, O.; Almeida, A. 2009. Antibody and cytokine-associated immune responses to *S. equi* antigens entrapped in PLA nanospheres. *Biomaterials.* 30(28), 5161-5169.
24. Garrett, J.; Putnam, D.; Hill, T.; Aldrich, J.; Schlotterbeck, R. 2005. Effect of level of encapsulated vitamin C in starters fed to Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 88(1), 56-62.
25. Gianello, P.; Dufrane, D. 2007. Correction of a diabetes mellitus type 1 on primate with encapsulated islet of pig pancreatic transplant. *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.* 162(10-12), 439-490.
26. Gibbs, B.; Kermasha, S.; Alli, I.; Mulligan, C. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 50(3), 213-224.
27. Gouin, S. 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci. Technol.* 15(7-8), 330-347.
28. Greenwood, D.; Dynon, K.; Kalkanidis, M.; Xiang, S.; Plebanski, M.; Scheerlinck, J. 2008. Vaccination against foot-and-mouth disease virus using peptides conjugated to nano-beads. *Vaccine.* 26(22), 2706-2713.
29. Ghidoni, I.; Chlapanidas, T.; Bucco, M.; Crovato, F.; Marazzi, M.; Vigo, D.; Torre, M.; Faustini, M. 2008. Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine. *Cytotechnology.* 58(1), 49-56.
30. Haerdi-Landerer, M.; Habermacher, J.; Wenger, B.; Suter, M.; Steiner, A. 2010. Slow release antibiotics for treatment of septic arthritis in large animals. *Vet. J.* 184(1), 14-20.
31. Hartwell, J.; Cecava, M.; Donkin, S. 2000. Impact of dietary rumen undegradable protein and rumen protected-choline on intake, prepartum liver triacylglyceride, plasma metabolites and milk production transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83(12), 2907-2917.
32. Heichal-Segal, O.; Rappoport, S.; Braun, S. 1995. Immobilization in alginate-silicate sol-gel matrix protects-glucosidase against thermal and chemical denaturation. *Nat. Biotechnol.* 13, 798-800.

33. Hiszczynska-Sawicka, E.; Oledzka, G.; Holec-Gasior, L.; Li, H.; Xu, J.; Sedcole, R.; Kur, J.; Bickerstaffe, R.; Stankiewicz, M. 2011. Evaluation of immune responses in sheep induced by DNA immunization with genes encoding GRA1, GRA4, GRA6 and GRA7 antigens of *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 177(3-4), 281-289.
34. Huang, S.; Wu, M.; Lee, G. 2010. Microfluidic device utilizing pneumatic microvibrators to generate alginate microbeads for microencapsulation of cells. *Sens. Actuat.* 147(2), 755-764.
35. Huntington, G.; Harmon, D.; Kristensen, N.; Hanson, K.; Spears, J. 2006. Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 130(3-4), 225-241.
36. Irache, J.; Esparza, I.; Gamazo, C., Agüeros, M.; Espuelas, S. 2011. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. *Vet. Parasitol.* 180(1-2), 47-71.
37. Klei, T.; Torbert, B.; Chapman, M.; Turk, M. 1984. Efficacy of ivermectin in injectable and oral paste formulations against eight-week-old *Strongylus vulgaris* larvae in ponies. *Am. J. Vet. Res.* 45(1), 183-185.
38. Kreeger, P.; Fernández, N.; Woodruff, T.; Shea, L. 2005. Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating hormone in a three-dimensional in vitro culture system is dependent on follicle stage and dose. *Biol. Reprod.* 73(5), 942-50.
39. Krentz, K.; Nebel, R.; Canseco, R.; McGilliard, M. 1993. In vitro and in vivo development of mouse morulae encapsulated in 2% sodium alginate or 0.1% poly-L-lysine. *Theriogenology.* 39(3), 655-667.
40. Krishnamurthy, N.; Gimi, B. 2011. Encapsulated cell grafts to treat cellular deficiencies and dysfunction. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 39(6), 473-491.
41. Kumanan, V.; Nugen, S.; Baeumner, A.; Chang, Y. 2009. A biosensor assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J. Vet. Sci.* 10(1), 35-42.
42. Li, M.; Rushing, J.; Robison, E. 1996. Stability of B-complex vitamins in extruded catfish feeds. *J. Appl. Aquacult.* 6, 67-71.
43. Li, W.; Watarai, S.; Iwasaki, T.; Kodama, H. 2004. Suppression of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* excretion by intraocular vaccination with fimbriae proteins incorporated in liposomes. *Dev. Comp. Immunol.* 28(1), 29-38.
44. Lian, W.; Hsiao, H.; Chou, C. 2003. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *J. Food Microbiol.* 86(3), 293-301.
45. Luzardo, A.; Otero, F.; Blanco, J. 2010. Microencapsulation of diets and vaccines for cultured fishes, crustaceans and bivalve mollusks. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 20(4), 277-288.
46. Lynn, R.; Hepler, D.; Kelch, W.; Bertone, J.; Smith, B.; Vatistas, N. 2004. Double-blinded placebo-controlled clinical field trial to evaluate the safety and efficacy of topically applied 1% diclofenac liposomal cream for the relief of lameness in horses. *Vet. Ther.* 5(2), 128-138.
47. Marchetti, M.; Tossani, N.; Marchetti, S.; Bauce, G. 1999. Stability of crystalline and coated vitamins during manufacture and storage of fish feeds. *Aquacult. Nutr.* 5(2), 115-120.
48. Marchetti, M., Tossani, N.; Marchetti, S. 1995. Vitamin degradation in premix as a function of the kind of trace-mineral present. *Zoot. Nutr. Anim.* 21(2), 67-73.

49. Marques, C.; Carvalheiro, M.; Pereira, M.; Jorge, J.; Cruz, M.; Santos-Gomes, G. 2008. Efficacy of the liposome trifluralin in the treatment of experimental canine leishmaniosis. *Vet. J.* 178(1), 133-137.
50. Mata, G.; Masters, D.; Buscall, D.; Street, K.; Schlink, A. 1995. Responses in wool growth, liveweight, glutathione and amino acids, in Merino wethers fed increasing amounts of methionine protected from degradation in the rumen. *Aust. J. Exp. Agric.* 46(6), 1189-1204.
51. Matteucci, M.; Thrall, D. 2000. The role of liposomes in drug delivery and diagnostic imaging: A review. *Vet. Radiol. Ultrasound.* 41(2), 100-107.
52. McClements, D.; Decker, E; Weiss, J. 2007. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J. Food Sci.* 72(8), 109-124.
53. McClements, D.; Lesmes, U. 2009. Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.* 20(10), 448-57.
54. McGregor, B.; Hodge, R. 1989. Influence of energy and polymer-encapsulated methionine supplements on mohair growth and fibre diameter of Angora goats fed at maintenance. *Aust. J. Exp. Agric.* 29(2), 179-181.
55. MacLeod, D.; Prescott, J. 1988. The use of liposomally-entrapped gentamicin in the treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Can. J. Vet. Res.* 52(4), 445-450.
56. Mowat, D.; Deelstra, K. 1972. Encapsulated methionine supplement for growing-finishing lambs. *J. Anim. Sci.* 34(2), 332-335.
57. Murillo, M.; Goñi, M.; Irache, J.; Arangoa, M.; Blasco, J.; Gamazo, C. 2002. Modulation of the cellular immune response after oral or subcutaneous immunization with microparticles containing *Brucella ovis* antigens. *J. Control Release.* 85(1-3), 237-246.
58. Nebel, R.; Vishwanath, R.; McMillan, W.; Pitt, C. 1996. Microencapsulation of bovine spermatozoa viability and fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 44(2), 79-89.
59. Nedovic, V.; Kalusevic, A.; Manojlovic, V.; Levic, S.; Bugarski, B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Proc. Food Sci.* 1, 1806-1815.
60. Nesterenko, A.; Alric, I.; Silvestre, F.; Durrieu, V. 2013. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Ind. Crops Prod.* 42, 469-479.
61. Oke, B.; Loerch, S.; Deetz, L. 1986. Effects of rumen-protected methionine and lysine on ruminant performance and nutrient metabolism. *J. Anim. Sci.* 62(4), 1101-1112.
62. Patel, S.; Lavasanifar, A.; Choi, P. 2010. Molecular dynamics study of the encapsulation Capability of a PCL-PEO based block copolymer for hydrophobic drugs with different spatial distributions of hydrogen bond donors and acceptors. *Biomaterials.* 31(7), 1780-1786.
63. Park, J.; Wrzesinski, S.; Stern, E.; Look, M.; Criscione, J.; Ragheb, R.; Jay, S.; Demento, S.; Agawu, A.; Licon, P.; Ferrandino, A.; González, D.; Habermann, A.; Flavell, R.; Fahmy, T. 2012. Combination delivery of TGF- β inhibitor and IL-2 by nanoscale liposomal polymeric gels enhances tumour immunotherapy. *Nat. Mater.* 11(10), 895-905.
64. Perfield, J.; Lock, A.; Pfeiffer, A.; Bauman, D. 2004. Effects of amide-protected and lipid-encapsulated conjugated linoleic acid supplements on milk fat synthesis. *J. Dairy Sci.* 87(9), 3010-3016.

65. Piepenbrink, M.; Overton, T. 2003. Liver metabolism and production of cows fed increasing amounts of rumen-protected choline during the periparturient Period. *J. Dairy Sci.* 86(5), 1722-1733.
66. Poirier, V.; Thamm, D.; Kurzman, I.; Jeglum, K.; Chun, R.; Obradovich, J.; O'Brien, M.; Fred, R.; Phillips, B.; Vail, D. 2002. Liposome encapsulated doxorubicin (Doxil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcoma in cats. *J. Vet. Intern. Med.* 16(6), 726-731.
67. Rathore, S.; Desai, P.; Liew, C.; Chan, L.; Heng, P. 2013. Microencapsulation of microbial cells. *J. Food Eng.* 116(2), 369-381.
68. Röpke, T.; Oldenhof, H.; Leiding, C.; Sieme, H.; Bollwein, H.; Wolkers, W. 2011. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology.* 76(8), 1465-1472.
69. Rossi, F.; Moschini, M.; Masoero, F.; Cavanna, G.; Piva, G. 2003. Rumen degradation and intestinal digestibility of rumen-protected amino acids: comparison between in situ and in vitro data. *Anim. Feed Sci. Technol.* 108(1), 223-229.
70. Sacadura, F.; Robinson, P.; Evans, E.; Lordelo, M. 2008. Effects of a ruminally protected B-vitamin supplement on milk yield and composition of lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144, 111-124.
71. Sarkar, S.; Gupta, S.; Variyar, P.; Sharma, A.; Singhal, R. 2013. Hydrophobic derivatives of guar gum hydrolyzate and gum arabic as matrices for microencapsulation of mint oil. *Carbohydr. Polym.* 95(1), 177-182.
72. Shah, S.; Nagano, M.; Yamashita, Y.; Hishinuma, M. 2010. Microencapsulation of canine sperm and its preservation at 4°C. *Theriogenology.* 73(5), 560-567.
73. Sahoo, S.; Labhasetwar, V. 2003. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov. Today.* 8(24), 1112-1120.
74. Santschi, D.; Barthiaume, R.; Matte, J.; Mustafa, A.; Girard, C. 2005. Fate of supplementary B-vitamins in the gastrointestinal tract of dairy cows. *J. Dairy Science.* 88(6), 2043-2054.
75. Scheerlinck, J.; Greenwood, D. 2008. Virus-sized vaccine delivery systems. *Drug Discov. Today.* 13(19-20), 882-887.
76. Scheerlinck, J.; Gloster, S.; Gamvrellis, A.; Mottram, P.; Plebanski, M. 2006. Systemic immune responses in sheep, induced by a novel nano-bead adjuvant. *Vaccine.* 24(8), 1124-1131.
77. Sibbald, I.; Loughheed, T.; Linton, J. 1967. Patent to John Labatt Company Ltd South Africa. 68-0722.
78. Shim, Y.; Shinde, P.; Choi, J.; Kim, J.; Seo, D.; Pak, J.; Chae, B.; Kwon, I. 2010. Evaluation of multi-microbial probiotics produced by submerged liquid and solid substrate fermentation methods in broilers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23(4), 521-529.
79. Soto, L.; Frizzo, L.; Avataneo, E.; Zbrun, M.; Bertozzi, E.; Sequeira, G.; Signorini, M.; Rosmini, M. 2011. Design of macrocapsules to improve bacterial viability and supplementation with a probiotic for young calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 165(3-4), 176-183.
80. Soto, L.; Frizzo, L.; Bertozzi, E.; Diaz, A.; Martí, L.; Dalla Santina, R.; Sequeira, G.; Rosmini, M. 2009. Milk evaluation as growth and cold preservation medium of a probiotic inoculum for young calves. *J. Anim. Vet. Adv.* 8(7), 1353-1360.
81. Souza, V.; Almeida, R.; Silva, D.; Piekarski, P.; Jesus, C.; Pereira, M. 2010. Substituição

- parcial de farelo de soja por ureia protegida na produção e composição do leite. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 62(6), 1415-1422.
82. Taylor-Edwards, C.; Hibbard, G.; Kitts, S.; McLeod, K.; Axe, D.; Vanzant, E.; Kristensen, N.; Harmon, D. 2009. Effects of slow-release urea on ruminal digesta characteristics and growth performance in beef steers. J. Anim. Sci. 87(1), 200-208.
83. Underwood, C.; Van Eps, W. 2012. Nanomedicine and veterinary science: The reality and the practicality. Vet. J. 193(1), 12-23.
84. Usui, T.; Konnai, S.; Tajima, S.; Watarai, S.; Aida, Y.; Ohashi, K.; Onuma, M. 2003. Protective effects of vaccination with bovine leukemia virus (BLV) Tax DNA against BLV infection in sheep. J. Vet. Med. Sci. 65(11), 1201-1205.
85. Vandamme, K.; Melkebeek, V.; Cox, E.; Remon, J.; Vervaeke, C. 2011. Adjuvant effect of Gantrez®AN nanoparticles during oral vaccination of piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli*. Vet. Immunol. Immunopathol. 139(2-4), 148-155.
86. Vandenberg, G.; Scott, S.; Sarker, P.; Dallaire, V.; De la Noüe, J. 2011. Encapsulation of microbial phytase: Effects on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Anim. Feed Sci. Technol. 169(3-4), 230-243.
87. Vos, P., Faas, M.; Spasojevic, M.; Sikkema, J. 2010. Review: Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. Int. Dairy J. 20, 292-302.
88. Wandrey, C.; Bartkowiak, A.; Harding, S. 2009. Materials for Encapsulation. In: Zuidam, N.; Nedovic, V. (Eds.). Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing. Springer. Dordrecht, The Netherlands. p. 31-100.
89. Wang, M.; Xu, Z.; Li, W.; Jiang, Z. 2009. Effect of chromium nanocomposite supplementation on growth hormone pulsatile secretion and mRNA expression in finishing pigs. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 93(4), 520-525.
90. Wang, C.; Wang, M.; Ye, S.; Tao, W.; Du, Y. 2011. Effects of copper-loaded chitosan nanoparticles on growth and immunity in broilers. Poult. Sci. 90(10), 2223-2228.
91. Weber, W.; Rimann, M.; Schafroth, T.; Witschi, U.; Fussenegger, M. 2006. Design of high-throughput-compatible protocols for microencapsulation, cryopreservation and release of bovine spermatozoa. J. Biotechnol. 123(2), 155-163.
92. Weiss, R.; Cox, N.; Martinez, M. 1993. Evaluation of free or liposome encapsulated ribavirin for antiviral therapy of experimentally induced feline infectious peritonitis. Res. Vet. Sci. 55(2), 162-172.
93. Wiese, S.; White, C.; Masters, D.; Milton, J.; Davidson, R. 2003. The growth performance and carcass attributes of Merino and Poll Dorset x Merino lambs fed rumen-protected methionine (Smartamine-M). Aust. J. Agric. Res. 54(5), 507-513.
94. Williams, J.; Newell, S.; Hess, B.; Scholljegerdes, E. 1999. Influence of rumen-protected methionine and lysine on growing cattle fed forage and corn based diets. J. Prod. Agric. 12(4), 696-701.
95. Xin, H.; Schaefer, D.; Liu, Q.; Axe, D.; Meng, Q. 2010. Effects of polyurethane coated urea supplement on in vitro ruminal fermentation, ammonia release dynamics and lactating performance of Holstein dairy cows fed a steamflaked corn-based diet. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 23, 491-500.
96. Yaguchi, K.; Ohgitani, T.; Noro, T.; Kaneshige, T.; Shimizu, Y. 2009.

- Vaccination of chickens with liposomal inactivated avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) vaccine by eye drop or coarse spray administration. *Avian Dis.* 53(2), 245-249.
97. Yuan, P.; Ma, Q.; Meng, R.; Wang, C.; Dou, W.; Wang, G.; Su, X. 2009. Multicolor quantum dot-encoded microspheres for the fluoroimmunoassays of chicken newcastle disease and goat pox virus. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9(5), 3092-3098.
98. Yuan, L.; Geng, L.; Ge, L.; Yu, P.; Duan, X.; Chen, J.; Chang, Y. 2013. Effect of iron liposomes on anemia of inflammation. *Int. J. Pharm.* 454(1), 82-89.
99. Zhang, W.; Yin, Z.; Liu, N.; Yang, T.; Wang, J.; Bu, Z.; Wu, D. 2010. DNA-chitosan nanoparticles improve DNA vaccine-elicited immunity against Newcastle disease virus through shuttling chicken interleukin-2 gene. *J. Microencapsul.* 27(8), 693-702.
100. Zuidam, N.; Heinrich, J. 2009. Encapsulation of aroma. In: Zuidam, N.; Nedovic, V. (Eds.). *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*. Springer. Dordrecht, The Netherlands. p. 127-160.