



**Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Departamento de Alimentos e Nutrição**



**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR  
SPRAY DRYING E COACERVAÇÃO COMPLEXA E SEU USO PARA  
ALIMENTAÇÃO DE LARVAS DE PEIXES.**

**Izabela Dutra Alvim  
Doutoranda**

**Carlos R. F. Grosso  
Orientador**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

**Campinas – São Paulo  
Dezembro/2005**

---

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

AL88p Alvim, Izabela Dutra  
Produção e caracterização de micropartículas obtidas por spray drying e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes / Izabela Dutra Alvim. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Carlos Raimundo Ferreira Grosso  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Coacervação complexa. 2. Secagem por atomizador. 3. Larvas de peixe. 4. Aglomeração. I. Grosso, Carlos Raimundo Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Production and characterization of microparticles by spray drying and complex coacervation and its use for feeding of larvae fish

Palavras-chave em inglês (Keywords): Complex coacervation, Spray dryer, Larvae fish, Agglomeration

Área de concentração: Nutrição Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Maria Inês Ré

Maria Célia Portella

Maria Helena Santana

Oswaldo de Freitas

Alfredo Vitali

---

Carlos Raimundo Ferreira Grosso  
Universidade Estadual de Campinas

---

Maria Inês Ré  
Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Maria Célia Portella  
Universidade Estadual de São Paulo

---

Maria Helena Santana  
Universidade Estadual de Campinas

---

Oswaldo de Freitas  
Universidade Estadual de São Paulo

---

Alfredo Vitali  
Instituto de Tecnologia de Alimentos

---

*Dedico esse trabalho  
a minha família  
por representarem  
tudo na minha vida*

---

*Eu sonho com as coisas  
que nunca existiram  
e digo, por que não?*

*George Bernard Shaw.*

**Venham até a borda, ele disse  
Eles disseram: Nós temos medo.  
Venham até a borda, ele insistiu.  
Eles foram.  
Ele os empurrou...  
...e eles voaram.**

Guillaume Apollinaire

---

AGRADECIMENTOS

---

Agradeço muito ao Prof. Carlos Grosso, pela orientação e amizade nessas quatro anos.

Agradeço a Fapesp pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

À Profa. Débora e a Yara por me iniciarem no mundo da microscopia e sempre me ajudarem com as amostras

Ao prof. Aureo Yamada e sua equipe, (em especial à Marcia e o Juarez), pela solicitude e grande ajuda na microscopia ótica para obtenção das imagens utilizadas nesse trabalho e na filmagem da re-hidratação das partículas.

À Adriane e à Antônia que sempre me auxiliaram com entusiasmo na obtenção das imagens por microscopia eletrônica de varredura.

À Clausinete pelo recobrimento dos stubs.

Ao Carlos Bizarro, da FioCruz, pela colaboração inestimável na obtenção das imagens por microscopia confocal.

Ao Alfredo Vitali pelas conversas, dicas e atenciosidade nesses anos todos.

Ao Prof Marsaioli pelo uso do spray dryer e ao Prof. Ranufo por me ensinar a usá-lo.

À Anacon pela liofilização das amostras.

À Profa. Maria Célia Portela e à galera do Caunesp (Marcelo, Timba, Rosângela e todos mais) pela colaboração inestimável no ensaio biológico. Obrigado pela recepção tão gentil e pela ajuda nos operacionais do trabalho, afinal essa moça aqui mal conseguia manusear as larvas no começo!

À Eliana, Chico, Soely e Suzana pelas dicas e por sempre disponibilizarem os recursos necessários para execução das análises.

À Nice por todos os abraços desses quatro anos. À Eliete pelo bom exemplo em muitos momentos e pelo constante incentivo. Ah claro! E pelos pães de queijo uai!

À Bete por ser minha amiga e por ter colocado o Vina na minha vida.

À Fátima pelo bom humor que sempre me socorreu nos dias difíceis.

À Cidinha pelos tantos “galhos” quebrados, pelas piadas e pelos pãezinhos do Calegari. À Sônia pela solicitude.

---

A todos meus colegas de departamento, pelos momentos de rizadas, de discussões técnicas e de trocas de experiência.

Às amigas de laboratório: Ana Silvia, Renata, Noemi, Taciana e Andréia... nem falo nada heim... gosto muito de todas vocês, obrigado por tudo!

Um muito especial obrigado à Maísa por ter me ajudado tanto e por todas as conquistas que fizemos juntas.

Ao Gustavo e à Karina que me ajudaram tanto e tiveram paciência com meus maus humores e minhas bagunças.

Ao Cosme e funcionários da pós-graduação, pela paciência, principalmente nesse finalzinho, quando ficamos muito chatos e queremos tudo para ontem!

Aos meus amigos Pézão, Iara e Fernando (Tio Cabeludo) por serem pacientes e, apesar dos meus longos sumiços, nunca terem desistido dessa amiga ingrata.

À Anabela, ao Bruno e ao Eduardo por serem mais que meus irmãos... serem meus melhores amigos...

Ao meu pai por tudo que me ensinou até hoje e por estar sempre torcendo por mim.

À minha mãe, por ser essa mulher corajosa e batalhadora, sendo sempre meu farol nessa vida.

Em quatro anos muita coisa acontece e nem sempre a gente consegue se lembrar de tudo nessa hora. Por isso, gostaria de agradecer imensamente a todas as pessoas que eu não citei aqui, mas que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

**ÍNDICE GERAL**

<b>ÍNDICE GERAL</b>	viii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	xv
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	xxiv
<b>ABREVIATURAS</b>	xxviii
<b>RESUMO</b>	xxx
<b>SUMMARY</b>	xxxii
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA</b>	1
<b>CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	4
2.1. AQUICULTURA	4
2.1.1. Produção e consumo de peixes	6
2.1.2. Criação de peixes para o consumo	9
2.1.3. Dietas artificiais (micropartículas) e alimentação de larvas de peixes	12
2.2. MICROENCAPSULAÇÃO	16
2.2.1. Materiais de parede	18
2.2.1.1. Gelatina	20
2.2.1.2. Goma Arábica	21
2.2.1.3. Pectina	22
2.2.2. Recheio (oleoresina de páprica)	22
2.2.3. Produção das micropartículas	23
2.2.3.1. Microencapsulação por <i>Spray Drying</i>	24
2.2.3.2. Aglomeração e recobrimento	26
2.2.3.3. Microencapsulação por coacervação	33
2.2.3.3.1. Microencapsulação por coacervação complexa	37
<b>CAPÍTULO 3. OBJETIVOS</b>	41
3.1. OBJETIVO GERAL	41
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
<b>CAPÍTULO 4. TÉCNICAS DE SPRAY DRYING E AGLOMERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE DIETAS PARA LARVAS DE PEIXE</b>	42
4.1. RESUMO	42
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.2.1. Materiais	43

4.2.2. Equipamentos	43
4.2.3. Formulações das dietas e condições de processo	43
4.2.4. Aglomeração e recobrimentos das partículas	44
4.2.5. Caracterização das amostras	48
4.2.5.1. Determinação do teor total de proteínas	48
4.2.5.2. Determinação de umidade	48
4.2.5.3. Solubilidade das dietas e aglomerados	48
4.2.5.4. Diâmetros médios e distribuição de tamanho das partículas	49
4.2.5.5. Morfologia e microestrutura: Microscopia ótica (MO) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	49
4.2.5.6. Flutuabilidade	50
4.2.5.7. Atividade de água ( $A_w$ )	50
4.2.5.8. Densidade aparente dos aglomerados	51
4.2.6. Análise estatística	51
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.3.1. Dietas desidratadas – produção e composição química	52
4.3.2. Aglomeração e recobrimento – produção e composição química.	54
4.3.2.1. Aglomeração e recobrimento manual	54
4.3.2.2. Leito fluidizado	55
4.3.2.3. Aglomerador	56
4.3.3. Solubilidade	52
4.3.3.1. Solubilidade para dieta sem recobrimento dieta adicionada de óleo e aglomerados produzidos no Aglomerador	63
4.3.3.1.1. Solubilidade das amostras determinada pela quantificação de sólidos solúveis	63
4.3.3.1.2. Solubilidade das amostras determinada pela quantificação de proteínas solúveis	65
4.3.3.1.3. Dietas comerciais: composição protéica e solubilidade	68
4.3.4. Diâmetro médio e distribuição do tamanho de partículas da dieta desidratada e dos aglomerados	71
4.3.5. Densidade e sedimentação	74
4.3.6. Atividade de água	77
4.3.7. Morfologia e microestrutura	78
4.3.7.1 Dieta desidratada em Spray dryer sem recobrimento	78

---

4.3.7.2. Dieta adicionada de óleo	80
4.3.7.3. Aglomerados	81
4.3.7.4. Dietas comerciais	85
<b>CAPITULO 5.COACERVAÇÃO COMPLEXA NA PRODUÇÃO DE DIETAS PARA LARVAS DE PEIXE</b>	<b>88</b>
5.1. RESUMO	88
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	89
5.2.1. Materiais	89
5.2.2. Equipamentos	89
5.2.3. Produção das micropartículas por coacervação	90
5.2.3.1. Obtenção de micropartículas coacervadas contendo compostos hidrofóbicos (recheio: oleoresina de páprica/óleo de soja)	92
5.2.3.1.1. Produção de micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja.	92
5.2.3.1.2. Uso de reticulantes para enrijecimento da parede das micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja.	93
5.2.3.1.3. Secagem de micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja.	94
5.2.3.2. Obtenção de micropartículas coacervadas contendo compostos hidrofílicos (recheio: matrizes lipídicas carreando glicose ou isolado protéico de soro de leite)	95
5.2.3.2.1. Produção de micropartículas lipídicas (MPLs): Determinação da proporção de compostos hidrofóbicos constituintes da matriz	95
5.2.3.2.2. Produção de micropartículas lipídicas (MPLs): Determinação da proporção entre mistura lipídica e solução de recheio.	96
5.2.3.2.3. Produção de micropartículas lipídicas (MPL): Planejamentos experimentais	96
5.2.3.2.4. Produção de micropartículas lipídicas (MPL): Processamento	98
5.2.3.2.5. Incorporação de micropartículas lipídicas contendo glicose ou proteína em micropartículas coacervadas (CMPLs).	98
5.2.4. Caracterização das micropartículas coacervadas	99
5.2.4.1 Determinação de umidade	99
5.2.4.2. Determinação do diâmetro médio de partículas e distribuição de tamanho	100
5.2.4.3. Flutuabilidade	100
5.2.4.4. Morfologia e microestrutura	100

---

5.2.4.5. Determinação da quantidade total de compostos hidrofílicos ou hidrofóbicos contidos nas micropartículas lipídicas e nos coacervados	103
5.2.4.5.1. Determinação da quantidade total de oleoresina de páprica contida nas micropartículas coacervadas (CORP).	103
5.2.4.5.2. Determinação da quantidade total de glicose contida micropartículas lipídicas (MPL-GLI) e seus coacervados (CMPL-GLI).	103
5.2.4.5.3. Determinação da quantidade total de proteína contidas nas micropartículas lipídicas (MPL-PTN) e seus coacervados (CMPL-PTN).	104
5.2.5. Perfis de liberação de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos	105
5.2.5.1. Perfil de liberação de oleoresina de páprica de micropartículas coacervadas	105
5.2.5.2 Perfis de liberação de Glicose de micropartículas lipídicas e seus coacervados	107
5.2.5.2.1. Liberação de glicose de micropartículas lipídicas (MPL-GLI)	107
5.2.5.2.2. Liberação de glicose de micropartículas coacervadas contendo micropartículas lipídicas (CMPL-GLI)	108
5.2.5.3 Perfis de liberação de proteína de micropartículas lipídicas e seus coacervados	108
5.2.5.3.1. Liberação de proteína de micropartículas lipídicas (MPL-PTN)	108
5.2.5.3.2. Liberação de proteína de micropartículas coacervadas contendo micropartículas lipídicas (CMPL-PTN)	109
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
5.3.1. Produção de micropartículas coacervadas - Testes preliminares com caracterização (diâmetro médio, distribuição de tamanho e morfologia)	110
5.3.1.1. pH de coacervação	110
5.3.1.2. Preparo da emulsão gelatina/recheio	110
5.3.1.3. Quantidade de recheio	113
5.3.1.4. Quantidade total de polímeros de parede	116
5.3.2. Produção de micropartículas coacervadas – Planejamento experimental	118
5.3.3. Obtenção de micropartículas coacervadas contendo compostos hidrofóbicos (recheio: oleoresina de páprica e óleo de soja)	121
5.3.3.1. Produção de micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja.	121
5.3.3.2. Reticulação com glutaraldeído e com transglutaminase	122
5.3.3.3. Secagem de micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja	123

---

5.3.3.3.1. Secagem de micropartículas coacervadas em estufa com circulação de ar	125
5.3.3.3.2. Secagem de micropartículas coacervadas por liofilização	125
5.3.3.3.3. Secagem de micropartículas coacervadas em spray dryer	126
5.3.4. Obtenção de micropartículas coacervadas contendo compostos hidrofílicos (recheio: matrizes lipídicas carreando glicose ou isolado protéico de soro de leite)	128
5.3.4.1. Produção de micropartículas lipídicas (MPLs) – Preliminares	128
5.3.4.1.1. Determinação da proporção de compostos hidrofóbicos constituintes da matriz	128
5.3.4.1.2. Determinação das proporções entre mistura lipídica e soluções de recheios	129
5.3.4.1.3. Adição de tensoativos	130
5.3.4.1.4. Condições de processamento	130
5.3.4.2. Produção de micropartículas lipídicas (MPLs) – Planejamentos experimentais	132
5.3.4.2.1. Eficiência de Encapsulação (%EE)	132
5.3.4.2.2. Liberação em 30 minutos (%L30)	137
5.3.4.3. Produção de coacervados contendo micropartículas lipídicas	139
5.3.5. Caracterização das micropartículas coacervadas	140
5.3.5.1. Flutuabilidade	140
5.3.5.2. Determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanho de partículas (micropartículas lipídicas e coacervados em geral)	141
5.3.5.2.1. Diâmetro médio e distribuição de tamanho para micropartículas coacervadas contendo composto hidrofóbico (oleoresina/óleo de soja).	141
5.3.5.2.2. Diâmetro médio e distribuição de tamanho para micropartículas coacervadas contendo composto hidrofílicos (glicose e isolado protéico de soro de leite).	146
5.3.5.3. Morfologia e microestrutura	148
5.3.5.3.1. Produção de micropartículas coacervadas - Testes preliminares	148
5.3.5.3.2. Obtenção de micropartículas coacervadas contendo compostos hidrofóbicos (recheio: oleoresina de páprica e óleo de soja) – Partículas úmidas sem reticulação, reticuladas com glutaraldeído e com transglutaminase.	154
5.3.5.3.3. Secagem e re-hidratação de micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja	156
5.3.5.3.3.1. Secagem em estufa	156

---

---

5.3.5.3.3.2. Secagem por liofilização	162
5.3.5.3.3.3. Secagem em Spray dryer.	167
5.3.5.3.4. Obtenção de micropartículas coacervadas contendo compostos hidrofílicos (recheio: glicose e isolado protéico de soro de leite) – micropartículas lipídicas e seus coacervados.	176
5.3.6. Perfis de liberação de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos de micropartículas coacervadas.	183
5.3.6.1. Liberação de composto hidrofóbico (oleoresina de páprica)	183
5.3.6.1.1. Liberação de oleoresina de micropartículas coacervadas úmidas e liofilizadas.	183
5.3.6.1.2. Liberação de oleoresina de micropartículas coacervadas secas por spray dryer.	187
5.3.6.2. Perfil de liberação de compostos hidrofílicos (glicose e proteína): micropartículas lipídicas e seus coacervados	189
5.3.6.2.1. Liberação de glicose ou proteína de micropartículas lipídicas	189
5.3.6.2.2. Liberação de glicose ou proteína contidas em micropartículas lipídicas encapsuladas por coacervação.	195
<b>CAPITULO 6. ENSAIO BIOLÓGICO IN VIVO: ACEITAÇÃO DOS AGLOMERADOS E COACERVADOS COMO DIETAS</b>	199
6.1. RESUMO	199
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS	200
6.2.1. Materiais	200
6.2.2. Dietas testadas	200
6.2.3. Morfologia e microestrutura	202
6.2.4. Determinação do diâmetro médio de partículas	202
6.2.5. Experimento in vivo com larvas de pacu: Testes de aceitação	202
6.2.6. Biometria	206
6.2.7. Avaliação da ingestão	206
6.2.8. Análise estatística	206
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	207
6.3.1. Seleção e produção das dietas	207
6.3.2. Diâmetro médio das dietas	209
6.3.3. Comportamento das larvas durante o oferecimento das dietas inertes	209
6.3.3.1. Adição de estímulo químico	210

---

6.3.3.2. Adição das dietas	210
6.3.4. Biometria	211
6.3.5. Ingestão das dietas	212
6.3.5.1. Observações visuais em microscópio estereoscópico	212
6.3.5.2. Percentual de ingestão	214
<b>7. CONCLUSÕES</b>	218
<b>8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	220
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	221
<b>10. ANEXOS</b>	236
10.1. Anexo 1: Distribuição de tamanho de D, DO, DOPC e DOGPC.	236
10.2. Anexo 2 – Parâmetros utilizados para captação de imagens pelo microscópio de varredura laser confocal.	237
10.3. Anexo 3: Testes preliminares: estudo da reticulação com transglutaminase e glutaraldeído associados a secagem de micropartículas em spray dryer. Os experimentos potencialmente interessantes de estudo e as condições fixadas para o trabalho estão marcadas na Tabela com um sombreado.	238
10.4. Anexo 4: Morfologia de micropartículas coacervadas liofilizadas submetidas a congelamento rápido (nitrogênio líquido)	240
10.5. Anexo 5: Curva padrão de oleoresina em etanol.	241
10.6. Anexo 6: Espectro de varredura para oleoresina de páprica solubilizada em etanol (concentração de 0,16mg de oleoresina/mL de etanol)	242
10.7. Anexo 7: Produção científica no período de vigência da bolsa	243

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Contribuição da proteína oriunda da carne de peixe na alimentação de vários grupos populacionais no mundo.	9
<b>Figura 2:</b> Definição do tipo de estrutura obtido nos processos de microencapsulação. A: mononucleada – microcápsula; B: multinucleada – microesfera ou micropartícula.	18
<b>Figura 3:</b> Vários possíveis estados resultantes da interação macroscópica entre um líquido e um pó (adaptado de Goldszal & Bousquet [2001])	29
<b>Figura 4:</b> Leitões fluidizados com vários sistemas de aspersão da solução de cobertura: A - Aspersão contracorrente ao fluxo de ar de fluidização das partículas, B - tipo <i>Wurster</i> com aspersão concorrente ao fluxo de ar de fluidização das partículas, C - aspersão tangencial ao fluxo de ar de fluidização das partículas (adaptados de Dewettinck & Huyghebaert, [1999])	30
<b>Figura 5:</b> Classificação de partículas segundo Geldart. A e B = fácil fluidização; C = coesivo; D = granuloso. ( $\rho_p, \rho_g$ : densidade efetiva da partícula e densidade do gás; $d_p$ : diâmetro médio da partícula) [Guignon, Duquenoy & Dumoulin, 2002].	32
<b>Figura 6:</b> Leito Fluidizado (dimensões apresentadas em milímetros).	46
<b>Figura 7:</b> Aglomerador utilizado para produção de dietas recobertas e aglomeradas.	47
<b>Figura 8:</b> Fluxograma da metodologia para obtenção das frações solúveis das dietas e aglomerados.	49
<b>Figura 9:</b> Modelo preliminar para testes de nebulização.	57
<b>Figura 10:</b> Coloração do amido de arroz após recobrimento por nebulização. A -amido de arroz; B - amido de arroz recoberto.	58
<b>Figura 11:</b> Aglomerador utilizado para aglomeração de dietas desidratadas. A: vista geral; B: controle do ar comprimido injetado nos nebulizadores; C: sistema de alimentação, D: Sistema de nebulização; E: Coleta da amostra aglomerada.	59
<b>Figura 12:</b> Solubilidade em sólidos solúveis por sólidos totais das dietas: D – Dieta sem recobrimento; DO – Dieta adicionada de óleo milho (adição manual); DOPC – Dieta adicionada de óleo, recoberta com pectina – cálcio (1% p/p); DOPC – Dieta adicionada de óleo, recoberta com gelatina (2% p/p) e pectina – cálcio (1% p/p). Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) para o tempo de 120 minutos. Coeficiente de variação	64

(desvio padrão / média X 100) máximo = 3,9%.

**Figura 13:** Solubilidade em proteína solúvel por proteína total das dietas: D 66  
– Dieta sem recobrimento; DO – Dieta adicionada de óleo milho (adição manual); DOPC – Dieta adicionada de óleo, recoberta com pectina – cálcio (1% p/p); DOPC – Dieta adicionada de óleo, recoberta com gelatina (2% p/p) e pectina – cálcio (1% p/p). Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) para o tempo de 120 minutos. Coeficiente de variação (desvio padrão / média X 100) máximo = 5,1%.

**Figura 14:** Solubilidade em sólidos solúveis por sólidos totais das dietas 69  
comerciais: USA: dieta de procedência americana; JP400: Dieta de procedência japonesa com diâmetro médio de 400 microns; JP700: dieta de procedência japonesa com diâmetro médio de 700 microns. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) para o tempo de 120 minutos. Coeficiente de variação (desvio padrão / média X 100) máximo = 7,8%.

**Figura 15:** Solubilidade em proteína solúvel por proteína total das dietas 69  
comerciais: USA: dieta de procedência americana; JP400: Dieta de procedência japonesa com diâmetro médio de 400 microns; JP700: dieta de procedência japonesa com diâmetro médio de 700 microns. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) para o tempo de 120 minutos. Coeficiente de variação (desvio padrão / média X 100) máximo = 7,3%.

**Figura 16:** Sedimentação da dieta sem recobrimento (D), da dieta 75  
adicionada de óleo (DO – adição manual) e dos aglomerados: DOPC (dieta adicionada de óleo de milho por adição manual e recoberta no aglomerador com quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p)); DOGPC (dieta adicionada de óleo de milho por adição manual e recoberta no aglomerador com duas passagens de gelatina (2% p/p) e quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p)). Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) para o tempo de 30 minutos. Coeficiente de variação (desvio padrão / média X 100) máximo = 3,5%.

**Figura 17:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de Varredura. Dieta 78  
para pacu desidratada em *spray dryer*. A: barra = 10  $\mu\text{m}$ ; B: barra = 1  $\mu\text{m}$ .

**Figura 18:** Imagens obtidas por microscopia ótica. Dieta sem recobrimento 79  
obtida por secagem em *spray dryer*. Meio de captação: água. Barras = 40  $\mu\text{m}$ .

**Figura 19:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de Varredura. Dieta 80  
adicionada de óleo (DO – incorporação manual): A – Barras = 100  $\mu\text{m}$ ; B – barra = 10  $\mu\text{m}$ .

- Figura 20:** Imagens obtidas por microscopia ótica. Dieta adicionada de óleo. 81  
Meio de captação: água. Barras = 40  $\mu\text{m}$ .
- Figura 21:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de Varredura. DOPC 82  
(A, C e E) – Dieta adicionada de óleo de milho (adição manual) recoberta no aglomerador com quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p). DOGPC (B, D e F) – Dieta adicionada de óleo de milho (adição manual) recoberta no aglomerador com duas passagens de gelatina (2% p/p) e quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p): A e B: barra=100 $\mu\text{m}$ ; C e D: barra=10 $\mu\text{m}$ ; E e F: barra=10 $\mu\text{m}$ .
- Figura 22:** Imagens obtidas por microscopia ótica. DOPC (A e B) – Dieta 84  
adicionada de óleo de milho (adição manual) recoberta no aglomerador com quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p), DOGPC (C e D) – Dieta adicionada de óleo de milho (adição manual) recoberta no aglomerador com duas passagens de gelatina (2% p/p) e quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p). Meio de captação: água. Barras = 40  $\mu\text{m}$ .
- Figura 23:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de Varredura de 85  
dieta comercial de procedência americana (USA). A e B: barras = 100  $\mu\text{m}$ ; C: barra = 10  $\mu\text{m}$ .
- Figura 24:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de Varredura de 86  
dietas comerciais de procedência japonesa: JP400 (A, C com barras = 100  $\mu\text{m}$  e E com barra = 10  $\mu\text{m}$ ). JP700 (B, D com barras = 100  $\mu\text{m}$  e F com barra = 10  $\mu\text{m}$ ).
- Figura 25:** Fluxograma de produção das micropartículas por coacervação. 91  
As letras entre parênteses indicam os pontos estudados nos testes preliminares.
- Figura 26:** Fluxograma da produção de micropartículas por coacervação 93  
complexa utilizando como recheio uma mistura de oleoresina de páprica e óleo de soja (1:1). \* massa de recheio referente a 100% do total de polímeros de parede do sistema em base seca.
- Figura 27:** Fluxograma da produção de micropartículas por coacervação 99  
utilizando como recheio micropartículas lipídicas contendo glicose ou proteína
- Figura 28:** Estruturas químicas dos corantes FITC e *Nile Red* (site da 102  
Sigma:[http://www.sigmaaldrich.com/cgi-bin/hsrun/Distributed/HahtShop/HAHTpage/HS\\_StructureImage](http://www.sigmaaldrich.com/cgi-bin/hsrun/Distributed/HahtShop/HAHTpage/HS_StructureImage) - acesso em junho, 2003).
- Figura 29:** Sistema composto de tubos e agitador rotativo usado na 107  
avaliação da liberação de oleoresina de micropartículas coacervadas.

- Figura 30:** Gráfico de Pareto com valor estimado dos efeitos principais e interações de segunda ordem para as variáveis estudadas ao nível de 95% de confiança ( $p=0,05$ ). 120
- Figura 31:** Superfície de Resposta para Eficiência de encapsulação (%EE) de micropartículas produzidas por coacervação em função da quantidade de recheio adicionado (% em relação ao total de material de parede do sistema em base seca) e quantidade total de polímeros de parede utilizados (%). 120
- Figura 32:** Esquema de adaptação do *Spray dryer* Buchi para produção de micropartículas lipídicas. 131
- Figura 33:** Gráficos de Pareto com valores estimados dos efeitos principais e interações de segunda ordem para as variáveis estudadas sobre a eficiência de encapsulação (%EE) na produção de micropartículas lipídicas, ao nível de 95% de confiança ( $p=0,05$ ). A – Micropartículas lipídicas contendo glicose (MPL-GLI) B - Micropartículas lipídicas contendo proteína (MPL-PTN). 135
- Figura 34:** Eficiência de encapsulação (%EE): A - Superfície de Resposta para proporção mistura lipídica/solução de glicose X concentração da solução de glicose X %EE. B - Superfície de Resposta para proporção mistura lipídica/solução de proteína X concentração da solução de proteína X %EE. 136
- Figura 35:** Liberação de glicose em 30 minutos (%L30): A - Gráfico de Pareto com valor estimado dos efeitos principais e interações de segunda ordem para as variáveis estudadas na produção de micropartículas lipídicas contendo proteína, ao nível de 95% de confiança ( $p=0,05$ ). B - Superfície de Resposta para proporção mistura lipídica/solução de proteína X concentração da solução de proteína X %L30. 138
- Figura 36:** Sedimentações das micropartículas coacervadas produzidas com diferentes quantidades de recheio em relação a quantidade de polímeros de parede (base seca), acompanhadas pelo monitoramento das porcentagens de transmitância ao longo do tempo. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) para o tempo de 30 minutos. Coeficiente de variação (desvio padrão / média X 100) máximo = 3,9%. 140
- Figura 37:** Imagens obtidas por microscopia Confocal: Sistema 1: A – observação por transmitância, B- Goma arábica-FITC. Sistema 2: C – observação por transmitância, D - Gelatina- FITC (fluorescência observada - cor verde). Barras = 50  $\mu\text{m}$ . Observação e captação das imagens em aproximadamente metade da altura da micropartícula. 150
- Figura 38:** Imagens obtidas por microscopia Confocal: Gelatina-FITC + goma arábica sem coloração (fluorescência observada na cor verde) e 151

Gordura vegetal hidrogenada-*Nile Red* + caseína sem coloração (fluorescência observada na cor vermelha): A - Observação por transmitância; B - Gelatina-FITC; C - Gordura Hidrogenada-*Nile Red*; D - Sobreposição de B e C. Barras = 50  $\mu\text{m}$ . Observação e captação das imagens em aproximadamente metade da altura da micropartícula.

**Figura 39:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da estrutura interna de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído na concentração de 1,0mM/g.ptn, seca no *spray dryer*. Barra = 10 $\mu\text{m}$ . 152

**Figura 40:** Imagens obtidas por microscopia Confocal: Sistema Gelatina + goma arábica sem coloração e Gordura Hidrogenada-*Nile Red* (fluorescência observada na cor vermelha) + caseína-FITC (fluorescência observada na cor verde): A - Observação por transmitância; B - Caseína-FITC; C - Gordura Hidrogenada-*Nile Red*; D - Sobreposição de B e C. Barras = 50  $\mu\text{m}$ . Observação e captação das imagens em aproximadamente metade da altura da micropartícula. 153

**Figura 41:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas contendo óleosina de páprica e óleo de soja (1:1). A – Sem reticulação; B – Reticulação com transglutaminase (10U/g.ptn); C – Reticulação com glutaraldeo (0,1mM/g.ptn); D – Reticulação com glutaraldeo (1,0mM/g.ptn). Barras = 40 $\mu\text{m}$ . Captação em gua. Setas pretas = óleo não encapsulado 155

**Figura 42:** Imagens obtidas por micropartículas coacervadas sem reticulação secas em estufa. Microscopia eletrônica de varredura: Barras: A = 100  $\mu\text{m}$ ; B e C = 10  $\mu\text{m}$ . D - Microscopia ótica: amostra em gua. Barra = 40  $\mu\text{m}$ . 157

**Figura 43:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído (0,25mM por g de proteína) por três horas (A e C) ou *por 18 horas* (B e D), secas em estufa. Barras: A e B = 100  $\mu\text{m}$ , C e D = 10  $\mu\text{m}$ . 158

**Figura 44:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído (0,25mM/g.ptn) por três horas (A – captação em gua, C – captação em glicerina) ou *por 18 horas* (B – captação em gua, D – captação em glicerina), secas em estufa. Barras = 40  $\mu\text{m}$ . 159

**Figura 45:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído (1,0mM/g.ptn) por 3 horas (A e C) ou *por 18 horas* (B e D), secas em estufa. Barras: A e B = 100  $\mu\text{m}$ , C e D = 10  $\mu\text{m}$ . 160

- Figura 46:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído (1,0mM/g.ptn) por três horas (A – captação em água, C – captação em glicerina) ou por 18 horas (B – captação em água, D – captação em glicerina), secas em estufa. Barras = 40 µm. 161
- Figura 47:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas coacervadas sem reticulação secas por liofilização. Barras: A = 100 µm e B = 10 µm. setas pretas em B = pontas nas partículas. 163
- Figura 48:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas sem reticulação secas por liofilização. A – micropartículas liofilizadas (captação em glicerina, setas pretas = pontas nas partículas); B – micropartículas re-hidratada (captação em água, setas pretas = recheio não encapsulado). Barras = 40 µm. 164
- Figura 49:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas coacervadas secas por liofilizador: reticuladas com glutaraldeído (A e B – 0,1mM/g.ptn; C e D –1,0mM/g.ptn) e com transglutaminase (E e F – 10U/g.ptn). Período de reação de 18 horas. Barras: A, C e E = 100µm; B, D e F = 10 µm. 165
- Figura 50:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas secas por liofilização e re-hidratadas, reticuladas com glutaraldeído (0,1mM/g.ptn: A – captação em glicerina e B – captação em água; 1,0mM/g.ptn: C – captação em glicerina e D – captação em água) e com transglutaminase (10U/g.ptn: E – captação em glicerina e F – captação em água). Período de reação de 18 horas. Barras = 40 µm. 166
- Figura 51:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas coacervadas sem reticulação secas em *spray dryer*: A – aumento de 70 vezes; B – aumento de 250 vezes. Barras = 100 µm. 168
- Figura 52:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas sem reticulação secas em *spray dryer* (A – captação em água, B – captação em glicerina). Barras = 40 µm. 168
- Figura 53:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído com tempo de reação de três horas secas em *spray dryer*: A e B = 0,25mM/g.ptn; C e D: 1,0mM/g.ptn. Barras: A e C = 100 µm, B e D = 10 µm. 169
- Figura 54:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído com tempo de reação de três horas secas em *spray dryer*: A (captação em glicerina) e B (captação em água) = 0,25mM/g.ptn; C (captação em glicerina) e D (captação em água): 171

1,0mM/g.ptn. Barras: = 40  $\mu$ m.

**Figura 55:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído com tempo de reação de 18 horas secas em *spray dryer*. A e B = 0,1mM/g.ptn; C e D: 0,25mM/g.ptn; E e F = 1,0mM/g.ptn. Barras: A, C e E = 100  $\mu$ m, B, D e F = 10  $\mu$ m. 172

**Figura 56:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído com tempo de reação de 18 horas secas em *spray dryer*: 0,1mM/g.ptn: A (captação em glicerina) e B (captação em água); 0,25mM/g.ptn: C (captação em glicerina) e D (captação em água) e 1,0mM/g.ptn: E (captação em glicerina) e F (captação em água). Barras: = 40  $\mu$ m. 174

**Figura 57:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de partículas reticuladas com transglutaminase (10U) secas por *spray dryer* (TGSD): A – 250X (barra = 100 $\mu$ m); B – 500X (barra = 10 $\mu$ m). 175

**Figura 58:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas reticuladas com transglutaminase (10u/g.ptn, 18 horas) desidratadas em *spray dryer*: A (captação em glicerina) e B (captação em água). Barras = 40  $\mu$ m 176

**Figura 59:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas lipídicas contendo glicose. A – Aumento de 10x (barra = 40  $\mu$ m); B: Aumento de 20x (barra = 40  $\mu$ m). 177

**Figura 60:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas lipídicas. Sem recheio (A e B ); Contendo glicose (C e D); Contendo proteína (E e F). Barras = 100  $\mu$ m. 178

**Figura 61:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas contendo micropartículas lipídicas. A e B: Coacervados contendo MPL-GLI; C e D: Coacervados contendo MPL-PTN (C: 10X, D: 20X). As barras correspondem a 40 $\mu$ m. 180

**Figura 62:** Imagens obtidas por microscopia confocal de micropartículas lipídicas contendo proteínas: A - Mistura lipídica marcada com *Nile Red*; B – proteína marcada com FITC; C – composição de A e C com imagem DIC, D – imagem DIC. Barras = 50  $\mu$ m. Observação e captação das imagens em aproximadamente metade do diâmetro da micropartícula. 181

**Figura 63:** Imagens obtidas por microscopia confocal de coacervados contendo micropartículas lipídicas contendo proteínas: A – Mistura lipídica marcada com *Nile Red*; B – Gelatina da parede do coacervada marcada com FITC; C – imagem DIC; D – composição de A e B com imagem DIC. Barras 182

= 50  $\mu\text{m}$ . Observação e captação das imagens em aproximadamente metade da altura da micropartícula.

**Figura 64:** Perfis de liberação ao longo do tempo de oleoresina de páprica contida em micropartículas coacervadas sem reticulação (SR), reticuladas com glutaraldeído (0,1mM/g ptn – 0,1G e 1,0mM/g.ptn – 1G) ou com transglutaminase (10U/g.ptn - TG) úmidas, em etanol absoluto. 185

**Figura 65:** Perfis de liberação ao longo do tempo de oleoresina de páprica contida em micropartículas coacervadas sem reticulação (SRL), reticuladas com glutaraldeído (0,1mM/g ptn – 0,1GL e 1,0mM/g.ptn – 1GL) ou com transglutaminase (10U/g.ptn - TGL) desidratadas por liofilização, em etanol absoluto. 186

**Figura 66:** Liberação de oleoresina de micropartículas coacervadas úmidas, secas por liofilização ou secas por *spray dryer*. A: reticulação com glutaraldeído 1,0mM (úmido – G1, liofilizado - G1L, *spray dryer* – G1SD); B: reticulação com glutaraldeído 0,1mM(úmido – G0,1, liofilizado - G0,1L, *spray dryer* – G0,1SD); C: reticulação com transglutaminase (úmido – TG, liofilizado - TGL, *spray dryer* – TGSD). As curvas coloridas representam os sistemas sem reticulação: vermelha: sem reticulação úmido (SR), verde: sem reticulação liofilizado (SRL). 188

**Figura 67:** Perfis de liberação da glicose contida em micropartículas lipídicas obtidos com ou sem agitação e em diferentes temperaturas ao longo do tempo. 191

**Figura 68:** Perfis de liberação da proteína contida em micropartículas lipídicas, em concentrações crescentes, obtidos em diferentes temperaturas ao longo do tempo. 194

**Figura 69:** Liberação total (%) de compostos hidrofílicos (glicose ou proteína) contidos em micropartículas lipídicas encapsuladas por coacervação complexa. 197

**Figura 70:** Esquema de execução do experimento *in vivo* com larvas de pacu. 205

**Figura 71:** Dietas coacervadas produzidas para experimento com larvas de pacu. A: D2 – Parede: gelatina convencional/goma arábica – recheio: óleo de soja e astaxantina; B: D3 – Parede: gelatina convencional/goma arábica – recheio: gordura de peixe e astaxantina; C: D4 – Parede: gelatina de peixe/goma arábica – recheio: óleo de soja e astaxantina; D: D2 – Parede: gelatina de peixe/goma arábica – recheio: gordura de peixe e astaxantina. Barras = 40  $\mu\text{m}$ . 208

**Figura 72:** Estômagos de larvas de pacu contendo algumas das dietas estudadas. A – Dieta desidratada (D1): 1 – Estômago fechado; 2 – 213

Estômago perfurado. B – Dieta coacervada (D2): 1 – Estômago fechado; 2 – Estômago perfurado. As setas verdes indicam as dietas. A seta vermelha mostra um cisto de Artêmia. Barras = 500 microns. E - Imagem reduzida da larva com uma escala de tamanho.

**Figura 73:** Perfil de aceitação das dietas pelas larvas ao longo do tempo 215  
(sem adição de estímulo químico – controle).

**Figura 74:** Perfil de aceitação das dietas pelas larvas ao longo do tempo 216  
(com adição de estímulo químico).

**Figura 75:** Distribuição do tamanho de partícula da dieta desidratada (D - A), 236  
da dieta adicionada de óleo (DO - B) e dos aglomerados finais obtidos  
DOPC (C) e DOGPC (D).

**Figura 76:** Aspecto e detalhes da parede das microcápsulas tratadas com 240  
glutaraldeído (1,0mM por g de proteína - 18 horas) secas por liofilização  
congeladas com nitrogênio líquido (congelamento rápido): Microscopia  
eletrônica de varredura: A – barra = 100 $\mu$ m; B e C – barras = 10 $\mu$ m; D –  
barra = 1 $\mu$ m. Microscopia ótica: E – captação em óleo, barra = 40  $\mu$ m.

**Figura 77:** Curva padrão de oleoresina em etanol. 241

---

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Produção e Utilização de Pescados no Mundo*	7
<b>Tabela 2:</b> Produção mundial (%) total dos vários tipos de produto da aqüicultura em 2000*	8
<b>Tabela 3:</b> Produção mundial (%) em 2000, dividida por regiões*	8
<b>Tabela 4:</b> Produção mundial de carne dividida pela origem animal (% sob 254,8 milhões tons)*	9
<b>Tabela 5:</b> Cotação de preços de alimentos para larvas de peixe*	11
<b>Tabela 6:</b> Trabalhos recentes sobre microencapsulação	20
<b>Tabela 7:</b> Formulação da dieta fornecida pelo Centro de Aqüicultura da UNESP –Jaboticabal - SP.	44
<b>Tabela 8:</b> Condições de processamento da secagem por <i>spray dryer</i> da dieta para pacu fornecida pelo Centro de Aqüicultura de Jaboticabal.	53
<b>Tabela 9:</b> Composição centesimal em base seca da dieta desidratada obtidas por <i>spray dryer</i> .	53
<b>Tabela 10:</b> Dietas finais avaliadas:	61
<b>Tabela 11:</b> Composição centesimal (%) da dieta sem recobrimento, dieta adicionada de óleo e amostras produzidas no aglomerador.	61
<b>Tabela 12:</b> Dietas comerciais importadas com boa aceitação e boa manutenção do crescimento das larvas, usadas como referências em ensaios biológicos.	68
<b>Tabela 13:</b> Diâmetro médio das partículas da dieta desidratada e dos aglomerados – produtos finais.	71
<b>Tabela 14:</b> Determinação de tamanho de partícula com e sem ultra-som para aglomerados que sofreram recobrimento polimérico.	73
<b>Tabela 15:</b> Densidade aparente da dieta sem recobrimento, dieta adicionada de óleo e amostras produzidas no aglomerador.	76
<b>Tabela 16:</b> Atividade de água da dieta sem recobrimento, da dieta adicionada de óleo e das amostras produzidas no aglomerador.	77
<b>Tabela 17:</b> Variáveis avaliadas nos testes preliminares na produção de micropartículas por coacervação complexa.	91
<b>Tabela 18:</b> Variáveis e respectivos níveis usados no planejamento experimental.	92
<b>Tabela 19:</b> Condições de processo e preparo das amostras de micropartículas coacervadas contendo oleoresina/óleo para secagem.	95
<b>Tabela 20:</b> Variáveis e níveis do planejamento experimental 2 <sup>3</sup> utilizado no estudo de produção de micropartículas lipídicas contendo glicose (MPL-GLI).	97

<b>Tabela 21:</b> Variáveis e níveis do planejamento experimental 2 <sup>3</sup> utilizado no estudo de produção de micropartículas lipídicas contendo proteína (MPL-PTN).	97
<b>Tabela 22:</b> Lotes de micropartículas coacervadas e micropartículas produzidos com ingredientes marcados por corantes fluorescentes para microscopia confocal.	102
<b>Tabela 23:</b> Amostras produzidas para avaliação da liberação de oleoresina de micropartículas coacervadas.	106
<b>Tabela 24:</b> Condições usadas na produção de micropartículas coacervadas.	111
<b>Tabela 25:</b> Diâmetro médio, distribuição de tamanho das micropartículas e morfologia para as amostras produzidas com diferentes homogeneizações da emulsão recheio/gelatina.	112
<b>Tabela 26:</b> Diâmetro médio, distribuição de tamanho das micropartículas e morfologia para as amostras produzidas com aumento crescente de recheio	114
<b>Tabela 27:</b> Diâmetro médio, distribuição de tamanho das micropartículas e morfologia para as amostras produzidas com aumento crescente de polímeros	117
<b>Tabela 28:</b> Planejamento experimental (variáveis numéricas e codificadas) e resposta para avaliação da produção de micropartículas por coacervação.	119
<b>Tabela 29:</b> Condições de reticulação (glutaraldeído) e respectivos testes de secagem para micropartículas coacervadas contendo oleoresina/óleo de soja.	124
<b>Tabela 30:</b> Condições de reticulação (transglutaminase) e respectivos testes de secagem para micropartículas coacervadas contendo oleoresina/óleo de soja.	124
<b>Tabela 31:</b> Pontos de fusão das misturas de ácido esteárico (AE) e gordura vegetal hidrogenada (GVH).	128
<b>Tabela 32:</b> Planejamento experimental (variáveis numéricas e codificadas) e respostas para avaliação da produção de micropartículas lipídicas contendo glicose.	133
<b>Tabela 33:</b> Planejamento experimental (variáveis numéricas e codificadas) e respostas para avaliação da produção de micropartículas lipídicas contendo proteína.	133
<b>Tabela 34:</b> Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) determinado por microscopia ótica para micropartículas coacervadas úmidas, desidratadas por liofilização e por <i>spray dryer</i> , com captação em diversos meios.	142
<b>Tabela 35:</b> Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) de micropartículas coacervadas secas por liofilização ou por <i>spray dryer</i> re-hidratadas em água (10 minutos).	145
<b>Tabela 36:</b> Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ) e distribuição de tamanho de partículas das micropartículas lipídicas contendo compostos hidrofílicos (glicose e	147

proteína) e de micropartículas coacervadas contendo essas micropartículas lipídicas.

**Tabela 37:** Quantidades liberadas (%) ao longo do tempo de oleoresina de páprica contida nas micropartículas coacervadas sem reticulação, reticuladas com glutaraldeído (0,1mM/g ptn e 1,0mM/g.ptn) ou com transglutaminase (10U/g.ptn) úmidas ou desidratadas por liofilização, em etanol absoluto. 184

**Tabela 38:** Quantidade total de composto hidrofílico contido em cada tratamento de micropartículas lipídicas usados para determinação dos perfis de liberação 190

**Tabela 39:** Glicose liberada (em porcentagem) de micropartículas lipídicas sob diferentes condições ao longo do tempo 191

**Tabela 40:** Proteína liberada de micropartículas lipídicas sob diferentes condições ao longo do tempo. 193

**Tabela 41:** Total de composto hidrofílico (glicose ou proteína) contido nas duas amostras de micropartículas lipídicas (MPLs) utilizadas como recheio na encapsulação por coacervação. 196

**Tabela 42:** Concentrações iniciais de glicose ou proteína nos coacervados e quantidades liberadas (%) após 1 hora e 20 horas de permanência em água. 196

**Tabela 43:** Dietas produzidas para serem avaliadas em ensaio *in vivo*. 201

**Tabela 44:** Diâmetro médio das partículas de dietas coacervadas 209

**Tabela 45:** Peso e comprimento médios de larvas de pacu no período de experimentos. 212

**Tabela 46:** Percentual de aceitação das dietas pelas larvas de pacu ao longo do tempo 214

**Tabela 47:** Testes com transglutaminase sendo adicionada as micropartículas já formadas após o resfriamento. Partículas destruídas (PD), partículas parcialmente íntegras (PPI), partículas íntegras (PI).  $T_E / T_s$  – temperaturas de entrada e saída no spray dryer. 18 horas (ON). [1/6 H<sub>2</sub>O] - redução do volume de água de suspensão das partículas para 1/6 do volume da água usada na produção do coacervado. R – Referência (recheio emulsionado na gelatina); Inv – Sistema “invertido” (recheio emulsionado na goma arábica) 238

**Tabela 48:** Testes com transglutaminase sendo adicionada na etapa de emulsificação do recheio com um dos materiais de parede: R – Referência (recheio emulsionado na gelatina); Inv – Sistema “invertido” (recheio emulsionado na goma arábica). O pH foi mantido em 4,0 para todos esses testes.  $T_E / T_s$  – temperaturas de entrada e saída no spray dryer fixadas em 225/125° C. Partículas destruídas (PD), partículas parcialmente íntegras (PPI), partículas íntegras (PI). 18 horas (ON). [1/6 H<sub>2</sub>O] - redução do volume de água de suspensão das partículas para 1/6 do volume da água usada na 239

produção do coacervado.

**Tabela 49:** Testes com glutaraldeído sendo adicionado as micropartículas já formadas após o resfriamento. Partículas destruídas (PD), partículas parcialmente íntegras (PPI), partículas íntegras (PI). O pH foi fixado em 4,0 e  $T_E / T_s$  – temperaturas de entrada e saída no spray dryer de 225/125° C.

## ABREVIATURAS

%EE: Eficiência de encapsulação

%L30: Liberação de glicose em 30 minutos

/g.ptn: “por grama de proteína”

[1/6 H<sub>2</sub>O] - redução do volume de água de suspensão das partículas para 1/6 do volume da água usada na produção do coacervado

[GLI]: Concentração da solução de glicose

[PTN]: Concentração da solução de proteína

AE: Ácido esteárico

Aw: atividade de água

CMPL-GLI: Coacervados contendo micropartículas lipídicas contendo glicose

CMPL-PTN: Coacervados contendo micropartículas lipídicas contendo proteína

D: Dieta sem recobrimento

D1: Dieta fornecida pelo Caunesp, desidratada em spray dryer, adicionada de óleo de soja e aglomerada com pectina/cálcio.

D2: Coacervado: Parede: Gelatina/goma arábica. Recheio: óleo de soja(20% do material de parede, bs) e astaxantina (5% do total de óleo).

D3: Coacervado: Parede: Gelatina/goma arábica. Recheio: gordura de peixe (20% do mat.de parede, bs) e astaxantina (5% do total de óleo).

D4: Coacervado: Parede: Gelatina de peixe /goma arábica. Recheio: óleo de soja (20% do material de parede, bs) e astaxantina (5% do total de óleo).

D5: Coacervado: Parede: Gelatina de peixe/goma arábica. Recheio: gordura de peixe (20% do material de parede, bs) e astaxantina (5% do total de óleo).

DO: Dieta adicionada de óleo milho (adição manual)

DOPC: Dieta adicionada de óleo, recoberta com gelatina e pectina/cálcio

DOPC: Dieta adicionada de óleo, recoberta com pectina – cálcio

d<sub>p</sub>: diâmetro médio da partícula

FITC: isotiocianato de fluoresceína

G0,1: Micropartículas coacervadas reticuladas com 0,1mM de glutaraldeído/g de proteína, 18 horas, úmidas.

G0,1L: Micropartículas coacervadas reticuladas com 0,1mM de glutaraldeído/g de proteína, 18 horas, posteriormente secas por liofilização.

G0,1SD: Micropartículas coacervadas reticuladas com 0,1mM de glutaraldeído/g de proteína, 18 horas, posteriormente secas em *spray dryer*.

G1: Micropartículas coacervadas reticuladas com 1mM de glutaraldeído/ g de proteína, 18 horas, úmidas.

- G1L: Micropartículas coacervadas reticuladas com 1mM de glutaraldeído/ g de proteína, *18 horas*, posteriormente secas por liofilização.
- G1SD: Micropartículas coacervadas reticuladas com 1mM de glutaraldeído/ g de proteína, *18 horas*, posteriormente secas em *spray dryer*.
- GLI: glicose
- GVH: Gordura vegetal hidrogenada
- Inv: Sistema “invertido” (recheio emulsionado na goma arábica)
- JP400: Dieta de procedência japonesa com diâmetro médio de 400 microns
- JP700: Dieta de procedência japonesa com diâmetro médio de 700 microns
- LIP/GLI: Proporção entre mistura lipídica e solução de glicose
- LIP/PTN: Proporção entre mistura lipídica e solução de proteína
- MPL-GLI: Micropartículas lipídicas contendo glicose
- MPL-PTN: Micropartículas lipídicas contendo proteína
- MPLs: micropartículas lipídicas
- PD: Partículas destruídas
- PI: partículas íntegras
- PPI: Partículas parcialmente íntegras
- PTN: proteína
- R: Referência (recheio emulsionado na gelatina)
- SDS: Dodecil sulfato de sódio
- SR: Micropartículas coacervadas sem reticulação úmidas.
- SRL: Micropartículas coacervadas sem reticulação posteriormente secas por liofilização
- T<sub>E</sub>: temperatura de entrada
- TG: Micropartículas coacervadas reticuladas com 10U de enzima/g de proteína, *18 horas*, úmidas.
- TGL: Micropartículas coacervadas reticuladas com 10U de enzima/g de proteína, *18 horas*, posteriormente secas por liofilização.
- TGSD: Micropartículas coacervadas reticuladas com 10U de enzima/g de proteína, *18 horas*, posteriormente secas em *spray dryer*.
- T<sub>S</sub>: temperatura de saída
- USA: dieta de procedência americana
- $\rho_g$ : densidade do gás
- $\rho_p$ : densidade efetiva da partícula

---

## RESUMO

A microencapsulação é uma técnica para recobrimento de substâncias para a proteção e/ou liberação controlada das mesmas. As microcápsulas podem ser uma alternativa para obtenção de uma dieta para alimentação das larvas de peixe na piscicultura intensiva. Dois métodos de microencapsulação foram empregados para produção de micropartículas, potenciais na substituição do alimento vivo (rotíferos e artêmias) oferecido às larvas de peixe nos primeiros estágios de desenvolvimento.

O primeiro baseou-se na secagem em *spray dryer* de uma dieta líquida. Essa dieta desidratada sofreu aglomeração e recobrimento para manipulação do diâmetro médio das partículas e solubilidade. Os diâmetros médios dos aglomerados foram significativamente maiores que da dieta desidratada sem aglomeração. As solubilidades em sólidos solúveis e em proteínas solúveis da dieta sem recobrimento foram altas para 120 minutos de permanência em água. A adição de óleo à dieta desidratada e o recobrimento polimérico reduziu esses valores de solubilidade. O aspecto apresentado pela dieta desidratada sem recobrimento foi característico de produtos desidratados por *spray dryer*. Os aglomerados apresentaram camada de recobrimento com falhas, o que justificou as baixas diminuições de solubilidades observadas.

O segundo processo de microencapsulação foi a coacervação complexa entre gelatina e goma arábica, e como recheios foram utilizados uma mistura de oleoresina de páprica e óleo de soja e dois compostos hidrofílicos (glicose ou isolado protéico de soro de leite) retidos em matrizes lipídicas sólidas. Por microscopias diversas (confocal, ótica e eletrônica de varredura) as micropartículas coacervadas se apresentaram esféricas e multinucleadas. As micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja foram reticuladas com glutaraldeído ou com transglutaminase, e submetidas à secagem por estufa com circulação de ar, liofilizador e *spray dryer*. A secagem em estufa não permitiu a obtenção de um material com micropartículas individualizadas enquanto a liofilização permitiu a manutenção da estrutura esférica para todas as amostras inclusive a sem reticulação. A secagem em *spray dryer* apresentou baixíssimo rendimento, e só foi possível para micropartículas reticuladas, com integridade das estruturas associada ao tipo/concentração de reticulante. A liberação da oleoresina foi avaliada em etanol absoluto por 120 minutos, para as micropartículas coacervadas úmidas com e sem reticulação e suas respectivas amostras desidratadas. A liberação do recheio foi alta (acima de 95%) para todas as amostras úmidas, exceto para a amostra reticulada com 1,0mM/g.ptn de glutaraldeído. As amostras desidratadas por liofilização tiveram liberação de seu conteúdo reduzida, não ultrapassando 35,4% após 120 minutos para todos os tratamentos. A liberação do recheio das micropartículas desidratadas por *spray dryer* foi baixa e proporcional a manutenção da integridade das partículas. Para veiculação dos compostos hidrofílicos nos coacervados, foram produzidas micropartículas lipídicas (*spray chilling*). Essas micropartículas lipídicas foram incorporadas com sucesso nos coacervados. A liberação dos compostos solúveis

---

do interior dos coacervados foi maior para glicose que para a proteína, para 20 horas de permanência em água.

A aceitação das micropartículas produzidas foi avaliada em um ensaio biológico *in vivo* com larvas de pacu. Foram testadas uma dieta aglomerada e quatro coacervados produzidos utilizando gelatina bovina ou gelatina de peixe na parede e óleo de soja ou gordura de peixe como recheio. O nível de aceitação das dietas foi de maiores valores para os coacervados produzidos com gelatina bovina/gordura de peixe e gelatina bovina/óleo de soja, seguidos pelo coacervado produzido com gelatina de peixe/óleo de soja, pelo aglomerado e por último o coacervado produzido com gelatina de peixe/gordura de peixe. Os coacervados produzidos com gelatina bovina contendo óleo de soja ou gordura de peixe apresentaram-se promissores como dietas necessitando ainda de ajustes nutricionais para atenderem as exigências das larvas em crescimento.

## SUMMARY

The microencapsulation is one technique for covering or evolving substances with the aim to provide protection and/or controlled release of the same ones. The microcapsules can be an alternative for attainment of a diet for feeding of the larvae of fish in the intensive aquaculture. Two methods of microencapsulation had been used for production of microparticles in the substitution of the alive food (rotifers and *artemias*) offered to the larvae of fish in the first periods of growing.

The first one was based on the spray drying of one nutritionally and balanced liquid formulation. The dehydrated diet was agglomerated adjust the average size and solubility of the particles. The size of the agglomerated particles was increased efficiently. The solubilities in total soluble solids and soluble proteins of the diet without covering had been high with values (above 50%) for 120 minutes of permanence in water. The addition of oil to the dehydrated diet (OD) and the agglomeration with pectate and calcium reduced the values of solubility. The aspect presented for the diet dehydrated without covering was characteristic of products dehydrated by spray dryer. The surface of the agglomerated particles presented some imperfections, which justified the low reductions of solubilities. The second process used was the complex coacervation between gelatin and acacia gum and as a core materials, a mixture of paprika oleoresin and vegetable soy oil and two hydrophilic composites (glucose or whey protein isolate). After, the lipidic microparticles were used as core material for microparticles obtained using complex coacervation. Using different types of microscopies (confocal, optical and scanning electronic microscopy) it was possible to characterize the coacervated microparticles that showed spherical geometry and multinuclear distribution of the core material. The microparticles containing paprika oleoresin of paprika and vegetable soy oil as core material had been crosslinked with glutaraldehyde or transglutaminase, and were dried using one oven with air circulation, spray dryer and freeze drying processes. The drying using oven did not allowed the attainment of a dry material presenting free flowing. The freeze drying, on the other side, allowed the attainment of microparticulated material showing spherical structure and free flowing for all samples including samples without cross-linking. The yield of the spray drying process was very low. This process did not work when non crosslinked samples were dried. The high level of cross-linking using 1.0mM/g of ptn showed the best results compared with transglutaminase or glutaraldehyde at 0.1mM/g of protein (reaction time of 18 hour for both) showing the maintenance of the moist microparticles structure. The release of the oleoresin was evaluated for the moist and dehydrated samples with and without crosslinking using ethanol as the release medium during 120 minutes. The core release observed was above 95% for moist coacervated without crosslinking, crosslinked using transglutaminase and for samples crosslinked with the low level of glutaraldehyde. The release level decreased when concentration of glutaraldehyde was increased.

Dried samples using freeze drying showed a great decrease on the release amount, not exceeding 35.4% after 120 minutes for all the treatments. The release of the core from the dehydrated microparticles using spray dryer was proportional to the maintenance of the integrity of particles. Again, cross-linking using high concentration of glutaraldehyde/g.ptn produced the best results. Lipidic microparticles had been incorporated successfully in the coacervated microparticles. The amount of released soluble composites using water solution was high to glucose and relative low for the protein after 20 hours of experiment.

The acceptance of the microparticles was evaluated in a live biological assay using larvae of pacu. A diet agglomerated with calcium pectate and four coacervated microparticles using bovine gelatin or fish gelatin as the wall materials and vegetable soy oil or fat fish as core materials had been tested. Ranking of acceptance of the diets showed bigger values for the coacervated microparticles produced with gelatin/fat fish or gelatin/soy oil, followed by the microparticles produced with fish gelatin/soy oil, agglomerated particles and finally coacervate particles using fish gelatin/fat fish. The coacervation process showed interesting results but improvement on the nutritional balance needs to be done.



## **CAPITULO 1.**

### **INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA**

A busca por uma qualidade melhor de vida nos dias atuais passa também por uma mudança de hábitos alimentares. Nesse sentido, o consumo de alimentos saudáveis e com funcionalidade nutritiva natural vem aumentando.

O peixe é um desses produtos, e seu consumo tem aumentado significativamente pelas pessoas que buscam fontes de proteínas animais alternativas à carne bovina, suína e de frango. O consumo de peixes vem crescendo no mundo todo nos últimos anos, em decorrência do aumento populacional e também por essas mudanças nos hábitos alimentares. Com isso a produção de peixes também vem aumentando bastante, passando de uma fonte de subsistência no passado, para uma atividade comercial em franco crescimento que atende ainda a uma série de propósitos sócio-econômicos, como geração de empregos e incremento de renda de diversas populações na área rural.

A ampliação do setor de aquicultura vem exigindo inovações tecnológicas que permitam ampliar a produção, visando atender a crescente demanda mundial. A piscicultura intensiva é uma alternativa para produção de peixes em cativeiro. Os custos com a implementação de um manejo variam com o tamanho da instalação desejada, onde boa parte destes gastos (50%) é utilizada com a alimentação dos animais nos vários estágios de crescimento. Deste total, cerca de 75% são gastos com o fornecimento dos alimentos vivos necessários nos primeiros estágios de desenvolvimento das larvas de peixes.

Alternativas à utilização de alimentos vivos incluem o desenvolvimento de alimentos inertes (rações), de custo reduzido e de boa qualidade nutritiva, que possam substituir o alimento natural, atendendo às exigências de crescimento dos animais, nas diversas etapas de desenvolvimento. No entanto, larvas de peixes recém-eclodidas, de um modo geral, apresentam baixa assimilação dos alimentos inertes. A dificuldade em introduzir satisfatoriamente a dieta artificial na

alimentação das larvas são associados a limitações no trato digestivo, envolvendo seu baixo desenvolvimento e a deficiências no perfil enzimático, observados nos primeiros estágios de desenvolvimento.

Diversos processos podem ser empregados para produção de alimentos inertes. Dentre eles, a microencapsulação vem despontando como uma alternativa potencialmente interessante na obtenção de uma dieta, que apresente boa aceitação e manutenção do crescimento para as larvas de peixe.

A micropartícula é constituída por um recheio e por uma parede, que pode ter características variadas em função dos materiais utilizados e do processo empregado para sua formação. Biopolímeros em geral como gomas, amidos, proteínas e lipídios, podem ser usados como material de parede. Essa diversidade na produção das micropartículas permite a obtenção de combinações de ingredientes que atendam às necessidades nutricionais das larvas.

Além disso, as propriedades de retenção, proteção e liberação controlada, inerentes das micropartículas, tornam a técnica de microencapsulação muito interessante para produção de um alimento inerte. Essas propriedades permitem reter de nutrientes de tamanhos moleculares diferentes que podem ser liberados em situação específica, protegendo-os até a sua utilização, evitando que sejam lixiviados pela água. A técnica permite ainda, uma adequação no tamanho das partículas que atenda às características de alimentação das larvas dos peixes como o tamanho da boca, características do sistema digestivo-enzimático e de densidade da cápsula (flutuabilidade).

A tecnologia de microencapsulação ainda é pouco conhecida no Brasil e a necessidade de seu estudo vem crescendo com a exigência da indústria nacional em assimilar novas tecnologias que permitam oferecer produtos mais competitivos (diversificados e de alto valor agregado) ao mercado interno e externo.

Com o intuito de ampliar os conhecimentos sobre essa tecnologia, o laboratório de Controle de Qualidade/Depan vem desenvolvendo trabalhos com

---

microencapsulação (materiais de parede, recheios diversos e processos), e caracterização das microcápsulas. Em associação com o Centro de Aqüicultura da Unesp/Jaboticabal – SP, foi possível o desenvolvimento desse trabalho, que visou a utilização de técnicas de microencapsulação para produção de partículas com potencial para serem utilizadas como dietas inertes para larvas de pacu.

## **CAPITULO 2.**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **2.1. AQUICULTURA**

A aquicultura é definida pela **FAO [2003a]** como o cultivo de organismos aquáticos (peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas). A piscicultura é definida como um ramo da Zootecnia que atua sobre a atividade de criação de peixes [**Pesquisa Agropecuária, 2004**].

A aquicultura é uma atividade antiga, praticada desde quatro mil anos pelos chineses, quando era utilizada uma integração entre o cultivo dos peixes e as plantações de arroz. Registros mostram que a criação de peixes também foi exercida na Mesopotâmia, no período Romano e no Egito antigo [**FAO, 2003a; Piscicultura, 2003**].

Praticada inicialmente como fonte de subsistência, a aquicultura cresceu e se desenvolveu atendendo nos dias atuais a uma série de propósitos socioeconômicos [**FAO, 2003a**] tais como:

- Produzir alimento de alto valor nutritivo;
- Contribuir para o desenvolvimento rural, com geração de empregos e atividades correlacionadas;
- Promover atividades relacionadas à pesca esportiva e conseqüente desenvolvimento do turismo local;
- Cultivar espécies ornamentais e exóticas;
- Controlar o desenvolvimento de plantas aquáticas ou de doenças perigosas para o ser humano ou colheitas;
- Dessalinização e outras formas de recuperação do solo.

A aquicultura apresenta um grande potencial de desenvolvimento que, no entanto, ainda é muito pouco explorada. Os incrementos da atividade podem

trazer vantagens ao pequeno produtor rural como: gerar empregos na área rural, disponibilizar fontes alimentícias de alto valor nutritivo e preservar a biodiversidade aquática. Além disso, permite melhorar a renda familiar, diminuir o preço do pescado no mercado, favorecendo o aumento do consumo e aumentando da oferta de empregos diretos e indiretos, etc **[FAO, 2003a]**.

No panorama mundial, a falta de uma legislação específica para controle e gerenciamento desse agronegócio e de políticas governamentais de incentivo dificultam o crescimento do setor **[FAO, 2003a; Tiago, 2003]**. O Brasil apresenta um dos maiores potenciais do mundo para a produção de pescado, através da aqüicultura. A vastidão do território, rico em bacias hidrográficas, como: a bacia amazônica (responsável por 20% da água doce do mundo), águas represadas em açudes (5 milhões de hectares no Nordeste), reservatórios construídos para a geração de energia hidroelétrica ou para abastecimento urbano e 8 mil quilômetros de costa, que possibilita uma enorme e variada atividade de aqüicultura de espécies marinhas e de água doce **[Pesquisa Agropecuaria, 2004]**.

Na região do Distrito Federal, alguns projetos têm sido implementados na tentativa de aumentar a produção local para atender a demanda, que é bem maior que a média nacional (12,8kg *per capita*/ano em Brasília contra 6,4kg *per capita*/ano nacional). Com o incentivo do Pró-Rural DF, projetos como Produção e Comercialização de Peixe, Piscicultura Familiar, Processamento de Pescados e Pesca Esportiva, vêm ganhando espaço, permitindo o aproveitamento das condições favoráveis da região como: o clima, água e solo de boa qualidade. Atualmente existem 200 hectares de espelhos d'água já implantados, o que permitirá triplicar a oferta do produto na região **[Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003]**.

No Mato Grosso do Sul, na região pantaneira, existem atualmente 120 produtores e as toneladas de produto gerado atendem o mercado local e outros estados. O cultivo do pescado permite a subsistência de mais de 2000 famílias,

além de promover o turismo, que passou de 29,5% em 1995 para 32,7% em 1997 **[Piscicultura, 2003]**.

Em Santa Catarina, a produção de peixes de água doce perfaz 19% da produção nacional, gerando incremento na renda de mais de 20 mil famílias. A Universidade Federal de Santa Catarina vem desenvolvendo diversos projetos visando solucionar problemas relacionados a essa atividade. A implementação de um plantel de reprodutores, além de suporte ao desenvolvimento de tecnologias para cultivo de espécies nativas e estudos ecológicos vem contribuindo para um melhor aproveitamento dos recursos hídricos da bacia Uruguiaia **[Papo Ciência – UFSC, 2003]**.

Minas Gerais apresenta grande potencial hídrico, relativamente bem distribuído, com aproximadamente 4.586 km<sup>2</sup> em águas interiores, correspondendo a 6,9% do existente no Brasil e, apesar de ocupar o 4º lugar em superfície de águas interiores, os dados mostraram uma produção de aproximadamente 4000 t/ano de peixe, sendo, em sua maioria, produção extrativista. O consumo *per capita* de peixe na grande Belo Horizonte é de 4Kg e no interior, apenas 200g; sendo valores inferiores ao consumo médio do brasileiro **[Pesquisa Agropecuária, 2004]**.

O SEBRAE também vem incentivando a prática da piscicultura, criando parcerias para a ampliação da produção e para o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam o crescimento do setor **[Notícias-Sebrae, 2003]**.

### **2.1.1. Produção e consumo de peixes**

A piscicultura teve início no Brasil a partir de estudos científicos em 1927 e começou a se desenvolver mais rapidamente a partir da década de 70, seguindo a tendência mundial do setor **[FAO, 2003b; Piscicultura, 2003]**. O aumento populacional, um relativo aumento na renda *per capita*, os vários estudos

mostrando os benefícios da ingestão de carne de peixe e principalmente uma conscientização quanto à melhoria da qualidade de vida que envolve, dentre muitos fatores, a busca de uma alimentação mais saudável, são os principais responsáveis pelo aumento da demanda de pescado nos últimos anos [Espinola Filho, 1999; FAO, 2003b] como mostram os dados da FAO na Tabela 1.

Vários dados estatísticos apresentados pela FAO para o ano de 2000 (Tabelas 2 e 3) mostraram um aumento de 6,3% em relação ao ano anterior na produção mundial total, sendo a Ásia (mais especificamente a China), a detentora dos maiores valores, tanto para a produção por peso (91,3%), quanto pela movimentação financeira (82,1%).

**Tabela 1:** Produção e Utilização de Pescados no Mundo\*

<b>PRODUÇÃO</b> (milhões de toneladas)	<b>1994</b>	<b>1995</b>	<b>1996</b>	<b>1997</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>
<b>Continental</b>						
Por captura	6,7	7,2	7,4	7,5	8,0	8,2
Cultivado	12,1	14,1	16,0	17,6	18,7	19,8
Total	18,8	21,4	23,4	25,1	26,7	28,0
<b>Marinha</b>						
Por captura	84,7	84,3	86,0	86,1	78,3	84,1
Cultivado	8,7	10,5	10,9	11,2	12,1	13,1
Total	93,4	94,8	96,9	97,3	90,4	97,2
Total capturado	91,4	91,6	93,5	93,6	86,3	92,3
Total cultivado	20,8	24,6	26,8	28,8	30,9	32,9
Total de pescado	112,3	116,1	120,3	122,4	117,2	125,2
<b>UTILIZAÇÃO</b>						
Consumo Humano	79,8	86,5	90,7	93,9	93,3	92,6
Farinha de peixe e óleo	32,5	29,6	29,6	28,5	23,9	30,4
População (bilhões)	5,6	5,7	5,7	5,8	5,9	6,0
Consumo <i>per capita</i> (kg)	14,3	15,3	15,8	16,1	15,9	15,4

\*Adaptado de FAO [2003c]:

(<http://www.Fao.org/DOCREP/003/X8002E/x8002e00.htm#TopOfPage>)

\*\*Estimativa preliminar

**Tabela 2:** Produção mundial (%) total dos vários tipos de produto da aquicultura em 2000\*.

	Por peso (45.715.599 tons)	Por valor (56.466.981.900 US\$)
Peixes	50,4	55,9
Moluscos	23,5	16,8
Plantas aquáticas	22,2	9,9
Crustáceos	3,6	16,6
Outros	0,3	0,8

\*Adaptado de **FAO [2003c]**.**Tabela 3:** Produção mundial (%) em 2000, dividida por regiões.\*

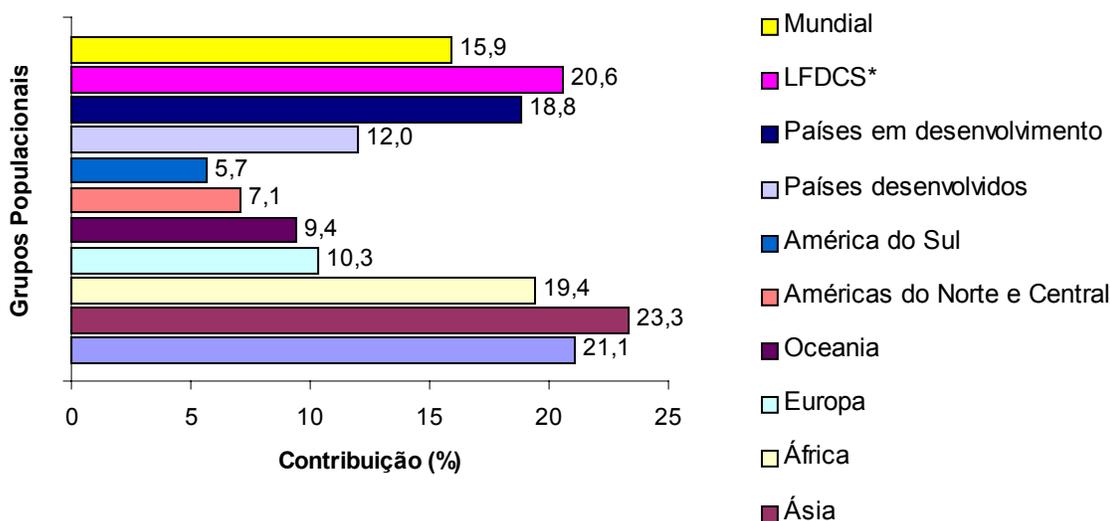
	Por peso (45.715.599 tons)	Por valor (56.466.981.900 US\$)
América Latina e Caribe	1,9	5,3
América do Norte	1,2	2,2
África	0,9	1,7
Oceania	0,3	0,5
Europa	4,4	8,2
Ásia	91,3	82,1

\*Adaptado de **FAO [2003c]**.

A **FAO [2003c]** ainda apresenta vários dados estatísticos situando a contribuição da aquicultura na produção mundial de carne (Tabela 4), e também a participação da proteína oriunda do pescado na dieta humana em várias regiões do mundo (Figura 1). Essa demanda é ditada por muitos fatores como: hábitos culturais, disponibilidade do produto e conseqüente preço no mercado, conscientização dos benefícios da ingestão de peixes, etc.

**Tabela 4:** Produção mundial de carne dividida pela origem animal (% sob 254,8 milhões tons).\*

Fonte protéica	(%)
Frango	22,8
Porco	35,2
Aquáticos	8,6
Boi/Vitela	22,2
Carneiro/ovelha	3,0
Outras	8,3

\*Adaptado de **FAO [2003c]**.**Figura 1:** Contribuição da proteína oriunda da carne de peixe na alimentação de vários grupos populacionais no mundo [**FAO, 2003**].

### 2.1.2. Criação de peixes para o consumo

A produção de peixes baseia-se na pesca extrativa e na piscicultura. A primeira é responsável pela maior parte da produção mundial, mas, em virtude das atuais variações climáticas e a poluição crescente das águas, vem sofrendo queda pela diminuição da quantidade de peixes disponível. Com isso, a piscicultura se apresenta como uma opção mais segura na obtenção de pescado e vem,

portanto, ganhando espaço na produção mundial nos últimos anos (aumento de 58% entre 1994 e 1999) **[FAO – 2000]**.

A piscicultura pode ser dividida em monocultivo, onde uma única espécie de peixe é cultivada, ou policultivo, onde diferentes espécies de hábitos alimentares diferentes são criadas. Existem ainda os consórcios entre a criação de peixes com outras criações de animais, como suínos e aves. Nesses sistemas, os resíduos produzidos nas culturas animais são aproveitados na alimentação dos peixes **[Apostila de Aquacultura, 2003]**.

A prática da piscicultura ainda pode ser extensiva, sendo praticada em açudes, represas e mananciais, sem controle dos predadores e baseada em alimentação natural como fitoplâncton, zooplâncton, sedimentos orgânicos e plantas aquáticas, já existentes nos locais de produção; semi-extensiva na qual a alimentação natural é reforçada com fontes baratas de alimentos ou intensiva com o uso de dietas balanceadas para acelerar o crescimento dos peixes, aumentando a produtividade e sem dependência da disponibilidade de alimentos naturais **[Apostila de Aquacultura, 2003]**.

A implementação e manutenção de um sítio de cultivo de peixes envolve investimentos em infra-estrutura, alimentação, matrizes, insumos diversos como nutrientes, agentes químicos para manutenção da qualidade de água, remédios, etc. A alimentação é responsável por cerca de 50% dos gastos de produção e nesse montante, até 75% são gastos com a produção de alimentos vivos (artêmia, rotíferos e zooplâncton), usados na alimentação das larvas de peixes nos primeiros estágios de crescimento **[Kolskovski, 2001; Langdon, 2003]**.

Muitos estudos vêm sendo conduzidos para o desenvolvimento de dietas inertes com o intuito de substituir o alimento vivo. O sucesso desses trabalhos, com a comercialização das dietas formuladas, implica em diminuição dos custos de produção, melhores condições microbiológicas do alimento oferecido e menor dependência de condições externas favoráveis ao cultivo do alimento vivo.

A Tabela 5 apresenta as diferenças entre custos de dietas formuladas e alimentos vivos numa cotação de preços, feita pela Internet.

**Tabela 5:** Cotação de preços de alimentos para larvas de peixe\*.

Site	Produto	Tipo	Preço Kg (US\$)
Artemia-international.com	Great Salt Lake Artemia cysts	Vivo	51,76
	San Francisco Original Artemia cysts	vivo	175,50
	artemia decapsulada	inerte	26,00
	Biomassa de artemia congelada	inerte	6,00
	Artemia Flakes	inerte	11,00
	Golden Pearls - Artemia replacement	microcápsulas	50,00
actwin.com/fish	Ovos de Artêmia	vivo	130,60
Miami-aquaculture.com	Great Salt Lake Strain Cysts	vivo	102,20
	San Francisco Bay Strain Cysts	vivo	164,70
	Lansy NRD 1/2 (Artemia reduction feed)	inerte	48,88
	Proton 1 (Artemia Reduction Feed)	inerte	54,13

\* Sites diversos da Internet (atualizada em setembro de 2005).

Para ser considerada uma boa candidata a substituir o alimento vivo, a dieta inerte deve atender algumas exigências. Inicialmente a dieta deve apresentar estabilidade em água com alta retenção de seus constituintes, além disso deve possuir características físicas (tamanho, rigidez, densidade) e químicas (não-tóxicas) que permitam sua ingestão pelas larvas. Deve também ser digerível pela larva, além de atender todas suas necessidades alimentares promovendo sua sobrevivência e o seu crescimento [Guthrie et al., 2000; Yúfera et al., 1996; Pedroza-Islas et al., 2000; Baskerville-Bridges & Kling, 2000; Kvale et al., 2005].

Com isso, para o desenvolvimento de uma dieta adequada, muitas características como requerimentos nutricionais (aminoácidos essenciais, lipídios e carboidratos, vitaminas, minerais), hábitos alimentares, características fisiológicas (constituição do trato gastrintestinal, composição em enzimas digestivas, tamanho de boca, tempo de digestão) das diversas espécies de peixes cultiváveis devem ser conhecidas, permitindo assim, a escolha da melhor forma para produção do alimento inerte [Millamena et al., 1999].

### 2.1.3. Dietas artificiais (micropartículas) e alimentação das larvas

Os primeiros estudos para desenvolvimento de um alimento inerte para larvas de peixe a partir de micropartículas datam de 1966 [Langdon, 1989]. Desde então, diversos tipos e métodos de produção de micropartículas vêm sendo estudados como potenciais na veiculação de nutrientes para larvas de peixes [Onal & Langdon, 2005]. As possibilidades de liberação controlada e modulação do tamanho da partícula são muito atraentes para adequação da dieta produzida às exigências específicas de cada tipo de larva [Kvale et al., 2005].

A perda de nutrientes hidrossolúveis, apresentada por alguns tipos de micropartículas, tem sido citada como limitações tecnológicas no seu emprego como substituto para alimentos vivos [Villamar & Langdon, 1993; Onal & Langdon, 2004 a e b; Onal & Langdon, 2005; Baskerville-Bridges & Kling, 2000; Kvale et al., 2005; Mukai-Corrêa et al., 2005]. A solubilidade da dieta interfere no perfil nutricional da mesma, pela perda de nutrientes, e na manutenção da qualidade da água do tanque de cultivo, permitindo a proliferação de flora bacteriana indesejável, aumentando as taxas de demanda biológica de oxigênio, dentre outros problemas que podem comprometer seriamente a saúde e o desenvolvimento das larvas implicando em prejuízos para o produtor [Yufer et al., 1999; Bitancourt, 2003; Obaldo et al., 2002; Kvale et al., 2005].

A capacidade digestiva das larvas é, muitas vezes, um fator limitante à utilização dos alimentos inertes nos primeiros estágios de desenvolvimento. O processo de digestão e absorção de nutrientes das larvas recém-eclodidas não é totalmente esclarecido. Diversos autores discutem diferentes teorias que explicam as mudanças no trato gastrointestinal e as influências dessas mudanças na capacidade das larvas de converterem os alimentos e gerar crescimento.

Algumas dessas teorias estão associadas ao fato de muitas espécies possuírem limitações digestivas, como um aparelho digestivo incompleto, ausência de algumas enzimas, dentre outras. Estudos indicam que os alimentos vivos (artêmias e rotíferos) podem ajudar no desenvolvimento do trato

gastrointestinal contribuindo com enzimas exógenas e apresentando perfil protéico mais adequado ao crescimento saudável das larvas [Langdon, 2003; Kolkovski, 2001]. Em outra teoria, fatores como liberação de compostos do alimento vivo, estimulam a produção de enzimas digestivas e de substâncias facilitadoras da digestão [Kolkovski, 2001].

A constituição das dietas inertes também é relacionada à baixa capacidade de promover crescimento apresentado por algumas dessas. A utilização de proteínas e outros constituintes de baixa digestibilidade pelas larvas e a baixa umidade de muitos tipos de dietas (60-90% de massa seca em contraponto ao alimento vivo que varia entre 10 a 15%) podem dificultar a digestão dessas partículas pelas larvas [Langdon, 2003].

Além do aspecto relacionado à digestão da dieta, a aceitabilidade da mesma pelas larvas, também está diretamente relacionada com sua sobrevivência e desenvolvimento. Muitas vezes as dietas inertes apresentam aceitabilidades menores que dos alimentos vivos, acarretando em taxas de crescimento também menores. Em diversos casos, a aceitabilidade das dietas inertes é elevada e, no entanto, o desenvolvimento das larvas é inferior ao apresentado por larvas que ingeriram o alimento vivo, sugerindo a existência de fatores nutricionais, presentes no alimento vivo, que melhoram a conversão dos nutrientes para ganho de peso [Kolkovski, 2001].

Características como o tipo de fonte de proteínas (vegetal, animal ou uso de hidrolizados) e lipídios, forma de produção das dietas, tipos de material de parede utilizados, podem influir na aceitabilidade da dieta inerte. Manipular características de tamanho, densidade e cor também podem melhorar essa aceitabilidade [Onal & Langdon, 2005].

Yúfera et al. [1996] trabalharam com dietas microencapsuladas e concluíram que, microcápsulas com paredes menos rígidas, ofereciam um bom sistema para o desenvolvimento de uma dieta inerte para larvas de peixes. Allarcón et al. [1999] estudou a digestibilidade *in vitro* de microcápsulas

produzidas com a utilização de diversas proteínas como material de parede (inclusive caseína), concluindo que o grau de hidrólise da caseína, determinado no trabalho, indicou essa proteína como favorável no uso em dietas inertes para peixes.

**Yufera et al. [1999]** realizou um estudo *in vivo*, comparando o desenvolvimento de larvas alimentadas com uma dieta microencapsulada com outras alimentadas com rotíferos, com resultados razoáveis para as microcápsulas, quanto à sobrevivência e crescimento das larvas. **Pedroza-Islas et al., [2000]** microencapsularam uma dieta formulada utilizando três polímeros e suas misturas, como material de parede e estudaram as diferenças de microestrutura, tamanho de partícula e distribuição do recheio nas diversas cápsulas obtidas. **Marchetti et al. [1999]** recobriu peletes e dietas extrusadas com óleo para evitar a lixiviação de vitaminas, tendo bons resultados quanto a estabilidade da dieta e retenção dos componentes. **Mukai-Corrêa et al. [2004]** estudaram o potencial de microcápsulas produzidas por gelificação iônica como veiculador de nutrientes para larvas de peixe.

Quanto a aceitabilidade das dietas, os estudos dos chamados estímulos da alimentação, vêm ganhando espaço como uma alternativa interessante no aumento da ingestão das dietas inertes. Esses estímulos podem ser baseados na co-alimentação das larvas, onde o alimento vivo e a dieta inerte são oferecidos ao mesmo tempo, ou na utilização de compostos químicos ou estímulos físicos que incentivem a ingestão da dieta inerte pelas larvas. Os estímulos químicos são baseados em compostos como aminoácidos ou peptídeos, que são secretados como metabólitos pelo alimento vivo e que atuam como estimulantes do “apetite” das larvas **[Kolkovski, 2001]**. Os estímulos físicos baseiam-se no aspecto da dieta (tamanho, cor, densidade, possível movimentação) que possam atrair a atenção da larva, estimulando-a ao consumo das partículas.

**Chu & Ozkizilcik [1999]** aumentaram de 75 para 100% (número de larvas a ingerir as micropartículas) de ingestão de dieta inerte com a co-alimentação com

artêmias. **Papatryphon & Soares Jr. [2000]** realizaram uma série de estudos na determinação de aminoácidos e suas combinações como estimulantes da ingestão de alimento por larvas de peixe. **Pedroza-Islas et al. [2004]** avaliaram comparativamente a sobrevivência de larvas co-alimentadas com dietas inertes e microalgas com outras alimentadas com microalgas e artêmias, obtendo taxas de sobrevivência acima de 90% para as microdietas.

Diversos trabalhos vêm sendo realizados para obtenção de dietas inertes com baixa lixiviação e alta aceitabilidade. O uso de micropartículas lipídicas ou emulsões para retenção dos componentes hidrossolúveis dentro de micropartículas poliméricas, têm apresentado resultados promissores na encapsulação de aminoácidos, vitaminas, peptídeos, sais, etc **[Villamar & Langdon, 1993; Buchal & Langdon, 1998; Chu & Ozkizilcik, 1999; Onal & Langdon, 2004 a e b; Mukai-Corrêa, 2003; Onal & Langdon, 2005]**. Outras técnicas, como aglomeração e recobrimento, podem ser empregadas para melhorar a estabilidade das dietas **[Cahu & Zambonino-Infante, 2001; Kvale et al., 2005]**.

Apesar de resultados não muito favoráveis em diversos trabalhos, os pesquisadores da área, acreditam que as micropartículas possam vir a substituir completamente o alimento vivo. Para que isso se torne uma realidade, minimizando os custos e maximizando a produção, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos para aumentar o conhecimento sobre a fisiologia e comportamento das larvas dos animais cultivados, paralelamente ao estudo de métodos de microencapsulação capazes de produzir partículas adequadas.

## **2.2. MICROENCAPSULAÇÃO**

A microencapsulação é um procedimento para revestimento e proteção de substâncias, estudada desde algumas décadas com as primeiras aplicações na indústria de fotocópias [Fanger, 1974]. Nos últimos trinta anos os estudos dessa técnica permitiram a ampliação do seu uso para a indústria de alimentos, farmacêutica, aromas e sabores, tintas, química, agrícola, dentre outras [Fanger, 1974; Pothakamury & Barbosa-Cánovas, 1995; Ré, 1998; Wieland-Berghausen et al., 2002].

O conceito primário e também o modelo mais bem sucedido de microencapsulação é observado nas células vivas, nas quais uma membrana natural protege os componentes celulares, e exerce função importante no metabolismo, controlando seletivamente a entrada e saída de substâncias das células [Fanger, 1974].

A microencapsulação pode ser definida resumidamente como um procedimento no qual se recobre uma substância de interesse por um material que a isole total ou parcialmente do ambiente, formando cápsulas. Na indústria de alimentos, a microencapsulação vem sendo aplicada com sucesso na proteção de substâncias sensíveis à temperatura, oxidação, umidade, reações indesejáveis, como acidulantes, flavorizantes, corantes, enzimas, microorganismos, sais minerais, lipídeos, vitaminas, aminoácidos [Bakan, 1973; Jackson & Lee, 1991; Karel, 1990].

Além da função de proteção, outras vantagens podem ser associadas à encapsulação de substâncias [Goodwin & Somerville, 1974; Shahidi & Han, 1993; Ré, 1998]:

- Conversão de substâncias líquidas ou gasosas em pós, permitindo sua melhor utilização em sistemas desidratados;
- Mascaram propriedades indesejáveis do material encapsulado como sabor, odor, pH, propriedades catalíticas, dentre outras;

- Permitir mecanismos de liberação controlada das substâncias encapsuladas para fins específicos nos produtos onde está veiculada.

Essas vantagens permitem que os produtos microencapsulados tenham melhor potencial de uso, tanto pela minimização na perda de suas características desejáveis (sejam estas nutricionais, sensoriais ou químicas) quanto pelo controle de sua ação no alimento, pela possibilidade de uma “liberação programada”.

A possibilidade de controle na taxa de liberação do material de recheio das cápsulas é uma das mais exploradas funções dessa tecnologia e está diretamente relacionada com características da parede formada como: estrutura química, espessura, tamanho, porosidade e solubilidade **[Fanger, 1974]**. Por sua vez, essas características determinam a permeabilidade e a difusividade do recheio pela parede. As características funcionais das cápsulas produzidas dependem, além do material de parede escolhido, das características do material de recheio, do método empregado na produção das microcápsulas e do meio onde serão utilizadas.

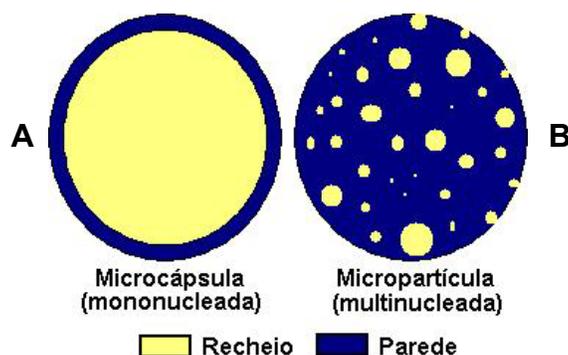
A liberação do material encapsulado segue uma série de etapas: absorção de solvente (muitas vezes a água) pela cápsula, dissolução ou erosão da parede, dissolução do recheio, permeação do recheio pela parede, difusão do recheio no solvente. A liberação de compostos das micropartículas pode ser representada por uma cinética de ordem zero, de primeira ordem ou em função da raiz quadrada do tempo **[Heger, 2001]**.

O controle da taxa de liberação é muito desejado no desenvolvimento de microcápsulas, e algumas variáveis que permitem esse controle são: o coeficiente de difusão, a espessura da parede da cápsula, a porosidade da mesma, a variação na concentração de saturação do material de recheio e sua distribuição na partícula **[Heger, 2001]**.

A microencapsulação pode produzir dois tipos básicos de estruturas que recebem nomes diferenciados em função da distribuição do recheio. Quando a

---

estrutura obtida é do tipo “reservatório” tem-se uma partícula mononucleada com uma quantidade de recheio envolvida por uma película de parede (Figura 2 A). Essa estrutura recebe o nome de microcápsula. Quando o recheio se distribui ao longo de uma estrutura do tipo “esponja” ou matriz tem-se uma partícula multinucleada que recebe o nome de microesfera ou micropartícula (Figura 2 B). O tipo de partícula produzido influi na quantidade de recheio carregado e no comportamento de liberação do mesmo.



**Figura 2:** Definição do tipo de estrutura obtido nos processos de microencapsulação. A: mononucleada – microcápsula; B: multinucleada – microesfera.

### 2.2.1. Material de parede

O material de parede é usado para cobrir, dar forma à cápsula, reter o recheio e permitir a sua liberação quando desejado. Sua escolha está relacionada com as propriedades físicas e químicas do recheio, o processo empregado para produção das microcápsulas e a aplicação final destas [Jakson & Lee, 1991; Nori, 1996]. Fundamentalmente, o material de parede não deve reagir com o recheio e nem ser solúvel neste, sendo que os dois muitas vezes têm polaridades opostas, ou seja, recheios de características apolares são microencapsulados por materiais de parede polares e vice-versa [Bakan, 1973; Fanger, 1974; Jakson & Lee, 1991; Cardoso, 2000].

Segundo Ré [1998] e Cardoso [2000], o material de parede deve apresentar as seguintes características tecnológicas:

- Boa propriedade emulsificante e de formação de filme;
- Baixa viscosidade, mesmo em soluções com alta concentração de sólidos;
- Baixa higroscopicidade e boas propriedades de secagem;
- Estabilidade, ausência de sabores desagradáveis, e boa proteção ao recheio.

Polímeros diversos como gomas, carboidratos, celuloses, lipídios, proteínas e alguns materiais inorgânicos (silicatos, argilas, etc.) apresentam as características supracitadas e são muito utilizados na microencapsulação de substâncias **[Jakson & Lee, 1991; Cardoso, 2000]**.

Em alguns casos, quando se desejam características especiais de solubilidade, permeabilidade, rigidez, dentre outras, os polímeros podem ser submetidos a alterações pelo uso de plasticizantes, reticulantes, enzimas, modificadores químicos, tratamentos na superfície e múltiplas coberturas **[Jakson & Lee, 1991; Ré, 1998; Lamprecht et al., 2000; Lamprecht et al., 2001; Lee & Rosenberg, 2000; Kruif et al., 2004]**.

No desenvolvimento de sistemas de microcápsulas com liberação controlada, o grande desafio é a manutenção da integridade da parede que controla a saída do material. Isso exige, em muitos casos, que o material usado na confecção da parede seja insolúvel ou parcialmente solúvel. Várias proteínas, devido às suas propriedades físico-químicas e conseqüente propriedades funcionais, como formação de gel e emulsificação, oferecem uma boa opção de material de cobertura **[Lee & Rosenberg, 2000]**.

A gelatina, a albumina, caseína e proteínas do soro de leite, proteínas da soja, bem como os polissacarídeos, como a pectina, celulose, goma arábica, alginatos, quitosana, vêm sendo estudados como material de cobertura para microencapsulados. Além das vantagens tecnológicas apresentadas por esses polímeros, eles também são componentes naturais, muitos de alto valor nutritivo, facilitando sua utilização em alimentos por serem considerados inócuos, diferente de alguns polímeros sintéticos, que muitas vezes não são permitidos, ou têm seu

uso limitado, devido a uma possível toxicidade [Pothakamury & Barbosa-Cánovas, 1995].

A Tabela 6 mostra diversos trabalhos publicados nos últimos anos sobre o uso de vários polímeros em microencapsulação de substâncias por diversas técnicas.

**Tabela 6:** Trabalhos recentes sobre microencapsulação.

Material de parede	Recheio	Mét. de encapsulação	Autores
Isolado protéico de soja	Óleo de Peixe	Gelificação térmica e/ou enzimática (transglutaminase)	Cho et al., 2003
Blenda de polímeros	Oleoresina de páprica	Spray Dryer	Rodriguez-Huezo et al., 2004
Gelatina+G. Arábica.	Óleos	Coacervação complexa	Lamprecht et al., 2000, 2001
Caseína	Fármacos	Coacervação Simples	Santinho et al., 1999.
Goma Arábica	Óleos essenciais	Spray dryer.	Bertolini, 1999
Prot.de soro de leite	Fármacos	Dupla emulsificação e enrijecimento por calor	Lee & Rosenberg, 2000.
Amido	Óleo de peixe	Spray dryer	Cardoso, 2000.
Lipídios (ponto de fusão > temp.ambiente)	Total ou parcialmente solúveis em água	Spray chilling	Langdon et al., 1998, 2004, 2005.
Alginato, goma gelana e pectina	Óleo e proteínas	Gelificação iônica	Mukai-Corrêa et al. 2004, 2005

### 2.2.1.1. Gelatina

A gelatina é uma proteína de alto peso molecular obtida pela hidrólise parcial do colágeno, proteína animal presente nos tecidos ligantes como na pele e nos tendões [Poppe, 1997; Chambi, 2004].

O ponto isoelétrico da gelatina pode variar em função da forma de obtenção da mesma. A gelatina obtida a partir da hidrólise ácida apresenta ponto isoelétrico na faixa alcalina (~9,4) devido às condições do processamento menos rígidas minimizando modificações nos grupos amida o que mantêm o valor próximo do pH

do colágeno. A gelatina obtida através de hidrólise alcalina é submetida a longos tratamentos com álcali e apenas uma pequena porção dos grupos aminas resiste ao processo (90-95% de ácido carboxílico livre). Nesse caso a proteína obtida apresenta ponto isoelétrico ácido na faixa de 4,8 e 5,2.

Devido ao seu caráter anfótero (carga negativa acima de seu ponto isoelétrico e carga positiva abaixo deste), propriedades de formação de géis e filmes termo-reversíveis, a gelatina apresenta-se como um material muito versátil na obtenção de micropartículas por diversos tipos de processos **[Poppe in Imeson, 1999; Bertan, 2003]**.

#### **2.2.1.2. Goma Arábica**

A goma arábica é uma goma natural exudada a partir de várias espécies de *Acacia*, sendo um hidrocolóide natural, hidrossolúvel, muito utilizada como agente espessante, emulsificante e estabilizante em sistemas alimentícios **[Thevenet, 1988]**. A goma arábica, extraída da espécie *Acacia Senegal*, é constituída por uma mistura complexa de sais (cálcio, magnésio e potássio) do ácido arábico (polissacarídeo composto por D-galactose, L-arabinose, L-ramnose, D-glicose e ácido D-glicurônico, associado a uma pequena fração protéica de 4%) que é o responsável pelas propriedades emulsificantes dessa goma **[Rodrigues, 2004]**. Devido às suas boas propriedades emulsificantes e estabilizantes, a goma arábica vem sendo bastante utilizada como material de parede para microcápsulas exercendo ação protetiva contra oxidação de voláteis **[Buffo, Reineccius & Oehlert, 2001]**.

### 2.2.1.3. Pectina

A pectina é um biopolímero obtido por extração aquosa a partir de algumas frutas, principalmente de maçãs e frutas cítricas. É composto principalmente por ácido galacturônico, podendo ser classificado como de alto ou baixo teor de metoxilação em função do conteúdo de grupos metoxilas. A formação de géis de pectinas de baixo teor de metoxilação ocorre da união das cadeias poliméricas através de íons bivalentes como o cálcio, formando uma estrutura conhecida como caixa de ovo [Mukai-Corrêa, 2003; Dias, 1999].

A pectina pode formar complexos com outros polímeros em função de seu balanço de cargas, que apresenta-se positivo em pHs elevados e negativo em pHs baixos [Nussinovitch, 1997]. Graças a essas características eletrostáticas e de formação de géis, a pectina apresenta-se como um bom material de parede usado nos processos de microencapsulação.

### 2.2.2. Recheio (oleoresina de páprica)

A páprica é uma especiaria de cor vermelha forte extraída de frutos secos da espécie *Capsicum annum L* (pimentão) [Borges, Pino & Fernández, 1997]. A cor própria do produto é decorrência do conteúdo elevado de carotenóides presentes, com cores variando entre vermelho e amarelo característicos dessa classe de componentes, que além de cor e sabor, ainda apresentam propriedades antioxidantes [Osuna-Garcia, Wale & Waddell, 1997]. Os principais carotenóides contidos na páprica, responsáveis por sua coloração vermelha, são a capsaxantina e a capsorubina [Hornero-Médez & Mínguez-Mosquera, 2001]. Tanto na forma seca moída quanto na forma de oleoresina (extrato líquido obtido em forma de óleo viscoso), é um dos corantes naturais mais utilizados na indústria de alimentos, especialmente no setor de embutidos [González et al., 1997; Rigo, 2001].

### 2.2.3. Produção das microcápsulas

Segundo **Ré [1998]** e **Cardoso [2000]**, os procedimentos para obtenção das microcápsulas podem ser divididos nos seguintes grupos básicos:

- Físico-químicos: Coacervação simples ou complexa, separação por fase orgânica, envolvimento lipossômico;
- Químicos: Polimerização interfacial, inclusão molecular;
- Físicos: *Spray drying*, *spray coating*, *spray chilling*, leite fluidizado, extrusão, centrifugação com múltiplos orifícios, co-cristalização, liofilização.

De um modo, geral a formação das cápsulas segue três etapas gerais que seriam: a preparação de uma suspensão ou solução com o material de parede e recheio seguido de homogeneização, deposição do material de parede ao redor do recheio e fixação ou solidificação da estrutura da parede, que pode ser feita por aquecimento, ligações cruzadas ou retirada do solvente [**Bakan, 1973**].

Dois tipos de sistemas parede-recheio podem originar as microcápsulas. Em um deles ocorre a formação de uma emulsão do tipo óleo em água ou vice-versa, e material de parede e recheio são carregados separadamente, em cada uma das fases da emulsão. No outro sistema, parede e recheio estão dispersos em uma única fase do mesmo solvente. Cada sistema produz cápsulas com características de retenção do recheio diferentes e conseqüentemente, podem apresentar características de liberação também distintas.

O método clássico de formação de microcápsulas é caracterizado por uma parede polar revestindo um recheio apolar ou vice-versa [**Bakan, 1973; Fanger, 1974; Jackson & Lee, 1991; Cardoso, 2000**]. A imiscibilidade entre o recheio e a solução/suspensão do material de parede é o que permite a formação inicial das cápsulas pois a homogeneização dessa mistura gera uma emulsão na qual a fase contínua é composta do solvente com o material de parede e a fase descontínua é o recheio. Segundo **Bakan [1973]**, o material de parede vai se depositando ao redor das gotículas (ou partículas em caso de material sólido) pela sorção do

polímero na interface entre o recheio e a fase líquida e isso é induzido pela redução da energia interfacial total do sistema. Com isso forma-se a cápsula ao redor do material, que então tem sua estrutura fixada por meio de calor, ligações cruzadas ou retirada de solvente **[Bakan, 1973]**.

Além do método convencional, outros estudos têm sido desenvolvidos para a produção de microcápsulas em sistemas onde material de parede e recheio estão dispersos no mesmo solvente. Nesses sistemas, a distribuição do recheio ocorre muitas vezes ao longo da matriz da parede, permitindo características de liberação diferentes do sistema clássico emulsionado.

#### **2.2.3.1. Microencapsulação por *Spray drying***

O processo de secagem por atomização ou *spray drying* vem sendo usado há décadas em diversos processos industriais para a obtenção de materiais desidratados na forma de pós finos. O processo é de relativo baixo custo, quando comparado à liofilização, e apresenta diversas vantagens como alta produtividade e rapidez (para instalações industriais), aplicabilidade para produtos termicamente sensíveis, dentre outras.

A secagem por *spray drying* é definida pela transformação de um material fluído (solução, dispersão ou pasta) para forma de partículas secas (pó) pela aspensão desse fluído em um meio de secagem aquecido (normalmente o ar) **[Ré, 1998]**. Este processo é uma operação contínua que envolve a atomização do fluído e sua mistura com o ar aquecido, evaporação do solvente e separação do produto seco **[Buffo et al., 2002]**.

As principais variáveis do processo de secagem por *spray drying* são de ordem operacional, como a temperatura do ar de entrada e saída, padrão do fluxo de ar, distribuição de temperatura e umidade, tempo de residência, e de ordem estrutural, como geometria da câmara e o tipo do atomizador **[Ré, 1998; Cardoso,**

**2000]**. Quanto às características relativas ao fluído atomizado, especial atenção é dada a viscosidade, solubilidade, estabilidade da solução/suspensão/emulsão formada, etc.

A microencapsulação por *spray dryer* baseia-se na obtenção de uma matriz que retém o composto de interesse na sua estrutura. Essa estrutura formada é normalmente do tipo “esponja”, com o recheio disperso ao longo da mesma. A distribuição do recheio faz dessa partícula um sistema multinucleado sendo adotado muitas vezes o termo microesfera para defini-la **[Teunou & Poncelet, 2002]**.

Devido às vantagens de secagem rápida, evitando que altas temperaturas afetem o recheio, relativo baixo custo, alta retenção do recheio e boa estabilidade quanto à estocagem **[Reineccius, 1988; Jackson & Lee, 1991; Ré, 1998; Oneda & Ré, 2003]**, esse processo vem sendo muito estudado para obtenção de partículas com utilizações diversas pela indústria farmacêutica, de alimentos, agrícola, dentre outras.

A formação da micropartícula por *spray drying* ocorre pela rápida perda de umidade da gotícula aspergida pelo atomizador e conseqüente formação de uma matriz rígida composta pelo material de parede. A eficiência na retenção do recheio está associada a parâmetros do processo como temperatura de secagem e tamanho de gotícula formada, características do material de parede, como temperatura de transição vítrea, tamanho das moléculas e características do recheio como polaridade, pressão de vapor, tamanho de molécula **[Ré, 1998; Cardoso, 2000; Reineccius, 1988]**. A retenção do recheio envolve também um fenômeno de difusão seletiva **[Ré, 1998]** onde numa primeira fase, o recheio se difunde na solução do material de parede. Com a rápida perda da umidade e o início da formação da matriz, o coeficiente de difusão do recheio, comparado ao da água, através da mesma, começa a diminuir rapidamente e assim ocorre a retenção, em paralelo à formação da parede da cápsula. As microcápsulas

formadas pelo processo de *spray drying* apresentam tamanhos variando entre 10 e 100 $\mu$ m [Buffo et al., 2002].

Associações entre processos de produção de microcápsulas vêm sendo empregadas para melhorar as propriedades e diversificar o uso das mesmas. Cápsulas formadas por processos como gelificação iônica, coacervação, inclusão molecular (ciclodextrinas), dentre outros, vem sendo desidratadas por processos de *spray dryer* e liofilização, muitas vezes com o propósito de aumentar a estabilidade ao armazenamento, melhorar a manuseabilidade e aplicabilidade das mesmas e em alguns casos, visando alterações em propriedades de liberação do recheio [Lamprecht et al., 2001; Oneda & Ré, 2003; Burgess & Ponsart, 1998; Martins, 2003].

Outro exemplo de associação possível é a aglomeração de partículas provenientes da secagem por *spray dryer*. A aglomeração permite uma modulação do tamanho das partículas finais e das taxas de dissolução desse material. Pode, ainda, promover um recobrimento adicional influenciando na cinética de liberação dos compostos aglomerados.

### 2.2.3.2. Aglomeração e recobrimento

A aglomeração e o recobrimento de partículas foram iniciados na indústria farmacêutica [Dewettinck et al., 1999; Jones, 1988; Buffo et al. 2002] e, desde então, esses dois processos vêm tornando-se técnicas muito empregadas nas indústrias química, alimentícia, dentre outras, com o objetivo de mudar propriedades de diversos produtos em pó, como tamanho, densidade, composição, estabilidade, cor, sabor, odor, solubilidade, etc [Jones, 1988; Goldszal & Bousquet, 2001; Saleh et al., 2003; Guignon et al., 2003; Buffo et al., 2002; Hemati et al., 2003; Teunou & Poncelet, 2002].

O controle dessas propriedades, permitindo a liberação controlada de substâncias, o ajuste do tamanho das partículas para fins específicos, a proteção contra condições desfavoráveis do meio, como luz e oxigênio, a melhora da manuseabilidade e fluidez de substâncias [Dewettinck et al., 1998; Dewettinck et al., 1999; Guignon et al., 2002; Saleh et al., 2003; Jono et al., 2000; Hemati et al., 2003; Teunou & Poncelet, 2002] faz do processo de aglomeração e recobrimento outro método de encapsulação comparado ao de *spray drying*, inclusão molecular, polimerização interfacial, coacervação, cocristalização, extrusão, etc [Teunou & Poncelet, 2002; Guignon et al., 2002].

Os processos de aglomeração podem ser divididos em três grandes grupos [Buffo et al., 2002]:

- Aglomeração por pressão (produção de tabletes);
- Aglomeração por crescimento (leito fluidizado, aglomeração por jato, peletização);
- Aglomeração durante a secagem (*spray drying*, drum drying).

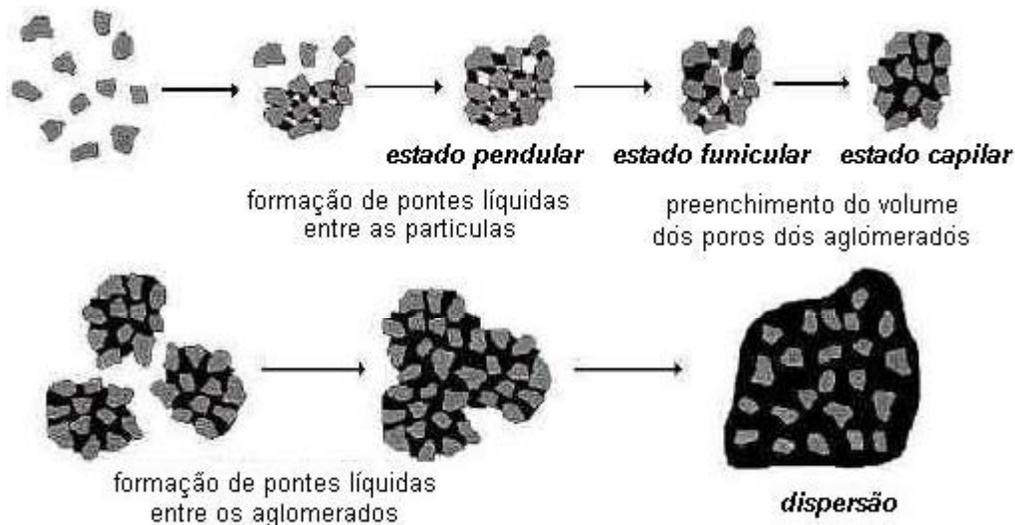
Além dessas categorias, o processo de aglomeração ainda pode ser classificado como úmido, quando usa-se uma solução para promover a ligação entre as partículas, ou seco, quando o processo não envolve a umidificação das mesmas [Buffo et al., 2002].

A aglomeração úmida é uma das técnicas para agregação de partículas muito empregada por vários segmentos da indústria [Buffo et al., 2002]. Nesse método a umidificação das partículas e a movimentação e colisão das mesmas são determinantes no crescimento dos grânulos e obtenção de um produto com características desejadas [Rossetti & Simons, 2003; Link & Schlünder, 1997].

Na aglomeração e recobrimento, a umidade das partículas pode ser definida em função da quantidade de líquido aderido a estas e é classificada por Goldszal & Bousquet [2001] em quatro estados (Figura 3). No primeiro, chamado “pendular”, as partículas individuais unem-se através de pontes líquidas formando

os aglomerados. Quando todas as possíveis pontes são formadas, as partículas aglomeradas atingem um tamanho crítico médio. A adição contínua da solução aglutinante, após o primeiro estado, faz com que os espaços interpartículas (ou porosidade do aglomerado), comecem a ser preenchidos por líquido, caracterizando o estado “funicular”. O completo preenchimento dos poros marca o ponto de saturação dos aglomerados chamado de estado “capilar”. Continuando com a adição da solução aglomerante, novas pontes líquidas são formadas, agora entre os aglomerados, gerando um segundo nível de porosidade. Quando esse espaço é completamente preenchido forma-se a dispersão sólido-líquido que define o quarto estado de umedecimento.

Em geral, a aglomeração deve ser conduzida entre os estados funicular e capilar, pois antes destes o número de ligações entre as partículas pode ser insuficiente para manter o agregado íntegro **[Goldszal & Bousquet, 2001]**. Em geral, desejando-se o recobrimento dos aglomerados, uma maior quantidade de solução deve ser aplicada, o que pode gerar o estado de dispersão, com partículas de tamanho indesejável que, no entanto, podem sofrer ajustes depois do processo **[Guignon et al., 2002]**. Após atingir o estado de umidificação desejado e conseqüente tamanho de aglomerados ideal, o material deve ser submetido a secagem para que tanto as pontes líquidas formadas quanto a película de recobrimento se tornem rígidas e mantenham as partículas coesas **[Buffo et al., 2002; Guignon et al., 2002]**.



**Figura 3:** Vários possíveis estados resultantes da interação macroscópica entre um líquido e um pó (adaptado de **Goldszal & Bousquet [2001]**).

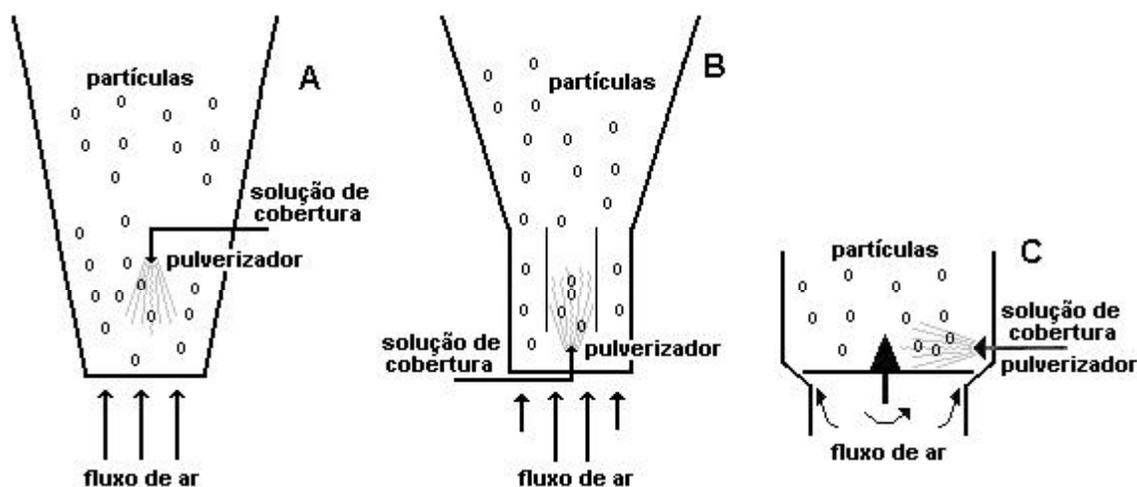
Segundo **Buffo et al. [2002]** a aglomeração úmida pode ser conduzida por métodos estáticos ou dinâmicos. No primeiro, as partículas permanecem em repouso e o líquido de recobrimento é pulverizado sobre elas. Nos métodos dinâmicos as partículas são mantidas em movimento juntamente com o líquido aspergido. A proximidade entre as partículas, juntamente com a umidade do ambiente e os choques, aumentam as forças de coesão do sistema favorecendo a formação das pontes líquidas que, após a secagem, mantêm a estrutura dos aglomerados. Sistemas de aglomeração em esteiras baseiam-se em métodos estáticos enquanto que leitos fluidizados, misturadores e tambores rotativos são exemplos que aplicam métodos dinâmicos para promover a aglomeração e recobrimento [**Buffo et al., 2002**].

Os sistemas de leito fluidizado foram desenvolvidos nos anos 60 para melhorar a eficiência de secagem de produtos farmacêuticos. O processo pode ser contínuo ou em batelada, sendo esse último de maior custo operacional [**Jones, 1988; Buffo et al., 2002**].

O princípio de funcionamento de um leito fluidizado pode ser resumido nas seguintes etapas: inicialmente as partículas são movimentadas na câmara por um

fluxo de ar, com ou sem aquecimento. Em seguida, a solução de aglomeração e recobrimento é aspergida, umidificando as partículas em movimentação que se chocam e aderem umas às outras provocando o crescimento dos grânulos. Com o fluxo de ar, o excesso de umidade é removido e formam-se as pontes sólidas entre as partículas, definindo a aglomeração que ocorre no processo. O revestimento das partículas corresponde à deposição da solução aglomerante na superfície das partículas durante o processo, seguido de secagem e formação de uma camada sólida sobre os grânulos [Guignon et al., 2002; Teunou & Poncelet, 2002; Saleh et al., 2003; Hemati, et al. 2003; Rossetti & Simons, 2003].

A Figura 4 mostra três possíveis sistemas para pulverização da solução de cobertura em leitos fluidizados propostos por Dewettinck & Huyghebaert [1999].



**Figura 4:** Leitos fluidizados com vários sistemas de aspersão da solução de cobertura: A - Aspersão contra-corrente ao fluxo de ar de fluidização das partículas, B - tipo *Wurster* com aspersão concorrente ao fluxo de ar de fluidização das partículas, C - aspersão tangencial ao fluxo de ar de fluidização das partículas (adaptados de Dewettinck & Huyghebaert, [1999]).

As técnicas de aglomeração e recobrimento são regidas por diversos parâmetros como temperatura, umidade, tamanho inicial das partículas, fluxo do ar, atomização da solução aglomeradora, dimensão do equipamento utilizado, sendo que o efeito de alguns destes sobre a formação dos grânulos são pouco

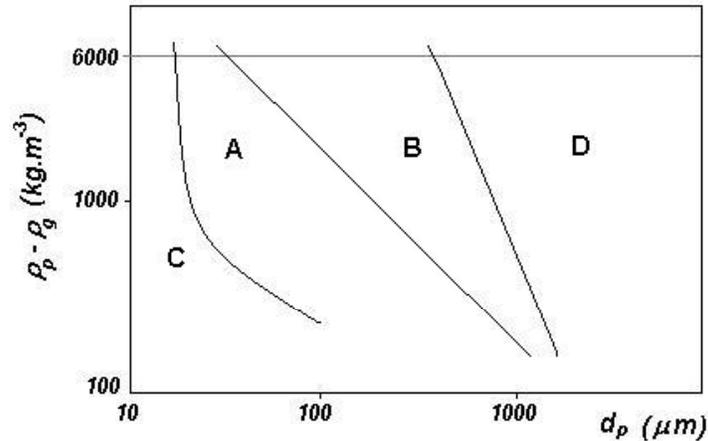
conhecidos, o que dificulta o controle do processo de granulação e, em última instância, as características do produto final **[Goldszal & Bousquet, 2001]**.

A fluidização das partículas é uma operação importante para que a aglomeração e o recobrimento das mesmas seja eficiente. A fluidização baseia-se na suspensão de partículas pela introdução de um fluxo de ar no sistema que gera um movimento com características de um fluido “em ebulição”, daí o nome leito fluidizado **[Dewettinck & Huyghebaert, 1999; Teunou & Poncelet, 2002; Guignon et al., 2002]**.

A fluidização é uma operação unitária complexa pois a trajetória das partículas não pode ser prevista. Ela é governada basicamente pela velocidade do gás de fluidização e pelas características das partículas **[Teunou & Poncelet, 2002]**.

A velocidade do gás usado na fluidização deve ser a mínima necessária para manter a partícula em suspensão (velocidade mínima de fluidização), permitindo sua recirculação no leito e mantendo o sistema estável. O valor dessa velocidade depende das características das partículas (tamanho, forma, densidade, porosidade, etc) e do gás utilizado (viscosidade e densidade) **[Teunou & Poncelet, 2002; Guignon et al., 2002]**.

As características do tamanho das partículas interferem sensivelmente na fluidização. Segundo Geldart, citado por diversos autores, as partículas podem ser classificadas em quatro grupos em função do tamanho e conseqüentemente seu comportamento durante a fluidização. Essa classificação é apresentada na Figura 5 **[Guignon et al., 2002; Teunou & Poncelet, 2002]**.



**Figura 5:** Classificação de partículas segundo Geldart. A e B = fácil fluidização; C = coesivo; D = granulado. ( $\rho_p$ ,  $\rho_g$ : densidade efetiva da partícula e densidade do gás;  $d_p$ : diâmetro médio da partícula) [Guignon et al., 2002].

Partículas localizadas na região A e B da Figura 5 possuem tamanho que permite uma fácil fluidização e o sistema permanece em equilíbrio durante o processamento. As partículas da região D necessitam em geral de uma agitação ou vibração durante o processo para auxiliar em sua fluidização. As partículas da região C possuem diâmetro médio inferior a 100 μm, tendendo a serem altamente coesivas, aderindo por forças eletrostáticas à parede do equipamento e umas às outras, sendo consideradas de difícil fluidização [Guignon et al., 2002; Teunou & Poncelet, 2002].

O sucesso do recobrimento usando o leito fluidizado depende da compreensão dos mecanismos que governam o crescimento das partículas, da eficiência operacional e da estabilidade do processo [Saleh et al., 2003; Hemati et al. 2003] além das características das partículas do produto a serem aglomeradas [Goldszal & Bousquet, 2002; Teunou & Poncelet, 2002; Guignon et al., 2003]. Pequenas variações nas condições do processo ou nas propriedades dos materiais podem ter impactos significantes na aglomeração [Mort et al., 2001].

A aglomeração e o recobrimento em leito fluidizado podem ser empregados na produção de dietas formuladas para larvas de peixes devido à possibilidade do

ajuste do tamanho, adequando-o ao da boca da larva e manipulação da solubilidade, textura e densidade das partículas.

Na produção de dietas, o recobrimento é empregado muitas vezes em peletes usados na alimentação de peixes na fase juvenil e adulta. Os materiais de cobertura mais utilizados são óleos, mas também podem ser utilizados outros polímeros (polissacarídeos e proteínas). O revestimento da dieta visa principalmente minimizar a lixiviação de nutrientes hidrossolúveis, como minerais e vitaminas, evitar a excessiva contaminação da água com material orgânico e manter a integridade da dieta por tempo suficiente para que o peixe ingira uma quantidade adequada ao seu desenvolvimento [Pezzato et al. 1997; Marchetti et al., 1999; Turchini et al., 2003; Kvale et al., 2005].

#### **2.2.3.3. Microencapsulação por coacervação**

O termo coacervação vem do latim “co” e “acervus” significando união e agregação de partículas e foi usado primeiramente por Bungenberg de Jong e Kruyt [DATA] para descrever o fenômeno de separação espontânea de fases que ocorre quando polieletrólitos são misturados em um meio aquoso [Vandergaer, 1974; Tolstoguzov, 1991; Thies, 1995; Menger et al., 2000; Ducel et al, 2004; Strauss & Gibson, 2004].

Para que a coacervação ocorra, duas condições têm que ser atendidas: uma é que os biopolímeros estejam juntos em solução e a outra é que as cargas opostas entre as cadeias de biopolímeros estejam em quantidade estequiométricas.

A mistura de soluções poliméricas pode resultar em interações segregativas, nas quais ocorre repulsão entre as cadeias de biopolímeros (incompatibilidade) ou associativas, nas quais ocorre atração entre os polímeros

(complexação) [Tolstoguzov, 1991; Schmitt et al., 1998; Kruif & Tuinier, 2001; Kruif et al., 2004].

Essas interações são regidas por princípios termodinâmicos que se baseiam na energia livre de Gibbs da mistura polimérica ( $\Delta G_M$ ), relacionando a entalpia e a entropia do sistema ( $\Delta H_M$  e  $\Delta S_M$ ) [Tolstoguzov, 1991; Schmitt et al., 1998; Kruif & Tuinier, 2001]. Pela segunda lei da termodinâmica, a mistura de um ou mais biopolímeros é possível quando a energia livre resultante ( $\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M$ ) é negativa. Nesse caso, as cadeias dos polímeros coexistem em solução, podendo se associar e formar complexos. Se a energia livre resultante é positiva, ocorre à incompatibilidade termodinâmica ou segregação, com a repulsão entre os polímeros, impedindo a formação dos complexos [Tolstoguzov, 1991; Schmitt et al., 1998].

Com a solubilização e estabilidade do biopolímero (ou mistura de biopolímeros) no sistema, passam a atuar forças eletrostáticas que promovem a complexação entre as cadeias poliméricas [Tolstoguzov, 1991].

A densidade de cargas de moléculas de biopolímeros é definida por Schmitt et. al. [1998] como o número de cargas presentes na cadeia por unidade de comprimento. Os diversos grupamentos laterais característicos de proteínas (resíduos de aminoácidos ácidos, básicos, etc) e de polissacarídeos (resíduos de ácido glucurônico, grupamentos amins, resíduos carboxílicos, etc) são responsáveis pelas características eletrostáticas desses biopolímeros [Tolstoguzov, 1991].

A complexação ocorre pela aproximação de regiões das cadeias poliméricas contendo cargas opostas. Tipicamente dois tipos de complexos por interações eletrostáticas podem ser formados dependendo do balanço entre cargas positivas e negativas disponíveis. Se as quantidades de cargas opostas não são iguais em número, é possível obter complexos solúveis pela interação das cargas remanescentes com a água. Se as quantidades de cargas negativas e

positivas entre as cadeias poliméricas são iguais então o complexo formado tem carga resultante próxima a neutralidade, tornando-se insolúvel **[Tolstoguzov, 1991; Schmitt et al., 1998; Kruif & Tuinier, 2001]**.

A coacervação é uma interação baseada na complexação que ocorre da mistura de soluções de substâncias com cargas opostas, formando complexos, que por repulsão do solvente precipitam, formando duas fases, sendo uma delas chamada de “rica em polímeros” contendo o coacervado precipitado e outra chamada “pobre em polímeros” na qual permanece o solvente da solução **[Bachtsi & Kiparissides, 1996; Stott et. al., 1996; Remunan-Lopez & Bodmeier, 1996; Tolstoguzov, 1991; Schmitt et al., 1998; Wang et. al., 1999; Wang et. al., 2000; Hashidzume et al., 2002; Dickinson, 2003; Strauss & Gibson, 2004]**.

Os biopolímeros ideais para coacervação são aqueles com propriedades coloidais hidrofílicas, que apresentam solubilidade em meio aquoso, densidades de cargas adequadas e cadeias lineares. Alguns exemplos a serem citados são: gelatina, alginatos, albuminas, caseína, ágar, gomas, pectinas, etc **[Vandergaer, 1974; Thies, 1995]**.

Mudanças no balanço de cargas dos biopolímeros podem ser obtidas com a variação das características do meio como pH, força iônica, temperatura, etc. Essas variações permitem inferir sobre a força de interação entre as cadeias poliméricas pela manipulação dos grupos ionizáveis livres, interferindo assim no tipo de complexo obtido **[Bachtsi & Kiparissides, 1996; Tolstoguzov, 1991; Schmitt et al., 1998]**.

As proteínas são bons exemplos de biopolímeros susceptíveis aos efeitos das condições do meio. Elas, em geral, têm caráter anfótero, apresentando carga negativa acima do ponto isoelétrico e carga positiva abaixo deste. Isso permite que elas formem coacervados com polissacarídeos aniônicos (goma arábica, alginato, pectina) ou catiônicos (quitosana) dependendo das condições de pH do

meio **[Joseph & Venkataram, 1995; Remunán-López & Bodmeier, 1996; Tolstoguzov, 1991; Kruif & Tuinier, 2001; Dickinson, 2003]**.

O fenômeno da coacervação pode ser dividido em dois grupos: coacervação simples e coacervação complexa.

A coacervação simples envolve um único polímero e ocorre pela remoção do solvente que envolve as moléculas do colóide, através do uso de um outro composto que compete com o polímero pela água, como sais ou álcoois. Com a saída do solvente, as moléculas do polieletrólito se aproximam e formam aglomerados **[Vandergaer, 1974; Bachtsi & Kiparissides, 1996; Schmitt et al., 1998; Wang et al., 1999; Wang et al., 2000; Hashidzume et al., 2002; Vasiliu et al., 2005]**. O fenômeno de coacervação simples é dependente de numerosos parâmetros como pH, força iônica, temperatura e estrutura do polímero **[Bachtsi & Kiparissides, 1996; Schmitt et al., 1998; Vasiliu et al., 2005]**.

O pH contribui para formação do coacervado simples pela modificação do balanço de cargas do polímero, como no caso da gelatina e a caseína, que formam coacervados desse tipo próximos aos seus respectivos pontos isoelétricos **[Schmitt et al., 1998; Santinho et al., 1999; Wang et al., 1999; Wang et al., 2000]**.

A força iônica deve ser pequena para formação de coacervados pelo método simples, pois grandes concentrações de sais podem desestruturar os complexos pela competitividade de cargas entre os sais e os polímeros **[Schmitt et al., 1998]**.

A coacervação complexa envolve a solubilização de dois polímeros conjuntamente, e a expulsão do solvente ocorre devido a atrações e as neutralizações das cargas das matrizes formadas pelas cadeias agregadas dos dois polímeros. Essa atração ocorre em condições específicas do meio nas quais os polímeros apresentam cargas totais opostas **[Remunan-Lopez & Bodmeier, 1996; Thies, 1995; Schmitt et al., 1998; Kruif et al., 2004]**.

---

O pH e a força iônica podem ser manipulados para obtenção dos coacervados complexos, pois interferem diretamente no perfil de cargas das macromoléculas.

A estequiometria de cargas entre os biopolímeros para determinada condição do meio, é um parâmetro importante na definição das quantidades mássicas a serem misturadas de cada um para que o balanço ideal seja atingido e a coacervação bem sucedida [Thies, 1995; Schmitt et al., 1998]. O excesso de um dos polímeros leva a uma quantidade de cargas excedentes no sistema que pode prejudicar a formação do coacervado [Schmitt et. al., 1999].

Condições físicas como temperatura, tipo/tempo de agitação e pressão podem influenciar a formação e estabilidade dos coacervados produzidos [Schmitt et. al., 1999; Turgeon et. al., 2003].

#### **2.2.3.3.1. Microencapsulação por coacervação complexa**

Uma série de aplicações tecnológicas industriais vem sendo desenvolvidas baseadas no conceito da coacervação, utilizando as propriedades funcionais dos complexos formados entre os biopolímeros. Algumas dessas aplicações são: a purificação de macromoléculas, substituição de gordura em produtos da linha *light*, embalagens biodegradáveis, biomaterial na área médica e microencapsulação são algumas dessas aplicações [Tolstoguzov, 1991; Schmitt et al., 1998].

A microencapsulação por coacervação é uma das mais importantes aplicações industriais das propriedades interfaciais de interação entre proteínas e polissacarídeos e vem sendo utilizada por diversos segmentos como farmacêutico, alimentício, químico, cosmético, etc, para veiculação de diversos tipos de recheio (aromas, enzimas, fármacos, tintas) com aplicações variadas [Schmitt et al., 1998; Kruif et al., 2004; Strauss & Gibson, 2004].

O processo baseia-se na formação de uma emulsão (líquidos) ou dispersão (sólidos) do recheio na solução da mistura polimérica. Com a alteração das condições do meio para promover a coacervação (pH, força iônica, temperatura) ocorre a deposição do complexo ao redor dessas estruturas, formando um filme ou matriz sólidos, responsáveis pela retenção, proteção e liberação controlada do recheio [Bachtsi & Kiparissides, 1996; Tolstoguzov, 1991; Remunán-Lopez & Bodmeier, 1996; Schmitt et. al., 1998].

A eficiência da microencapsulação por coacervação está associada às características dos polímeros envolvidos, do complexo formado e do recheio a ser encapsulado. Tensão superficial do sistema, capacidade de adsorção dos polímeros ao recheio disperso, polaridade do recheio, viscoelasticidade do complexo, são propriedades de grande importância para a correta formação da parede e, conseqüentemente, interferem na eficiência de retenção do material. Em geral, compostos líquidos ou particulados de caráter hidrofóbico ou partículas sólidas de baixa solubilidade, são facilmente encapsuladas por esse processo [Schmitt et al., 1998; Kruif et al., 2004].

A secagem das micropartículas coacervadas pode estender o tempo de estocagem das mesmas, bem como ampliar o seu uso para produtos desidratados [Burgess & Ponsart, 1998]. A liofilização, secagem em estufa, remoção da água por solventes e a secagem em condições ambientes, são empregadas para obtenção de micropartículas coacervadas desidratadas. No entanto, a maioria desses métodos não permite a obtenção das micropartículas como partículas individualizadas, interferindo no tamanho do produto final e, também em propriedades de liberação do recheio [Thies, 1995; Burgess & Ponsart, 1998]. A secagem das micropartículas por *spray dryer* pode produzir partículas individualizadas, mas a baixa resistência física da parede e as condições de processo acabam por restringir a aplicação desse processo de secagem [Burgess & Ponsart, 1998].

Para alterar propriedades de rigidez e permeabilidade da parede, após a formação das micropartículas por coacervação, são empregados métodos físicos, químicos ou enzimáticos através da reticulação, gelificação ou desidratação, modulando com isso as taxas de liberação dos compostos encapsulados [Willmott et al., 1987; Latha & Jayakrishnan, 1994; Jayakrishnan & Jarmeela, 1996; Burgess & Ponsart, 1998; Lamprecht et al., 2000; Lamprecht et al., 2001; Lee & Rosenberg, 2000; Kruif et al., 2004; Strauss & Gibson, 2004; Mwangi & Ofner, 2004; Nakagawa, et al., 2004].

Compostos químicos (glutaraldeído, formaldeído, gliceraldeído), orgânicos (ácidos fenólicos, taninos, flavonóides) e enzimas (transglutaminase) interagem com as proteínas em diversos tipos de reações [Iwanaga et al., 2003; Strauss & Gibson, 2004]. Essas interações, quando ocorrem na matriz coacervada, a tornam mais rígida, influenciando a estabilidade física da parede quando submetida a forças mecânicas e a secagem e alterando as propriedades de difusão das mesmas [Burgess & Ponsart, 1998; Mwangi & Ofner, 2004].

O glutaraldeído é um agente bifuncional extensamente utilizado em imobilização e reticulação de proteínas pela ligação dos grupos amino residuais da cadeia polimérica, sendo um método simples e barato. No coacervado, a reticulação normalmente é obtida utilizando-se um excesso do agente bifuncional, que proverá a reação entre aminas residuais da proteína na matriz. A ligação entre o grupo amino e o grupo aldeído terminal do glutaraldeído é covalente e irreversível, sendo resistente a extremos de pH e temperatura [Beppu et al., 1999; Mwangi & Ofner, 2004]. O glutaraldeído apresenta a desvantagem da alta toxicidade, sendo baixa a sua tolerância em diversos produtos, com o uso em alimentos muito restrito. [Desinfecção, 2004; Cho et al., 2003; Soeda et al., 1997; Soper & Thomas, 1998; Vandelli et al., 2001].

A transglutaminase é uma enzima capaz de promover reticulação entre proteínas pela catálise de reações de acil-transferência entre grupos carboxiamídicos e resíduos de glutamina da cadeia polipeptídica com aminas

primárias, incluindo os grupos e-amino de resíduos de lisina resultando na formação ligações  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil) lisina intra e intermolecular **[Carvalho, 2002; Gerrard et al., 2002; Cho et al., 2003]**. A transglutaminase é permitida para uso alimentício, podendo ser uma substituta potencial para alteração das características físicas de paredes de micropartículas coacervadas.

A produção de micropartículas coacervadas é pouco aplicável no caso da encapsulação de compostos hidrossolúveis, pois esses ficam dissolvidos na solução polimérica, não criando condições para a adsorção dos polímeros. Sendo assim o recheio fica fracamente retido na matriz sendo rapidamente liberado da cápsula **[Schmitt et al., 1998]**. O uso de emulsões simples ou múltiplas e de partículas hidrofóbicas sólidas vem sendo empregado muitas vezes para encapsular compostos hidrofílicos como açúcares, proteínas, aminoácidos, peptídios, vitaminas, sais minerais, etc **[Magee & Olson, 1981 a e b; Villamar & Langdon, 1993; Ferreira et al., 1995; Langdon & Buchal, 1998; Jennings et al., 2000; Ribeiro dos Santos, et al., 2002; Onal & Langdon, 2004 a e b; Onal & Langdon, 2005]**.

A coacervação não é convencionalmente usada como forma de produção de dietas para larvas de peixe, no entanto, as partículas formadas têm similaridades, quanto aos aspectos morfológicos, a partículas obtidas por gelificação iônica que são usadas mais regularmente na tentativa de produção de uma dieta inerte capaz de substituir o alimento vivo **[Villamar & Langdon, 1993; Mukai-Corrêa, 2003; Onal & Langdon, 2005]**. Além disso, os coacervados possuem alto teor de água que os torna mais parecidos fisicamente com os alimentos vivos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL:

Produzir, caracterizar e avaliar a potencialidade de micropartículas obtidas por dois métodos de microencapsulação (coacervação complexa e spray dryer seguido de aglomeração), como possíveis substitutos dos alimentos vivos para larvas de peixe, nos seus primeiros estágios de desenvolvimento.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Produzir micropartículas desidratadas em spray dryer e adequar seu tamanho e solubilidade através de aglomeração e recobrimento com pectato de cálcio. Avaliar a morfologia, solubilidade e diâmetro médio destas micropartículas.

Produzir micropartículas por coacervação complexa contendo recheios hidrofóbico (oleoresina de páprica) e hidrofílicos (glicose e isolado protéico de soro de leite) retidos em matrizes lipídicas sólidas. Avaliar as condições de processamento das micropartículas, sua morfologia, diâmetro médio e liberação dos recheios destas micropartículas.

Avaliar a aceitação dessas micropartículas por larvas de pacu em um ensaio biológico *in vivo*.

**CAPITULO 4.****TÉCNICAS DE *SPRAY DRYING* E AGLOMERAÇÃO  
NA PRODUÇÃO DE DIETAS PARA LARVAS DE PEIXE****4.1. RESUMO**

*Spray Drying* é uma técnica de secagem baseada, resumidamente, na aspersão de uma solução da substância de interesse, em uma câmara contendo ar quente, que promove a rápida evaporação da água das gotículas formadas, produzindo partículas sólidas. A microencapsulação por esse processo dá-se quando uma emulsão é aspergida e a fase contínua, constituída de uma solução polimérica, forma uma matriz sólida (após a secagem) capaz de reter e proteger a fase dispersa. O processo de *spray drying* pode ser associado a aglomeração e recobrimento em leite fluidizado para modificar características das partículas desidratadas como aumento do tamanho (aglomeração) ou solubilidade e liberação de compostos (instantaneização e recobrimento).

Esse capítulo descreve a produção de dieta desidratada por *spray dryer*, seguida de aglomeração e recobrimento. Dados sobre tamanho, solubilidade, flutuabilidade, densidade e morfologia são apresentados e discutidos mostrando que a dieta desidratada por *spray dryer* foi aglomerada satisfatoriamente, com aglomerados atingindo tamanhos entre 7,8 a 8,2 vezes maiores que o diâmetro médio das partículas originais. A solubilidade da dieta foi reduzida pela adição de óleo de soja e pelo recobrimento dos aglomerados com soluções de pectina e cloreto de cálcio em um sistema baseado na passagem (queda) das partículas por uma nebulização das soluções de cobertura. O recobrimento com pectina e cloreto de cálcio não foi contínuo na superfície dos aglomerados e, portanto, a redução da solubilidade dos mesmos ficou aquém dos valores apresentados por dietas comerciais.

## 4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1. *Materiais*

Gelatina do tipo B fornecida pela Leiner Davis Gelatin Brasil (Cotia-SP), Goma Arábica da Synth, lote 30841, caseína comercial Mcassab, óleo de milho comercial Lisa, dieta para larvas de pacu formulada pelo Centro de Aqüicultura da UNESP (Caunesp) - Jaboticabal, dieta comercial de origem americana (Hatchfry encapsulon – Argent, USA) e dieta comercial de origem japonesa (Bio-dry Kyowa - 400 e 700  $\mu\text{m}$ ) doadas pelo Caunesp, cloreto de cálcio hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), lote 64271, marca Merck, pectina cítrica tipo 8002, baixo grau de metoxilação, lote 11655, marca Citrus Colloids S/A, HCl fumegante (37%) marca Merck lote UM 1789, Clorofórmio Synth Lote 64071, Metanol Synth 59868,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  marca Dinâmica Lote 0521,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  marca Synth, papel de filtro qualitativo fornecido pela Merse.

### 4.2.2. *Equipamentos*

Mini *Spray dryer* BÜCHI mod. B-191, *Spray dryer* Niro Atomizer, placas de agitação magnética com aquecimento Fisaton, pHmetro Digimed mod. MD20, balança analítica Ohaus mod. AS200, balança semi-analítica Marte mod. AS2000C, Aqualab Decagon mod. 3TE, espectrofotômetro Beckman DU70, Homogeneizador rotativo para tubos Phoenix mod. AP22, agitador vibratório para tubos Super-Mixer Cole Palmer mod. 4722, ultrassom Thornton modelo C/T número de série 0697074, estufa Tecnal, nebulizadores Marca NS e vidrarias em geral.

### 4.2.3. *Formulações das dietas e condições de processo*

Para produção da dieta microencapsulada por atomização em *spray dryer* foi proposta inicialmente uma formulação na qual o material de parede foi

composto por uma mistura de gelatina e goma arábica e como recheio foi usada uma dieta preparada pelo Caunesp contendo os nutrientes necessários ao desenvolvimento das larvas.

Uma solução contendo 10% de sólidos totais, divididos em 35% de gelatina e 35% de goma arábica como materiais de parede, e 30% de dieta formulada para larvas de pacu (formulação apresentada na Tabela 7) como recheio, foi homogeneizada e submetida a secagem em um *Spray dryer* Niro Atomizer. A temperatura de entrada de 180°C e saída de 90 ± 5°C. Além desse material produziu-se a dieta desidratada (Tabela 7), sem a adição dos materiais de parede, nas mesmas condições de secagem já citadas.

**Tabela 7:** Formulação da dieta fornecida pelo Centro de Aqüicultura da UNESP – Jaboticabal - SP.

Ingredientes	g/100g de dieta líquida pronta
Silagem de pacu inteiro	31,56
Hidrolisado de peixe	1,44
Filé de pacu	15,00
Ovo integral	16,40
Clara integral	11,60
Levedura	9,00
Amido de milho	12,50
Mix mineral* e vitamínico**	2,50

\* Bernhart Tomarelli salt mixture (ICN); \*\* Hoffman – La Roche, Nutley; NJ, USA

#### 4.2.4. *Aglomeração e recobrimentos das partículas*

Com base em resultados obtidos com o uso das dietas produzidas em *spray dryer* em experimentos *in vivo*, tornou-se necessário o emprego do processo de aglomeração e recobrimento para aumentar o tamanho de partículas e diminuir a solubilidade das mesmas.

Inicialmente, a dieta desidratada sem material de parede, foi aglomerada manualmente, utilizando-se 2 borrifadores, cada um contendo respectivamente, solução de cloreto de cálcio 1% (p/v) e solução de pectina 1% (p/p). A dieta foi acondicionada em sacos plásticos na quantidade de 250g aproximadamente e submetida a 5 ciclos de aglomeração, sendo que um ciclo foi definido segundo o procedimento:

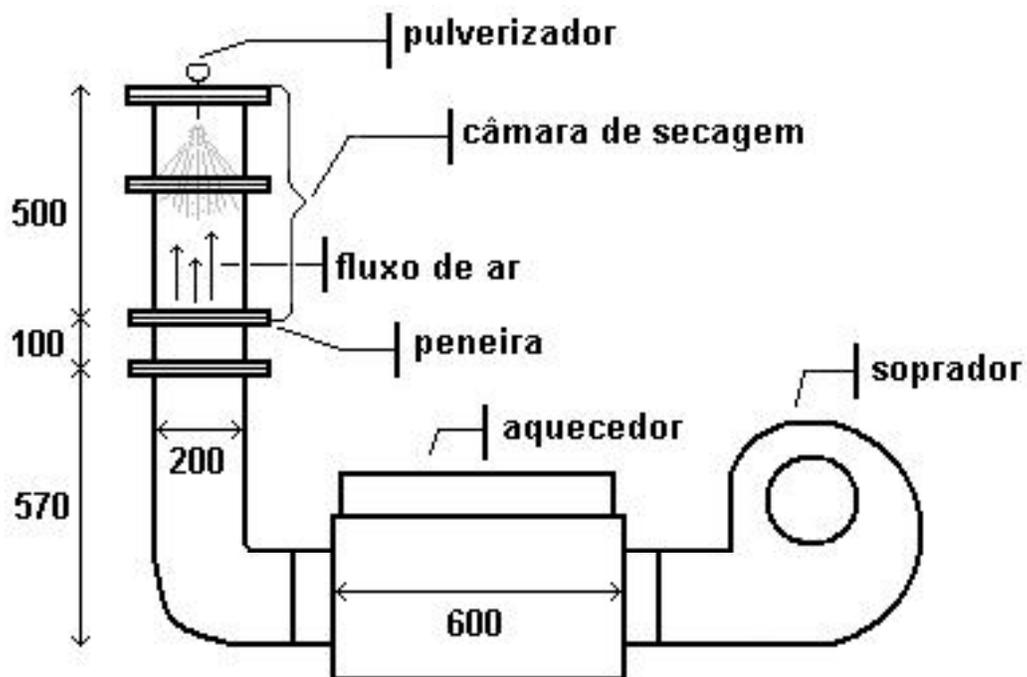
- 5 borrifadas de solução de pectina (cada borrifada corresponde a adição de 0,25g de solução sobre a amostra), seguida de homogeneização do material por 30 segundos. Procedimento repetido 3 vezes;
- 5 borrifadas de solução de cloreto de cálcio (cada borrifada corresponde a adição de 0,20g de solução sobre a amostra), seguido de homogeneização do material. Procedimento repetido 3 vezes.

Após esse procedimento, a dieta aglomerada foi passada em peneira de 0,250mm para ajuste do tamanho das partículas.

Essa dieta foi utilizada nos ensaios *in vivo* desenvolvidos com larvas de pacu, no Centro de Aqüicultura da Unesp, em Jaboticabal, nos meses de janeiro e fevereiro de 2003.

O processo descrito acima não se apresentou muito eficiente para obtenção de um produto homogeneamente coberto. Para obtenção de um material com características melhores foram testados outros sistemas tais como um leito fluidizado (Figura 6) ou equipamento para precipitação por gravidade (Figura 7).

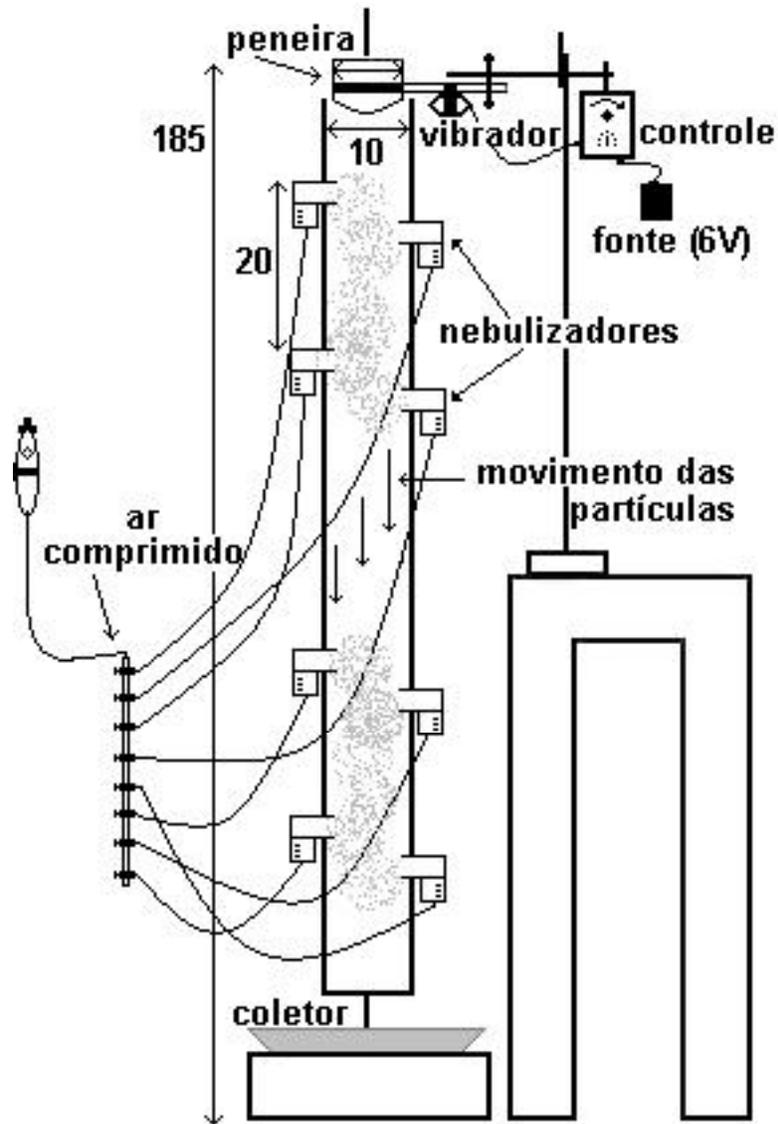
O leito fluidizado utilizado nesse trabalho, foi desenvolvido em tese anterior [Cardoso, 2000] e foi testado na aglomeração e recobrimento da dieta desidratada em *spray dryer*. Em função das dificuldades operacionais, um novo sistema foi projetado, no qual, por gravidade, a dieta era precipitada ao longo de um cilindro saturado internamente por nebulização das soluções de pectina e cálcio sendo aglomerada e recoberta durante a passagem. As condições operacionais para cada equipamento são apresentadas nas próprias Figuras 6 e 7.



Características de processo

Taxa de nebulização	
Sol Pectina (1% p/p)	2,2g/min
Sol. Cloreto de Cálcio (2%, p/p)	2,2g/min
Quantidade de amostra	~ 400g
Quantidade de solução aplicada	
Pectina (1% p/p)	120g
Cloreto de Cálcio (2%, p/p)	40g
Temperatura ambiente ( $24^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ )	

Figura 6: Leito luidizado (dimensões apresentadas em milímetros).



Características de processo	
Pressão do ar de alimentação	4,0 Kgf/cm <sup>2</sup>
Pressão em cada nebulizador	2,5 Kgf/cm <sup>2</sup>
Taxa de nebulização	
Sol. Pectina (1% p/p)	0,8 mL/min
Sol. Cloreto de Cálcio (1%, p/p)	0,9 mL/min
Taxa de alimentação da amostra	~ 1,5 g/min
Temperatura ambiente (24° ± 2°C)	

**Figura 7:** Aglomerador utilizado para produção de dietas recobertas e aglomeradas.

#### **4.2.5. Caracterização das amostras**

##### **4.2.5.1. Determinação do teor total de proteínas**

As dietas obtidas por *spray dryer* e os aglomerados foram caracterizados em relação à quantidade de proteína total pelo método de Kjeldahl [AOAC, 1998], usando-se 6,25 como fator de conversão de nitrogênio para proteína.

##### **4.2.5.2. Determinação de umidade**

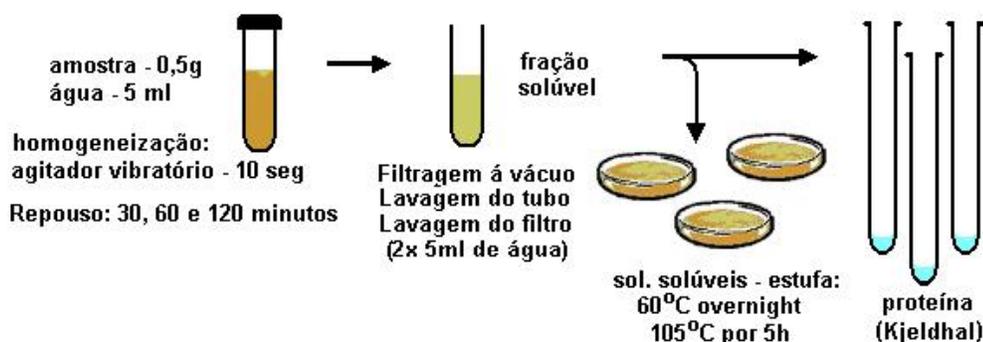
A umidade dos produtos foi determinada por secagem em estufa a 105°C por 16 horas, segundo metodologia da AOAC, [1998]. O cálculo da umidade das amostras levou em consideração a perda de massa ocorrida na secagem.

##### **4.2.5.3. Solubilidade das dietas e aglomerados**

As amostras obtidas foram avaliadas quanto à velocidade de solubilização dos componentes nos tempos de 30, 60 e 120 minutos.

Para a determinação da solubilidade em sólidos solúveis, foi usada a técnica descrita por **Pedroza-Islas, Alvares-Ramires & Vernon-Carter [2000]** adaptada, baseada na quantificação gravimétrica do conteúdo total de material transferido das amostras para água. As proteínas solubilizadas foram quantificadas por Kjeldahl [AOAC, 1998].

O procedimento para determinação de proteína solúvel e sólidos solúveis é mostrado no fluxograma da Figura 8.



**Figura 8:** Esquema das etapas da metodologia selecionada para obtenção das frações solúveis das dietas e aglomerados.

As solubilidades das dietas desidratadas, dietas comerciais e dos aglomerados quanto ao material total lixiviado para água e a proteína solubilizada, foram expressas em porcentagem de sólidos solúveis por sólidos totais, e em proteína solúvel no permeado em relação ao teor de proteína total na amostra.

#### 4.2.5.4. *Diâmetros médios e distribuição de tamanho das partículas*

Os diâmetros médios das dietas desidratadas em *spray dryer* e aglomerados foram determinados por espalhamento de luz, utilizando *laser* de alta potência em um equipamento Mastersizer S, Marca Malvern, modelo S – MAM 5005. A dispersão das partículas foi feita na unidade de dispersão do equipamento, utilizando isopropanol PA (Synth) como meio dispersante.

#### 4.2.5.5. *Morfologia e microestrutura: Microscopia ótica (MO) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A observação da morfologia e microestrutura da dieta desidratada e dos aglomerados foi feita por microscopia ótica e por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para observações óticas utilizou-se um microscópio ótico (NIKON – eclipse E800 - Japan) munido do software Image Pro Plus 4.0 para obtenção das imagens com a captação sendo feita em glicerina para evitar a dissolução do material e em água para observação de características do material reidratado.

Para observação por MEV, as amostras foram fixadas em pequenos pedaços de fita adesiva metálica de cobre dupla face, presos em stubs de alumínio de 1cm de diâmetro por 1cm de altura. Esses conjuntos foram recobertos por uma fina camada de ouro em um evaporador Balzer mod. SCD50 pelo tempo de 75 segundos e corrente de 400mA. A observação das amostras foi feita posteriormente em um microscópio eletrônico de varredura Jeol mod. JMS -T300 com aceleração da voltagem de 10kv.

#### **4.2.5.6. Flutuabilidade**

A determinação da flutuabilidade da dieta e dos aglomerados foi adaptada do método descrito em **Pedroza-Islas, Alvares-Ramires & Vernon-Carter [2000]**, Em tubos de ensaio de vidro de 5mL foram adicionadas em torno de 30 mg e 3 mL de água destilada a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Os tubos foram submetidos à agitação intermitente em agitador vibratório por 10 segundos. Rapidamente a mistura foi transferida para uma cubeta de vidro e a variação da transmitância foi monitorada a 600nm em um espectrofotômetro Beckman DU 70, nos tempos 15, 30 e 45 segundos, 1,2, 3, 4, 5, 10, 15 e 30 minutos.

#### **4.2.5.7. Atividade de água ( $A_w$ )**

As amostras desidratadas foram acondicionadas em cápsulas plásticas e submetidas a determinação de atividade de água no Aqualab, em temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.5.8. Densidade aparente dos aglomerados**

A densidade aparente foi determinada por gravimetria, fazendo-se a pesagem do material contido em uma proveta de 10 mL, à temperatura ambiente.

#### **4.2.6. Análise estatística**

As diferenças significativas entre os valores obtidos foram avaliadas por análise de diferença de médias a 5% de acordo com o teste de TUKEY e ANOVA, com auxílio do software *Statística 5.5 for Windows* [Statsoft Inc., 1995].

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1. *Dietas desidratadas – produção e composição química*

A primeira dieta produzida, contendo gelatina e goma arábica como material de parede e como recheio a dieta líquida descrita na Tabela 7, foi utilizada em testes preliminares, *in vivo*, no Caunesp-Jaboticabal, para avaliação da manuseabilidade da mesma. Os resultados não foram favoráveis, pois essa dieta constituiu-se de um pó muito fino que ao contato com a água do tanque de teste formou grandes grumos, aparentemente gelatinosos, que dificultaram a sua ingestão pelas larvas.

O processo de *spray drying* produz pós muito finos que têm como algumas de suas características a baixa dispersibilidade em água, tendência a aglomeração e coesividade [Buffo et al., 2002; Guignon et al., 2002]. Para minimizar esses efeitos, são empregadas técnicas de aglomeração, sendo uma delas, a instantaneização, muito usada em preparados como café solúvel, leite em pó, achocolatados em geral, sabão em pó, condimentos, etc. Os aglomerados formados são geralmente porosos, o que permite a entrada da água pelos poros com conseqüente rápida umidificação, dissolução e solubilização do material [Buffo et al., 2002; Guignon et al., 2002; Mort et al., 2001].

No caso de dietas para alimentação de larvas de peixe, o produto desejado deve possuir tamanho específico e mínima perda de nutrientes por lixiviação, sendo mais adequado o emprego de aglomeração para aumentar o tamanho das partículas, associado ao recobrimento das mesmas para reduzir a solubilização dos compostos.

Seguindo recomendações da equipe do Caunesp, foram feitas mudanças na formulação inicial, retirando-se a gelatina e a goma arábica, pois a grande quantidade desses dois componentes promoveu um desequilíbrio nutricional da dieta quanto ao perfil protéico e de carboidratos.

Baseado nos resultados dessa primeira etapa adotou-se a dieta padrão (Tabela 7) como base para testes de aglomeração. A dieta líquida foi homogeneizada e peneirada para remoção de possíveis partículas em suspensão, sendo submetida a secagem por *spray drying*. Os parâmetros de secagem, bem como as características do produto, antes e depois do processamento, são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8:** Condições de processamento da secagem por *spray dryer* da dieta para pacu fornecida pelo Centro de Aqüicultura de Jaboticabal.

Volume de material	23 litros
Teor de sólidos totais do material (%)	13,87
Temperatura de entrada	190 ± 5°C
Temperatura de saída	85 ± 5°C
Vazão de alimentação	20 litros/h
Quantidade de material seco recolhido	2,95 kg

Após a secagem, parte do material foi separada para teste e armazenada em pote plástico, e o restante acondicionado em saco plástico, fechado com seladora e armazenado em freezer para uso posterior. O rendimento mássico do processamento foi de 92% e a composição centesimal do material obtido é apresentada na Tabela 9.

**Tabela 9:** Composição centesimal em base seca da dieta desidratada obtidas por *spray dryer*.

Componente	g/100g de dieta seca (base seca)
Proteína	45,40 ± 0,56*
Lipídios	15,90 ± 0,20
Cinzas	9,19 ± 0,09
Outros compostos (por diferença)	30,90

\* média ± desvio padrão

Os teores protéicos da dieta desidratada produzida encontram-se de acordo com a faixa citada na literatura de 30 a 70%, dependendo dos requerimentos

nutricionais da espécie de peixe em estudo [Millamena et al., 1999; Pedroza-Islas et al., 2000; Cahu & Zambonino Infante, 2001; Castell et al., 2004; Berril et al., 2004; Smith et al., 2004].

A formulação da dieta líquida produzida pelo Caunesp (Tabela 7) possui grande variedade de fontes de nutrientes, exigindo uma série de cuidados durante o processamento. O alto teor de proteínas, principalmente as provenientes do ovo, implicaram em limitações quanto ao pré-aquecimento da dieta líquida antes da secagem para evitar que se formassem grumos gelatinosos podendo causar entupimento durante a atomização. A temperatura da dieta líquida resfriada, antes do processo de secagem, foi elevada para não mais que 35°C, evitando a geleificação da fração protéica.

#### **4.3.2. Aglomeração e recobrimento – produção e composição química.**

##### **4.3.2.1. Aglomeração e recobrimento manual**

A dieta sem recobrimento apresentou solubilidade de 53,7% (gramas de sólidos solúveis por 100g de sólidos totais) para o período de 120 minutos. A amostra aglomerada manualmente (item 2.2.4) apresentou uma redução da solubilidade de 8% em relação à dieta sem recobrimento.

**Pedroza-Islas et al., [2000]** em seus estudos de dissolução e flutuabilidade de dietas constituídas por biopolímeros e produzidas por *spray dryer* obtiveram porcentagens de dissolução na faixa de 80 a 90% em 4 horas. Os autores citam um intervalo de tempo entre 12 e 20 minutos para a ingestão da dieta por larvas de camarão e definem um período de 60 minutos como mínimo adequado no qual a dieta deve permanecer íntegra.

A aglomeração manual não produziu um material com cobertura uniforme, além de formar grumos muito grandes, com tamanho inadequado para o uso como dieta, exigindo um ajuste de tamanho com peneiras.

#### 4.3.2.2. **Leito fluidizado**

Na tentativa de se obter um material com tamanho e recobrimento mais uniformes e com menor solubilidade, foram feitos testes de aglomeração e recobrimento da dieta em um leito fluidizado construído por **Cardoso [2000]**. Esse leito tem como característica a posição do atomizador na parte superior do equipamento com o líquido de cobertura sendo pulverizado contracorrente à direção de fluidização das partículas (Figura 8).

Os materiais obtidos com o uso desse equipamento não apresentaram boas características em virtude de dificuldades no ajuste da movimentação do pó e da pulverização das soluções de cobertura. Com pouco tempo de processamento (menos de 15 minutos) o material já absorvia muita umidade, formando grandes grumos e perdendo a fluidez (desfluidização **[Hemati et al., 2003]**). Quando o polímero de cobertura apresenta alta viscosidade em água, as soluções utilizadas devem ser diluídas, implicando em longo tempo de processamento, para deposição de uma quantidade suficiente de polímero na superfície das partículas, e conseqüente introdução excessiva de água **[Pearnchob & Bodmeier, 2003]**.

O processamento por *spray drying* produz partículas muito pequenas e de baixa densidade localizadas na região C da Figura 5, sendo classificadas como coesivas **[Guignon et al., 2002]**. Este tipo de partícula é de difícil fluidização, não apresentando uma movimentação uniforme e exigindo condições muito específicas de processamento **[Cardoso, 2000; Jono et al., 2000; Watano et al., 2004]**. A dieta desidratada produzida apresentou características de coesividade, aderindo às superfícies do leito. De acordo com informações de literatura, para o recobrimento de partículas finas, de difícil fluidização, o leito fluidizado mais recomendado é o do tipo *Wurster* (Figura 4B), no qual a atomização do líquido de cobertura é feita concorrente ao fluxo do ar de movimentação das partículas **[Dewettinch & Huyghebaert, 1999; Guignon et al., 2002; Jones, 1988; Arimoto et al., 2004; Jono et al., 2000; Watano et al., 2004]**.

Várias adaptações foram feitas ao equipamento na tentativa de melhorar a fluidização do material, como a inclusão de um cone na parte inferior do equipamento para direcionar o fluxo de ar para uma área menor. **Watano et al. [2004]** citam adaptações externas como vibração e agitação mecânica como possíveis recursos para melhorar a fluidização de partículas tipo C. Apesar dos esforços, não foram obtidos materiais com as características desejadas. Em geral, o material aglomerou excessivamente, formando grandes placas que, com a secagem, tornaram-se duras e de difícil fragmentação para o ajuste de tamanho. Outra limitação quanto ao uso desse equipamento foi a quantidade de material requerido em cada processo (400g em média por recomendação de **Cardoso, 2000**).

#### **4.3.2.3. Aglomerador**

Em decorrência das dificuldades encontradas na utilização do leito fluidizado, optou-se pelo desenvolvimento de um protótipo, baseado na concepção de alguns instantaneizadores, onde um fluxo horizontal de vapor é produzido e o material a ser aglomerado cai por gravidade, passando por esse vapor, ganhando umidade e aglomerando. No lugar de vapor, as soluções de cobertura nebulizadas foram as promotoras da aglomeração e do recobrimento desejados.

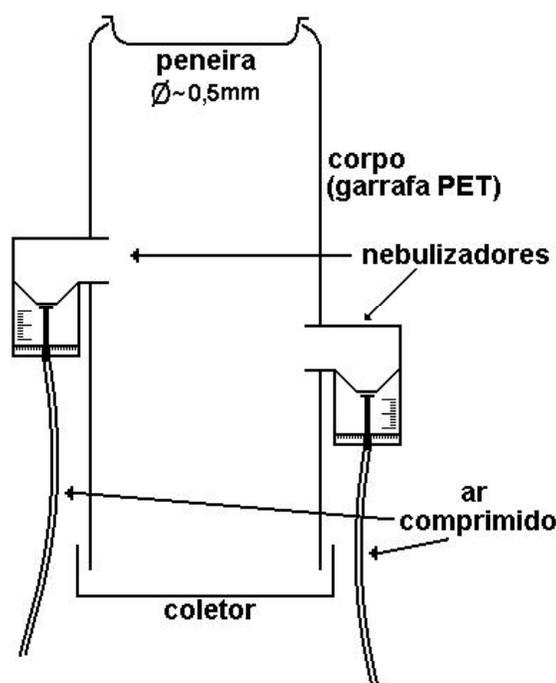
A etapa inicial nessa construção foi a escolha do sistema para pulverização do material de cobertura. A forma da introdução do líquido de aglomeração/cobertura durante o processo influi na distribuição de tamanho dos aglomerados resultantes e, em geral, as gotas pulverizadas devem ser menores que o tamanho desejado para os aglomerados **[Mort et al., 2001]**.

Foram testados nebulizadores utilizados para inalação, de uso farmacêutico, que promovem a formação de uma nuvem úmida com gotículas de líquido de tamanho muito reduzido. A pressão do regime do ar comprimido usado

na nebulização do material de parede foi de  $2\text{kgf/cm}^2$  o que forneceu uma vazão aproximada de  $0,2\text{ mL/min}$ .

Para construção do corpo do protótipo foram usadas garrafas plásticas lisas de PET (polietileno tereftalato) cortadas no fundo e na parte superior que, quando encaixadas, constituíram um tubo de altura de  $165\text{ cm}$ .

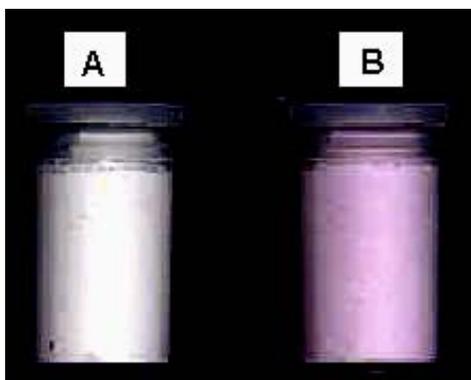
Um modelo preliminar, usando apenas dois nebulizadores e uma garrafa (Figura 9), foi construído para verificação da eficiência da pulverização das soluções de cobertura.



**Figura 9:** Modelo preliminar para testes de nebulização.

O material usado nos testes dos nebulizadores foi amido de arroz e as soluções de cobertura foram coradas com anilina (azul para pectina e vermelho para o cloreto de cálcio). O ciclo de aglomeração/recobrimento foi definido por tempo de escoamento da amostra pela peneira ( $2\text{ g/min}$ ).

A Figura 10 mostra a alteração de cor do amido de arroz após seis ciclos de aglomeração.

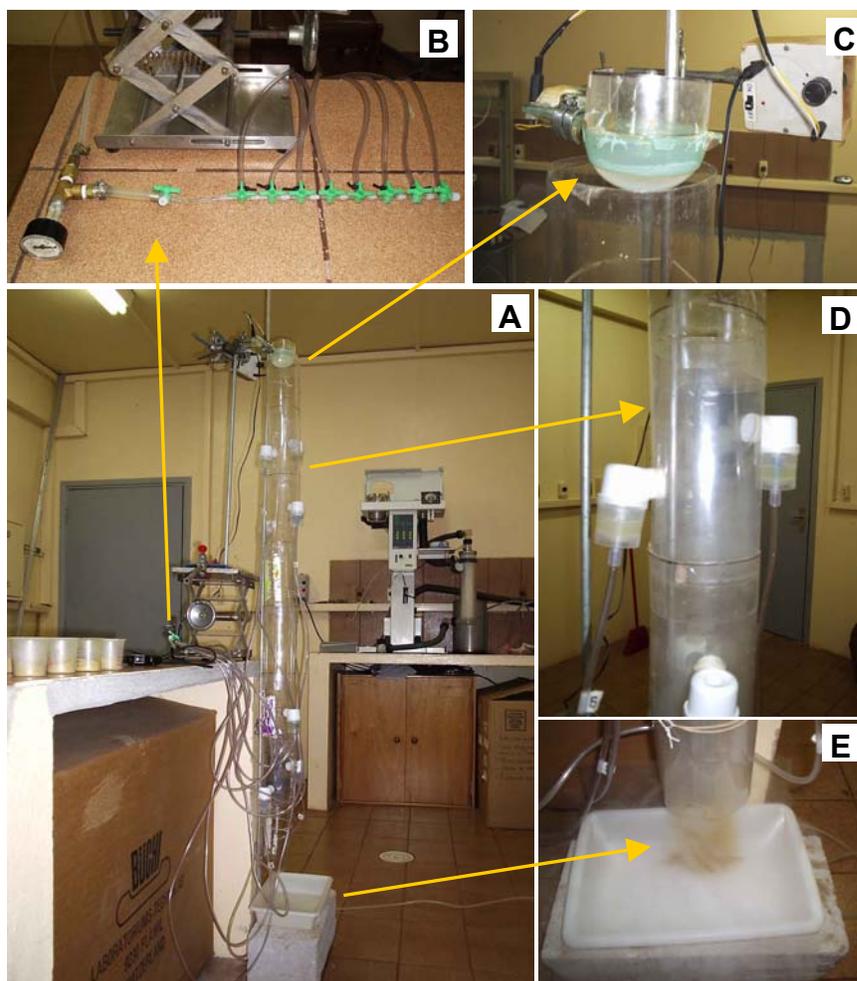


**Figura 10:** Coloração do amido de arroz após recobrimento por nebulização. A - amido de arroz, B - amido de arroz recoberto.

No protótipo definitivo aumentou-se a altura do cilindro plástico, o número de nebulizadores foi de oito no total, as pressões de operação dos mesmos foram elevadas, incrementando o volume de solução de cobertura aspergido dentro do cilindro. Com isso o volume das soluções de cobertura e o tempo de contato com a dieta aumentaram, reduzindo o número de ciclos necessários para o mesmo efeito de recobrimento.

A alimentação do sistema foi feita por gravidade, com a adaptação de um aparelho vibratório junto à peneira de alimentação para homogeneizar o fluxo de material caindo ao longo do tubo. Esse sistema de alimentação foi controlado por um potenciômetro que permitiu variar a intensidade de vibração e, com isso, a taxa de alimentação. O recolhimento do material foi feito em bandeja plástica no final do cilindro. Foi mantida uma distância entre a boca do cilindro e a bandeja, onde uma tênue corrente de ar foi forçada para evitar um acúmulo da nuvem nebulizada sobre o material depositado, o que poderia gerar gradientes no recobrimento.

A Figura 11 apresenta detalhes do aglomerador apresentado em esquema na Figura 7.



**Figura 11:** Aglomerador utilizado para aglomeração de dietas desidratadas. A: vista geral; B: controle do ar comprimido injetado nos nebulizadores; C: sistema de alimentação; D: Sistema de nebulização; E: Coleta da amostra aglomerada.

As condições de operação do sistema foram testadas quanto a concentração das soluções de cobertura, quantidade de amostra por ciclo e tempo de escoamento (tabela de condições de processo apresentada na Figura 7).

A pectina foi pulverizada em concentrações de 1 e 1,5% (p/p). Para a concentração maior, a nebulização não foi eficiente em função da maior viscosidade da solução, fixando-se assim a concentração dos materiais de cobertura em 1%, tanto para a pectina quanto para o cálcio. As soluções de cobertura devem ter, em geral, baixa viscosidade para que a atomização/pulverização forme gotas pequenas proporcionando um maior controle

da umidificação e recobrimento, permitindo condições mais favoráveis de processamento [Guignon et al., 2002; Jones, 1988].

A dieta desidratada sem recobrimento foi adicionada de uma camada intermediária de óleo de soja antes do tratamento de pectina e cálcio. A introdução do óleo na dieta foi testada por dois modos: por nebulização e, manualmente, pela adição direta do óleo na dieta e homogeneização com passagens sucessivas por peneira. Testes de solubilidade para um período de 30 minutos para os materiais obtidos por esses dois procedimentos apresentaram reduções de 8,4% para adição de óleo por nebulização e 11,1% na adição manual. A quantidade de óleo adicionado foi de aproximadamente 26g de óleo para cada 100g de dieta (base seca).

Terminado o processo, cada lote foi espalhado sobre bandejas, mantidos em condições ambientes por 18 horas, recolhidos e armazenados em frascos para posterior caracterização.

A facilidade operacional e a reprodutibilidade das condições de processamento para esse sistema foram satisfatórias. Outra vantagem apresentada foi a homogeneidade de tamanho do material obtido, dispensando ajustes por quebra e peneiramento. Com esses resultados, esse sistema foi utilizado para produzir duas dietas definitivas que, juntamente com a dieta sem recobrimento e a dieta adicionada de óleo, foram caracterizadas. A Tabela 10 fornece uma descrição das dietas finais avaliadas

**Tabela 10:** Dietas finais avaliadas:

Código	Descrição
D	Dieta sem recobrimento
DO	Dieta adicionada de óleo de milho (adição manual)
DOPC	Dieta adicionada de óleo de milho (adição manual) recoberta no aglomerador com quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p).
DOGPC	Dieta adicionada de óleo de milho (adição manual) recoberta no aglomerador com duas passagens de gelatina (2% p/p) e quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p).

As composições centesimais dessas amostras são apresentadas na Tabela 11.

**Tabela 11:** Composição centesimal (%) da dieta sem recobrimento, dieta adicionada de óleo e amostras produzidas no aglomerador.

Amostra	Proteína	Gordura	Cinzas	Umidade	Outros**
D	42,08 ± 0,56*	14,58 ± 0,20	8,33 ± 0,09	7,31 ± 0,32	27,71
DO	32,88 ± 0,62	29,86 ± 0,18	6,44 ± 0,01	9,84 ± 0,25	20,98
DOPC	32,30 ± 0,31	29,22 ± 0,12	6,36 ± 0,02	12,68 ± 0,25	19,45
DOGPC	32,90 ± 0,17	28,68 ± 0,21	6,47 ± 0,02	10,66 ± 0,04	21,28

\* Média ± desvio padrão. \*\* Valores obtidos por diferença.

D – Dieta sem recobrimento; DO – Dieta adicionada de óleo; DOPC – Dieta adicionada de óleo, recoberta com pectina – cálcio (1% p/p); DOGPC – Dieta adicionada de óleo, recoberta com gelatina (2% p/p) e pectina – cálcio (1% p/p).

Com a adição do óleo de soja as proporções entre os constituintes das dietas aglomeradas modificaram-se em relação à dieta sem aglomeração. Os valores de proteína diminuiram, permanecendo no entanto, dentro da faixa adequada de 30 a 70%, citada na literatura [Millamena et al., 1999; Pedrosa-Islas et al., 2000; Cahu & Zambonino Infante, 2001; Castell et al., 2004; Berrill et al., 2004; Smith et al., 2004].

O teor de lipídios ficou pouco acima da faixa citada em literatura, que vai de 5 a 25%, dependendo da espécie e do estágio de crescimento da larva [Sales et al., 2003; Scholik et al., 2004; Morais, et al., 2004; Smith et al., 2004; Berrill et al., 2004; Castell et al., 2004].

Na comparação da composição protéica e lipídica com náuplios de artêmia recém eclodidos (56,2% de proteína e 17,0% de lipídios) **[Gracia-Ortega et al., 1998]** a dieta sem recobrimento (D) apresentou menor teor protéico e lipídico enquanto as demais apresentaram baixo conteúdo protéico e alto conteúdo lipídico.

A umidade foi um pouco mais alta nas amostras submetidas a aglomeração e recobrimento (Tabela 11), estando associada à água adicionada ao material pelas soluções de cobertura e a não utilização de ar aquecido durante o processamento dos aglomerados. O processo de aglomeração e recobrimento envolve a secagem das partículas simultânea à umidificação **[Link & Schlünder, 1997; Guignon et al., 2002; Saleh et al., 2003; Teunou & Poncelet, 2002]**. Essa secagem promove a fixação das pontes entre as partículas com conseqüente crescimento e estabilização do tamanho dos aglomerados **[Buffo et al., 2002]**. No caso do recobrimento, a secagem promove a fixação da cobertura sobre as partículas ou aglomerados **[Guignon et al., 2002; Jones, 1988; Saleh et al., 2003]**. Para os produtos obtidos, a secagem foi promovida pelo espalhamento do material úmido e aglomerado em bandejas, com secagem em condições ambientes.

As composições centesimais da dieta adicionada de óleo (DO) e das recobertas com materiais poliméricos (DOPC e DOGPC) apresentaram pouca variação entre si, indicando que as quantidades de material de cobertura adicionadas foram pequenas, não alterando significativamente a proporção entre os constituintes.

### **4.3.3. Solubilidade**

A solubilidade de dietas destinadas à larvicultura é um parâmetro tecnológico muito importante na determinação da qualidade do produto oferecido. Altas solubilidades levam a uma perda de nutrientes por lixiviação, além de

---

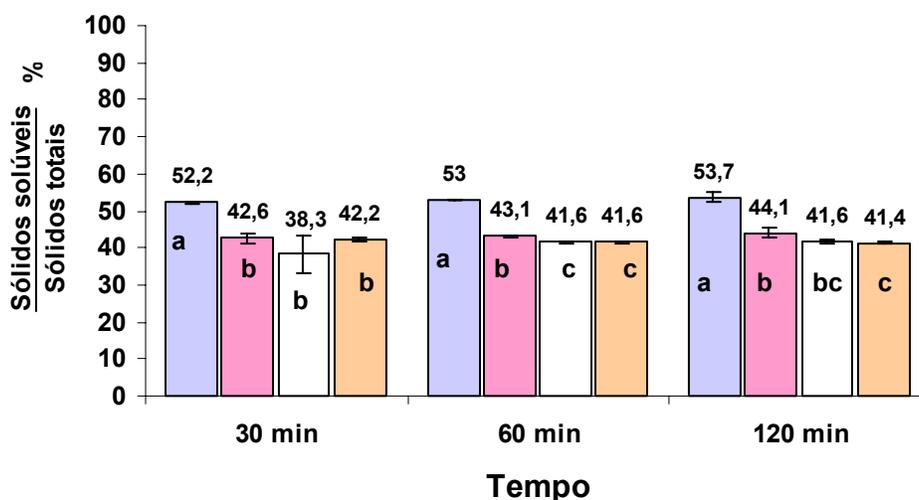
poluírem a água dos tanques de cultivo, ocasionando contaminações microbiológicas, alta demanda de oxigênio, dentre outros fatores que podem comprometer o desenvolvimento das larvas e a produtividade do cultivo [Vilamar & Langdon, 1993; Pedroza-Islas et al., 2000; Önal & Langdon, 2004; Pesquisa Agropecuária, 2004; Kvale et al., 2005].

A determinação da solubilidade das rações em escala laboratorial, segundo Kvale et al. [2005], deveria simular condições às quais as partículas são submetidas nos tanques de cultivo das larvas (quantidade de dieta por volume, temperatura, agitação, composição da água quanto à salinidade, etc). Os autores ainda citam a dificuldade em se quantificar os componentes lixiviados das dietas em virtude das baixas quantidades adicionadas na água para simular a concentração de dieta nos tanques.

#### ***4.3.3.1. Solubilidade para dieta sem recobrimento, dieta adicionada de óleo e aglomerados produzidos no Aglomerador***

##### *4.3.3.1.1. Solubilidade das amostras determinada pela quantificação de sólidos solúveis*

As solubilidades em sólidos solúveis para a dieta sem recobrimento, a dieta adicionada de óleo e para os aglomerados são apresentados na Figura 12.



**Figura 12:** Solubilidade em sólidos solúveis por sólidos totais das dietas: D (□) – Dieta sem recobrimento; DO (■) – Dieta adicionada de óleo milho (adição manual); DOPC (□) – Dieta adicionada de óleo, recoberta com pectina – cálcio (1% p/p); DOGPC (■) – Dieta adicionada de óleo, recoberta com gelatina (2% p/p) e pectina – cálcio (1% p/p). Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) para o tempo de 120 minutos. Coeficiente de variação (desvio padrão / média X 100) máximo = 3,9%.

A dieta sem recobrimento (D) apresentou alta solubilidade em sólidos (53,7% após 120 minutos). Os tratamentos com recobrimento apresentaram solubilidades menores comparados a D, com valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) tanto para adição de óleo (DO) quanto para as dietas recobertas (DOPC e DOGPC).

A inclusão do óleo exerceu maior efeito na diminuição da solubilidade da dieta do que os recobrimentos com pectina e cálcio.

**Marchetti et al. [1999]** recobriram com óleo peletes e dietas extrusadas para evitar a lixiviação de vitaminas observando uma efetiva melhora na estabilidade da dieta com retenção aproximada de 50% da quantidade de vitaminas adicionadas às dietas.

Ao avaliar a solubilidade em sólidos solúveis (Figura 12) da dieta DO (redução de 18% em relação ao material sem cobertura após 120 minutos) e da

dieta DOPC (redução de 22,5%), observa-se que a diferença entre esses dois tratamentos representou um incremento de 5,5% na proteção (para um tempo de solubilização de 120 minutos) referentes à cobertura de pectina e cálcio. Avaliando-se da mesma forma a diferença dos valores de solubilidade para DO e para a dieta com camada intermediária de gelatina (DOGPC, redução de 21,3%), o aumento na proteção observado foi 4,1%, após 120 minutos.

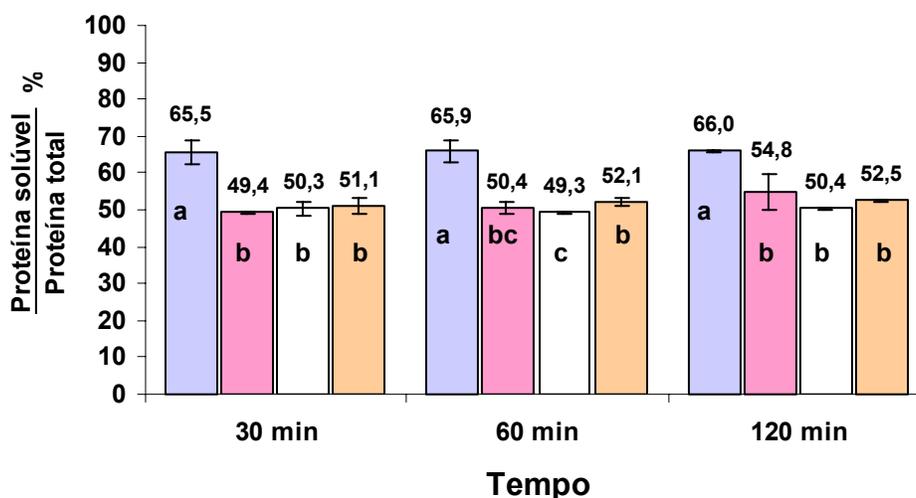
A contribuição da cobertura com pectina e cálcio na retenção dos nutrientes na dieta pode ser observada na Figura 12 para o tempo de 120 minutos, onde as dietas com recobrimentos poliméricos (DOPC e DOGPC) apresentaram uma liberação de sólidos para a água menor que na dieta adicionada de óleo (DO) com valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

O perfil de liberação dos nutrientes para todas as dietas foi caracterizado por uma rápida liberação inicial de material seguida de estabilização ao longo do tempo para cada amostra.

Valores altos de solubilização (sólidos solúveis) na faixa entre 80 e 90% de lixiviação em 240 minutos, foram observados por **Pedroza-Islas et al. [2000]** para dietas microencapsuladas com diversos polímeros como materiais de parede.

#### *4.3.3.1.2. Solubilidade das amostras determinada pela quantificação de proteínas solúveis*

A solubilidade em proteína solúvel da dieta sem recobrimento, a dieta adicionada de óleo e os aglomerados são apresentados na Figura 13.



**Figura 13:** Solubilidade em proteína solúvel por proteína total das dietas: D (□) – Dieta sem recobrimento; DO (■) – Dieta adicionada de óleo milho (adição manual); DOPC (□) – Dieta adicionada de óleo, recoberta com pectina – cálcio (1% p/p); DOGPC (■) – Dieta adicionada de óleo, recoberta com gelatina (2% p/p) e pectina – cálcio (1% p/p). Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) para o tempo de 120 minutos. Coeficiente de variação (desvio padrão / média X 100) máximo = 5,1%.

A dieta sem recobrimento apresentou alta solubilidade protéica tendo liberado 66% do seu conteúdo total de proteínas após 120 minutos.

A dieta adicionada de óleo (DO) e os tratamentos recobertos (DOPC e DOGPC) apresentaram solubilidades iguais estatisticamente para o tempo de 120 minutos.

O tratamento DOGPC apresentou valores de solubilidade protéica ligeiramente maiores em todos os tempos comparados as amostras DO e DOPC, que pode ser decorrência da solubilização da camada intermediária de gelatina recebida por esse tratamento.

Como já observado, na determinação da solubilidade pelos sólidos solúveis, a adição de óleo à dieta sem recobrimento exerceu efeito maior na redução da solubilidade da proteína dos materiais aglomerados do que o recobrimento com pectina e cálcio.

Para 120 minutos de solubilização, a dieta DO apresentou redução de 17,0% na perda de proteína em relação a dieta sem cobertura. As dietas DOPC e DOGPC reduziram as perdas em 23,6 e 20,5% respectivamente. Comparando esses dois tratamentos à dieta DO, o incremento de proteção para retenção da proteína pelo recobrimento com pectina e cálcio foi de 8% para DOPC e 4,2% para DOGPC.

As solubilidades para todas as amostras foram altas, apresentando valores superiores a 40% de liberação dos nutrientes para 120 minutos de exposição à água. As amostras apresentaram rápida liberação de proteína até 30 minutos, seguida de relativa estabilidade ao longo do tempo, sem diferenças estatísticas ( $p \geq 0,05$ ) para os valores determinados para cada amostra. Esse perfil de liberação também foi observado por **Kvale et. al. [2005]**. Nos seus estudos **Kvale et al. [2005]** mediram a lixiviação de três dietas produzidas por métodos diferentes (gelificação por calor, aglomeração e reticulação de proteínas). Foram usados aminoácidos, hidrolisado protéico com tamanho conhecido e proteína íntegra marcados com  $^{14}\text{C}$  para monitorar a lixiviação em função do peso molecular. A dieta aglomerada apresentou as maiores porcentagens de lixiviação de nutrientes para todos os compostos marcados sendo praticamente 100% para os aminoácidos, aproximadamente 62% para os hidrolizados e 36% para as proteínas íntegras para um tempo de solubilização de 60 minutos.

**Garcia-Ortega & Huisman [2001]** avaliaram a lixiviação de proteínas em dietas inertes produzidas em laboratório, usando fontes protéicas diversas e caboximetilcelulose como matriz de suporte. O tempo de solubilização foi de 60 minutos e as porcentagens liberadas dos nutrientes ficaram entre 32 e 46%.

#### 4.3.3.1.3. Dietas comerciais: composição protéica e solubilidade

Dietas comerciais fornecidas pelo Caunesp foram avaliadas quanto à solubilidade em sólidos totais e proteínas para comparação com as dietas em estudo.

Diversas dietas comerciais são usadas algumas vezes como referências de alimentos inertes, pois apresentam boa aceitação pelas larvas e boa capacidade para promover crescimento. A Tabela 12 apresenta a umidade e o teor de proteínas dessas dietas.

**Tabela 12:** Dietas comerciais importadas com boa aceitação e boa manutenção do crescimento das larvas, usadas como referências em ensaios biológicos

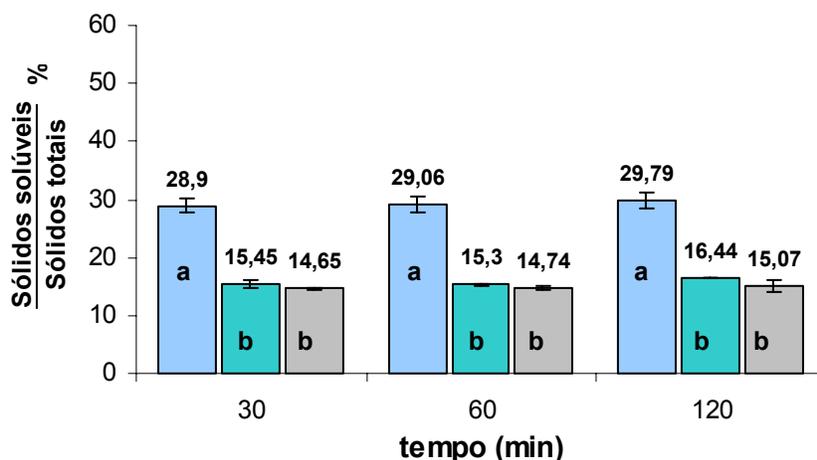
	USA	JP400	JP700
Teor de proteína %	53,16 ± 0,54*	60,85 ± 0,40	61,02 ± 0,59
Matéria Seca %	95,54 ± 0,23	97,05 ± 0,94	97,60 ± 1,03

USA: dieta de procedência americana. JP400: Dieta de procedência japonesa com diâmetro médio de 400 microns. JP700: dieta de procedência japonesa com diâmetro médio de 700 microns.

\* média ± desvio padrão.

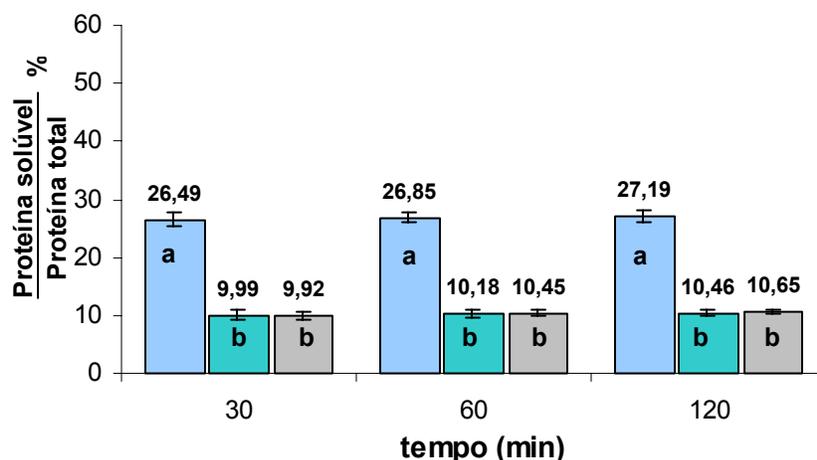
As dietas japonesas apresentam alto teor protéico e são comercializadas em diferentes faixas de tamanho, adequadas a cada estágio de crescimento das larvas. A dieta americana também pode ser obtida em diversas faixas de tamanho e apresenta teor protéico intermediário ao da dieta desidratada sem adição de óleo ou recobrimento produzida para esse trabalho (45,40% em base seca) e as dietas japonesas.

Todas as dietas comerciais apresentaram solubilidades baixas comparadas à dieta produzida por spray dryer sem recobrimento, entretanto, as dietas japonesas apresentaram os valores mais baixos de solubilidade medidos por sólidos solúveis conforme resultados apresentados na Figura 14.



**Figura 14:** Solubilidade em sólidos solúveis por sólidos totais das dietas comerciais: USA (□): dieta de procedência americana; JP400 (■): Dieta de procedência japonesa com diâmetro médio de 400 microns; JP700 (■): dieta de procedência japonesa com diâmetro médio de 700 microns. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) para o tempo de 120 minutos. Coeficiente de variação (desvio padrão / média  $\times 100$ ) máximo = 7,8%.

Para a solubilização da proteína foram observados os mesmos perfis de comportamento que para os sólidos solúveis. Os resultados são apresentados na Figura 15.



**Figura 15:** Solubilidade em proteína solúvel por proteína total das dietas comerciais: USA (□): dieta de procedência americana; JP400 (■): Dieta de procedência japonesa com diâmetro médio de 400 microns; JP700 (■): dieta de procedência japonesa com diâmetro médio de 700 microns. Letras diferentes

representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) para o tempo de 120 minutos. Coeficiente de variação (desvio padrão / média X 100) máximo = 7,3%.

Em termos comparativos, a solubilidade em sólidos solúveis da dieta americana (USA) foi 56,2% do valor apresentado para dieta sem recobrimento (D) após 120 minutos de solubilização. Para as dietas japonesas JP400 e 700 essa solubilidade foi de 29,7% do valor de solubilidade da dieta D nesse mesmo tempo.

Os aglomerados recobertos com pectina e cálcio (DOPC e DOGPC) liberaram em média 25,5% mais compostos em água do que as dietas japonesas.

Para as proteínas solúveis, a dieta americana (USA) apresentou uma liberação 45,1% do valor determinado para dieta sem recobrimento (D) após 120 minutos de solubilização. As dietas japonesas apresentaram em média 23,9% do valor da solubilidade de D nesse mesmo tempo.

Comparando os aglomerados às dietas comerciais, foram liberados, em média, 40,9% mais proteínas nas amostras produzidas em laboratório do que nas dietas japonesas.

A baixa eficiência na retenção dos nutrientes apresentada pelos aglomerados recobertos com pectina e cálcio (DOPC e DOGPC) parece decorrer de uma cobertura imperfeita, resultado da nebulização de material de cobertura insuficiente para formar uma proteção adequada nas partículas. **Jones [1988]** apresentou um estudo avaliando a quantidade de material de cobertura a ser pulverizado em função do tamanho das partículas, suficiente para depositar uma camada de 10 $\mu$ m nas mesmas. Segundo o autor, para se recobrir 100 kg de partículas com 44 $\mu$ m de diâmetro inicial seriam necessários 163,5 kg de material de cobertura em base seca ou 1635 kg de solução, considerando uma concentração de 10% do material de cobertura em solução. Esse valor é bastante superior ao utilizado no presente estudo.

#### 4.3.4. Diâmetro médio e distribuição do tamanho de partículas da dieta desidratada e dos aglomerados

A aceitação e os níveis de consumo de dietas inertes oferecidas às larvas de peixe nas fases iniciais de seu desenvolvimento dependem de diversos fatores, incluindo o tamanho das partículas, relacionado com a detecção das mesmas como alimento e com o tamanho de boca da larva [Kvave et al., 2005; Önal & Langdon, 2005].

Os alimentos vivos utilizados mais comumente na alimentação de larvas apresentam variação de tamanho de 125–300  $\mu\text{m}$  para rotíferos como *Brachionus plicatilis* e 428–517  $\mu\text{m}$  para *Artemia spp.* [Genodepa et al., 2004].

Os resultados de diâmetro médio para a dieta sem recobrimento (D), a dieta adicionada de óleo (DO) e os aglomerados (DOPC e DOGPC) são apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13:** Diâmetro médio das partículas da dieta desidratada e dos aglomerados – produtos finais.

Produto	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )
D	$46,68 \pm 1,05$ <sup>c*</sup>
DO	$42,95 \pm 1,33$ <sup>c</sup>
DOPC	$361,76 \pm 4,09$ <sup>b</sup>
DOGPC	$381,43 \pm 6,23$ <sup>a</sup>

\* Média  $\pm$  desvio padrão referentes a três leituras do equipamento.

D - dieta sem recobrimento; DO - dieta adicionada de óleo (adição manual); DOPC - dieta adicionada de óleo e recoberta no aglomerador com quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p); DOGPC - dieta adicionada de óleo e recoberta no aglomerador com duas passagens de gelatina (2% p/p) e quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p).

A dieta desidratada (D) apresentou tamanho característico de produtos processados em *spray dryer* [Oneda & Ré, 2003; Buffo et al., 2002; Cardoso, 2000; Rodríguez-Huezo et al., 2004].

Apesar de visualmente a dieta adicionada de óleo (DO) parecer aglomerada em função do óleo disperso na superfície das partículas, o seu diâmetro médio

não diferiu estatisticamente ( $p \geq 0,05$ ) da dieta sem recobrimento (D). Isso provavelmente deve-se ao uso de isopropanol como meio dispersante na análise pelo Mastersizer que solubilizou o óleo, desfazendo assim os aglomerados decorrentes da sua adição, restituindo o material ao seu tamanho original.

Os aglomerados (DOPC e DOGPC) apresentaram tamanhos estatisticamente diferentes da dieta original ( $p > 0,05$ ), evidenciando que a aglomeração foi bem sucedida com a produção de grânulos de diâmetros bem maiores que os da dieta sem recobrimento.

Para DOPC, os aglomerados obtidos apresentaram um tamanho 7,8 vezes maior que a dieta sem recobrimento. Para DOGPC, que sofreu dois ciclos de aglomeração a mais em função da adição da camada intermediária de gelatina, o aumento foi de 8,2 vezes em relação ao material sem cobertura. **Buffo et al. [2002]** obtiveram aumentos entre 1,2 a 3,2 vezes dependendo da solução aglomerante utilizada.

**Hemati et al. [2003]** apresentam o crescimento significativo dos aglomerados em função do tempo de processamento para carboximetilcelulose usada como agente de aglomeração. **Saleh [2003]** apresentam o crescimento dos aglomerados em função do tempo e do tamanho médio inicial das partículas processadas, onde partículas com menor diâmetro médio inicial ( $\sim 176\mu\text{m}$ ) tendem a formar grânulos maiores num mesmo período de tempo. Esse comportamento foi associado à maior área superficial dessas partículas, que tendem a capturar mais líquido de cobertura e sofrerem mais colisões dentro do leito fluidizado.

Os diâmetros médios dos aglomerados (DOPC e DOGPC) foram mantidos durante a análise, mesmo com o uso do isopropanol, mostrando que as pontes de pectato de cálcio formadas durante a aglomeração foram eficientes para tornar os aglomerados estáveis quanto ao tamanho.

Para avaliar a resistência da estrutura dos aglomerados, a determinação do tamanho de partícula para os tratamentos DOPG e DOGPC foi feita, com e sem

ação de ultra-som durante a dispersão das amostras (Tabela 14). Diminuições no diâmetro médio das partículas foram observadas com a aplicação de 10 segundos de ultra-som para as duas amostras indicando que uma parte das pontes formadas é relativamente frágil, fragmentando-se sob o efeito do ultra-som.

**Tabela 14:** Determinação de tamanho de partícula com e sem ultra-som para aglomerados que sofreram recobrimento polimérico.

Tratamento	Sem ultrasom	Com ultrasom
DOPC	361,76 ± 6,23 *	273,51 ± 15,96
DOGPC	381,43 ± 4,09	254,86 ± 8,81

\* Média ± desvio padrão referente a três leituras do equipamento.

DOPC - dieta adicionada de óleo e recoberta no aglomerador com quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p); DOGPC - dieta adicionada de óleo e recoberta no aglomerador com duas passagens de gelatina (2% p/p) e quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p).

Segundo **Cahu & Zambonino-Infante [2001]** o tamanho da dieta deve estar adequado ao tamanho da boca da larva e seus estudos mostraram que larvas com comprimento até 4 mm ingeriam preferencialmente partículas entre 50 e 150µm, entre 4 e 6 mm comprimento comeram partículas entre 150 e 250µm e ,acima de 6 mm de comprimento, deram preferência a partículas acima de 250µm.

Dietas comerciais microencapsuladas, comercializadas pelo site da Artemia International LLC, são oferecidas em diversas faixas de tamanho que no geral vão de 50 a 1000µm, sendo cada faixa indicada para uma etapa do desenvolvimento da larva. Por exemplo, a dieta com 200 – 300µm é recomendada como substituto da artêmia por ter tamanho semelhante a este microrganismo **[Artemia International LLC, acesso em junho de 2004]**.

**Carvalho et al. [2004]** em experimentos de crescimento e sobrevivência de larvas alimentadas com dietas inertes contendo diferentes quantidades de caseína (insolúvel, solúvel ou hidrolisada) usaram diferentes faixas de tamanho de dieta de acordo com o estágio de desenvolvimento das larvas variando de 100 a 600 µm.

**Kvale et al. [2005]** testaram a aceitação de três tipos de dietas inertes produzidas por diferentes métodos e usaram, nos experimentos com larvas, partículas com tamanho entre 120 a 320  $\mu\text{m}$ .

As distribuições de tamanho para a dieta sem recobrimento (D), para dieta adicionada de óleo (DO) e para os aglomerados (DOPC e DOGPC) foram unimodais e são apresentadas no anexo 1.

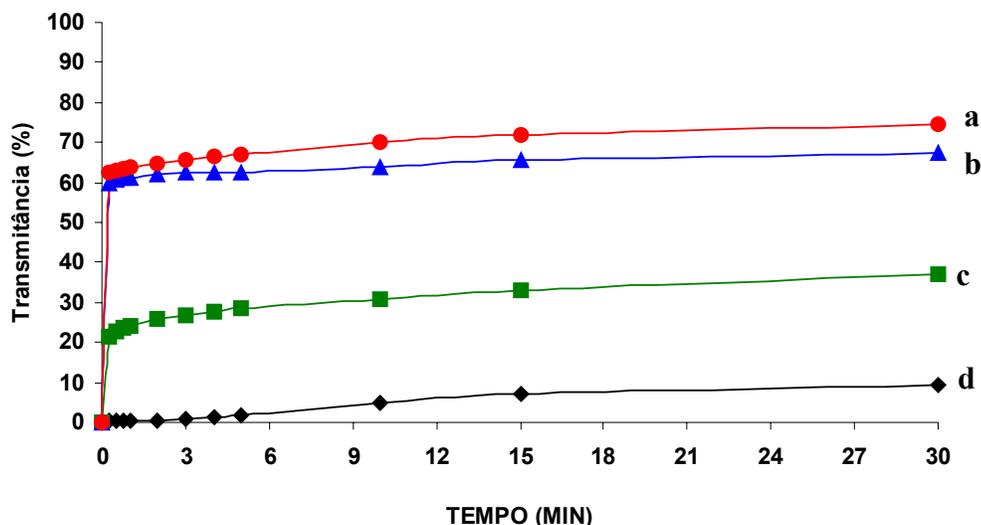
As dietas aglomeradas produzidas nesse trabalho apresentaram tamanhos de partículas com variações de diâmetro médio entre 361 e 381  $\mu\text{m}$ , estando dentro das faixas de dietas encontradas no mercado e citadas em diversos trabalhos. A aglomeração mostrou-se como um processo promissor na produção de dietas inertes para alimentação de larvas, pois permite ajustar os tamanhos dos aglomerados em faixas distintas, adequadas para cada estágio de desenvolvimento larval.

#### **4.3.5. Densidade e sedimentação**

A qualidade de dietas inertes está relacionada a diversos fatores nutricionais e tecnológicos e, dentre esses, a flutuabilidade da mesma pode ser determinante nos níveis de consumo em virtude do hábito alimentar da larva, que pode variar para cada espécie de peixe.

**Cahu & Zambonino-Infante [2001]** sugerem que as dietas devem permanecer por certo tempo dispersas na coluna d'água, permitindo que as larvas as detectem e a reconheçam como alimento.

A Figura 16 apresenta o perfil de sedimentação para a dieta sem recobrimento (D), dieta adicionada de óleo (DO) e amostras produzidas no aglomerador (DOPC e DOGPC).



**Figura 16:** Sedimentação da dieta sem recobrimento (D – ◆), da dieta adicionada de óleo (DO – ■ – adição manual) e dos aglomerados: DOPC – ▲ (dieta adicionada de óleo de milho por adição manual e recoberta no aglomerador com quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p)); DOGPC – ● (dieta adicionada de óleo de milho por adição manual e recoberta no aglomerador com duas passagens de gelatina (2% p/p) e quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p)). Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) para o tempo de 30 minutos. Coeficiente de variação (desvio padrão / média X 100) máximo = 3,5%.

A dieta sem recobrimento formou uma suspensão fortemente turva que apresentou baixa transmitância durante todo período de análise (30 minutos). Isso é indesejável, principalmente pela alta solubilidade apresentada por essa amostra.

A adição do óleo promoveu certa aglomeração na dieta DO, o que influenciou em seu perfil de sedimentação, acelerando a precipitação das partículas. Os grânulos formados não são estáveis podendo se fragmentar em partículas menores que permanecem em suspensão na coluna de água e isso, associado a alta solubilidade, manteve a transmitância final dessa amostra em 37%.

As dietas aglomeradas e recobertas (DOPC e DOGPC) apresentaram perfis de sedimentação semelhantes com valores estatisticamente diferentes para trinta minutos de análise ( $p < 0,05$ ) indicando que o aumento no número de passagens

pelo equipamento relativo à adição das camadas intermediárias de gelatina influenciou significativamente no tamanho médio das partículas (Tabela 13) e, conseqüentemente, na velocidade de precipitação das mesmas.

**Pedroza-Islas et al. [2000]** determinaram tempos de sedimentação entre 1,15 e 11,11 minutos para dietas inertes correlacionando os valores às taxas de dissolução das mesmas e da aceitação dessas dietas por larvas de peixes.

A densidade aparente para as amostras obtidas são apresentadas na Tabela 15.

**Tabela 15:** Densidade aparente da dieta sem recobrimento, dieta adicionada de óleo e amostras produzidas no aglomerador.

Produto	Densidade (g/mL)
D	0,524 ± 0,003 <sup>d *</sup>
DO	0,541 ± 0,003 <sup>c</sup>
DOPC	0,555 ± 0,007 <sup>b</sup>
DOGPC	0,570 ± 0,003 <sup>a</sup>

\* Média ± desvio padrão referente a três leituras do equipamento.

D - dieta sem recobrimento; DO - dieta adicionada de óleo (adição manual); DOPC - dieta adicionada de óleo e recoberta no aglomerador com quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p); DOGPC - dieta adicionada de óleo e recoberta no aglomerador com duas passagens de gelatina (2% p/p) e quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p).

A densidade aparente considera o volume total ocupado pela amostra, incluindo os espaços vazios entre as partículas.

A adição de óleo e o aumento no número de ciclos de aglomeração implicou em aumento da densidade aparente das dietas D, DOPC e DOGPC em relação a dieta sem recobrimento D. **Buffo et al. [2002]** obtiveram densidades absolutas superiores aos dos aglomerados em relação aos dos materiais sem aglomeração. Os valores de densidade absoluta citados por esses autores variaram de 0,899 a 1,285g/mL para materiais secos em *spray dryer* e seus aglomerados.

#### 4.3.6. Atividade de água ( $A_w$ )

A atividade de água ( $A_w$ ) está relacionada, juntamente com outros fatores, como temperatura e exposição a luz e oxigênio, à estabilidade e ao tempo de armazenamento (vida de prateleira) de alimentos. Em geral, valores acima de 0,6 favorecem diversas reações indesejáveis como oxidação, reação de Maillard, ação de enzimas e desenvolvimento de microrganismos [Fennema, 1996].

Os valores de atividade de água para a dieta sem recobrimento, dieta adicionada de óleo e amostras obtidas no aglomerador, são apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16:** Atividade de água da dieta sem recobrimento, da dieta adicionada de óleo e das amostras produzidas no aglomerador.

Produto	$A_w$
D	$0,204 \pm 0,004^d$
DO	$0,442 \pm 0,001^c$
DOPC	$0,573 \pm 0,001^a$
DOGPD	$0,495 \pm 0,002^b$

\* Média  $\pm$  desvio padrão referente a três leituras do equipamento.

D - dieta sem recobrimento; DO - dieta adicionada de óleo (adição manual); DOPC - dieta adicionada de óleo e recoberta no aglomerador com quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p); DOGPC - dieta adicionada de óleo e recoberta no aglomerador com duas passagens de gelatina (2% p/p) e quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p).

A dieta sem recobrimento apresentou valor de  $A_w$  compatíveis para produtos desidratados. Os aglomerados em todos os processamentos apresentaram valores maiores.

Variações na umidade implicam em mudanças nos valores de atividade de água. Esses dois parâmetros se correlacionam, mas não necessariamente, em diferenças proporcionais [Fennema, 1996; Vitali et al, 1997].

Os valores mais altos de  $A_w$  apresentados pela dieta adicionada de óleo e aglomerados foram associados aos valores de umidade apresentados por essas amostras (Tabela 11) sendo decorrência da manipulação em condições ambientes

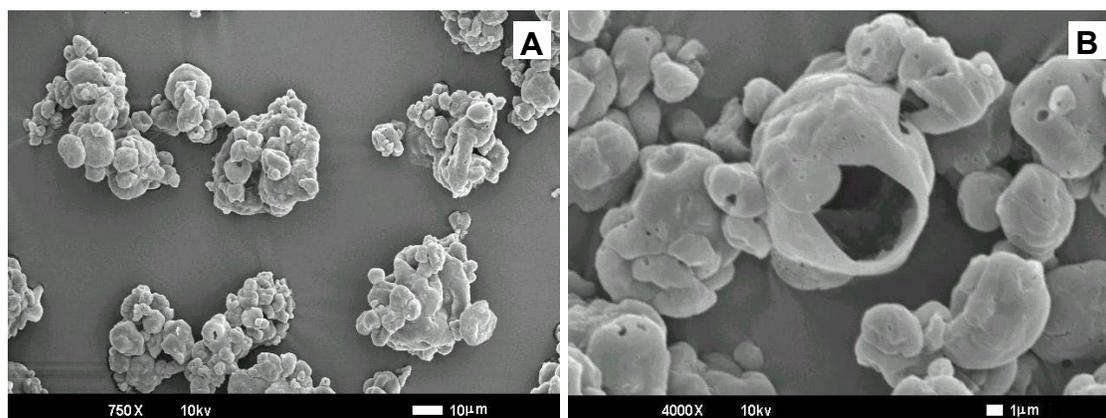
durante a adição do óleo e a introdução de água proveniente da solução de cobertura nos aglomerados. As amostras produzidas não sofreram secagem adicional por nenhum processo, o que poderia reduzir esses valores e aumentar a estabilidade das dietas recobertas, no entanto as condições de secagem devem ser cuidadosamente escolhidas para evitar danos por degradação térmica dos nutrientes e também ao recobrimento que, conseqüentemente, levaria a uma perda da eficiência de retenção dos constituintes da dieta.

#### 4.3.7. Morfologia e microestrutura

As imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia ótica mostram detalhes de estrutura dos diversos aglomerados e das dietas desidratadas.

##### 4.3.7.1 Dieta desidratada em *Spray dryer* sem recobrimento

A Figura 17 apresenta o aspecto da dieta desidratada por *spray dryer* sem recobrimento.



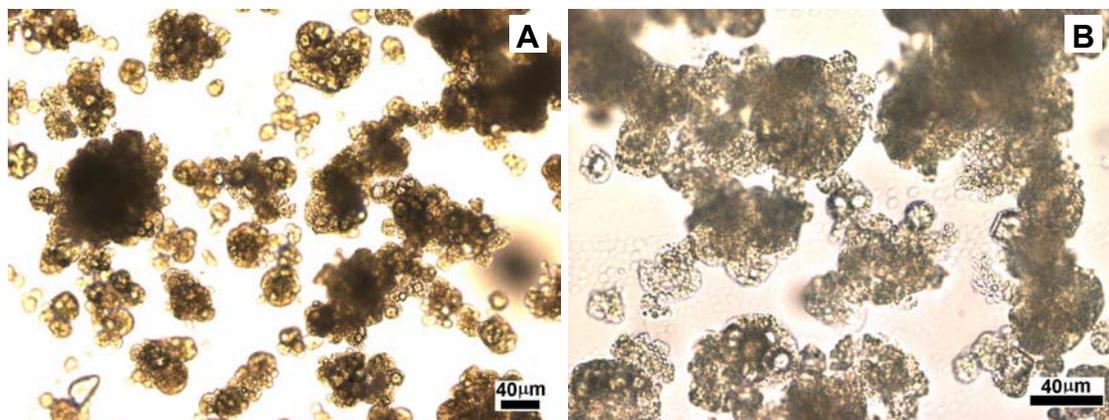
**Figura 17:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de Varredura. Dieta para pacu desidratada em *spray dryer*. A: barra = 10 µm; B: barra = 1 µm.

A dieta desidratada em *spray dryer* sem recobrimento apresentou aspecto característico de partículas obtidas por esse processo. Microcápsulas obtidas por *spray dryer* também apresentam esse tipo de estrutura [Buffo et al., 2002; Oneda & Ré, 2003; Cardoso, 2000; Jones, 1988; Rodríguez-Huezo et al., 2004].

No caso da dieta, os componentes em maior proporção (proteínas e carboidratos constituem aproximadamente 77% da composição em base seca) atuam como materiais de parede formando uma matriz de retenção para os outros nutrientes.

Na Figura 17, as partículas aparecem agregadas, indicando a coesividade típica de partículas muito pequenas, com tamanhos na faixa “C” do gráfico da Figura 5 [Guignon et al., 2002].

A Figura 18 apresenta a microscopia ótica da dieta desidratada por *spray dryer* com dispersão da amostra em água.



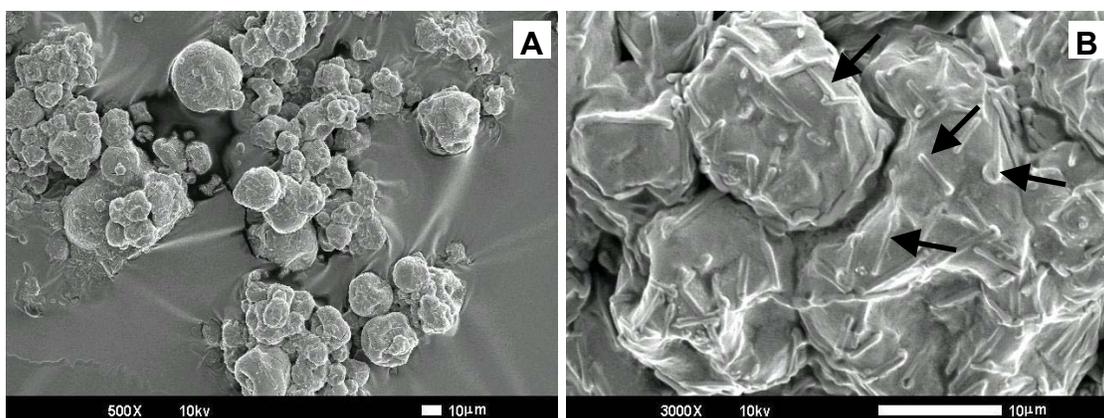
**Figura 18:** Imagens obtidas por microscopia ótica. Dieta sem recobrimento obtida por secagem em *spray dryer*. Meio de captação: água. Barras = 40 µm.

A dieta sem recobrimento (D) apresentou pequenas partículas dispersas e aglomerados de material. A coesividade apresentada pelas partículas secas também foi observada para as partículas suspensas em água.

Partículas muito pequenas tendem a ter baixa dispersibilidade em água, produzindo grandes aglomerados quando adicionadas nesse meio [Buffo et al., 2002; Guignon et al., 2002]. Essa característica é indesejável para produtos desidratados como café solúvel, leite em pó, achocolatados em geral, sabão em pó, condimentos, etc. A instaneização é muito empregada nesses casos para melhorar as propriedades de dispersão desses materiais, [Buffo et al., 2002; Guignon et al., 2002; Mort et al., 2001].

#### 4.3.7.2. *Dieta adicionada de óleo*

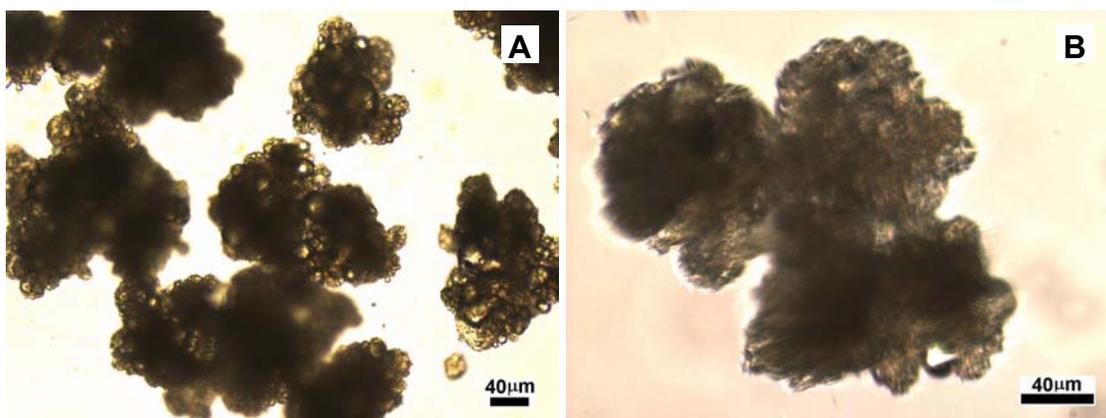
A Figura 19 mostra a dieta adicionada de óleo (DO).



**Figura 19:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de Varredura. Dieta adicionada de óleo (DO – incorporação manual): A – Barras = 100  $\mu\text{m}$ ; B – barra = 10  $\mu\text{m}$ . Setas pretas – óleo disperso na superfície das partículas.

A amostra apresentou partículas individuais com aspecto e tamanho semelhante à dieta sem recobrimento (Figura 17). A agregação, devido à grande quantidade de óleo disperso na superfície das mesmas, (Figura 19 - A) foi observada. Para aumento maior, foi possível observar a presença de pequenas “barras” na superfície das partículas (setas pretas na Figura 19 – B) que são provavelmente pequenas porções de óleo espalhadas sobre as mesmas. Ao ser

adicionada em água a dieta adicionada de óleo (DO) apresentou aglomeração (Figura 20).



**Figura 20:** Imagens obtidas por microscopia ótica. Dieta adicionada de óleo. Meio de captação: água. Barras = 40 µm.

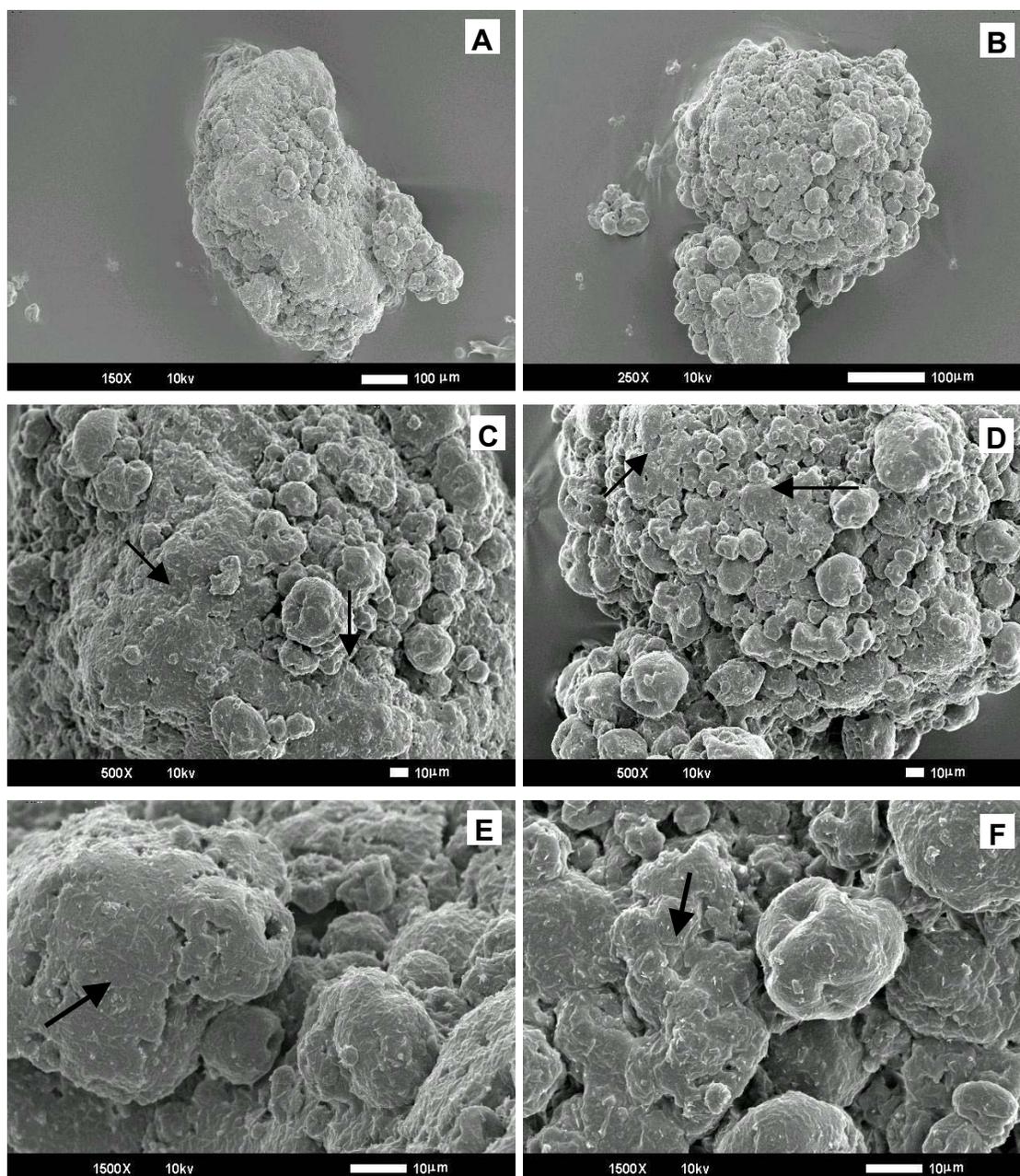
#### 4.3.7.3. *Aglomerados*

As microscopias ótica e eletrônica de varredura dos aglomerados com recobrimentos poliméricos DOPC e DOGPC são apresentados nas Figuras 21 e 22.

Nas seqüências da Figura 21, observa-se que o aglomerador foi eficiente na produção de grânulos com tamanhos maiores que a dieta sem recobrimento.

As amostras apresentaram aspecto muito similar ao observado por **Jones [1988]** para partículas produzidas em *spray dryer*, aglomeradas com a utilização de soluções poliméricas.

O formato dos aglomerados obtidos foi muito irregular, apresentando pontas e desníveis na superfície. Nas observações sob aumentos maiores foi possível detectar regiões cobertas nas partículas para as duas amostras, evidenciando o depósito do complexo de pectina e cálcio (Figura 21 C/E e D/F – setas pretas).

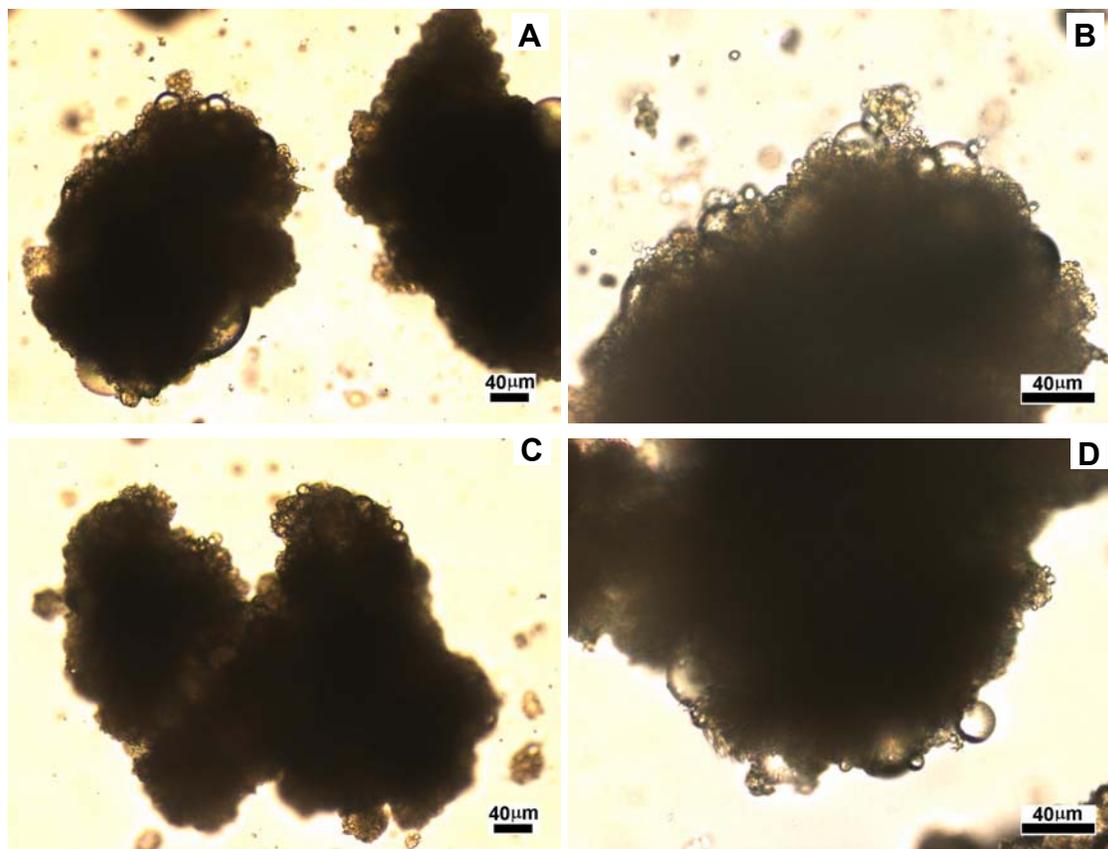


**Figura 21:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de Varredura. DOPC (A, C e E) – Dieta adicionada de óleo de milho (adição manual) recoberta no aglomerador com quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p). DOGPC (B, D e F) – Dieta adicionada de óleo de milho (adição manual) recoberta no aglomerador com duas passagens de gelatina (2% p/p) e quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p): A e B: barra=100µm; C e D: barra=10µm; E e F: barra=10µm.

O aspecto das amostras DOPC e DOGPC (Figura 21), com as falhas na cobertura, justificou a pouca eficiência do recobrimento na retenção dos nutrientes da dieta (Figuras 12 e 13). O recobrimento não homogêneo dos aglomerados foi relacionado à pouca quantidade de solução de cobertura nebulizada durante o tempo total de processamento para cada amostra que produziu uma umidificação suficiente para aglomeração da dieta e formação de grânulos com tamanhos maiores que a dieta sem recobrimento, mas foi insuficiente para criar uma cobertura contínua e uniforme sobre os aglomerados.

**Jones [1988]** associou imperfeições no recobrimento em leite fluidizado à pulverização em contracorrente ao fluxo de ar de coberturas poliméricas. Imperfeições no recobrimento de esferas de vidro (pouca homogeneidade na distribuição da camada e descamação da mesma) foram observadas por **Dewettinck et al. [1998]** que associaram esses defeitos às características de adesividade de diferentes tipos de polímeros. **Hemati et al. [2003]** citaram, além das características de adesividade do material de cobertura, o próprio contato físico das partículas entre si e com as paredes do equipamento, que podem levar à fragmentação da cobertura.

A Figura 22 apresenta a microscopia ótica das dietas DOPC e DOGPC re-hidratadas em água.

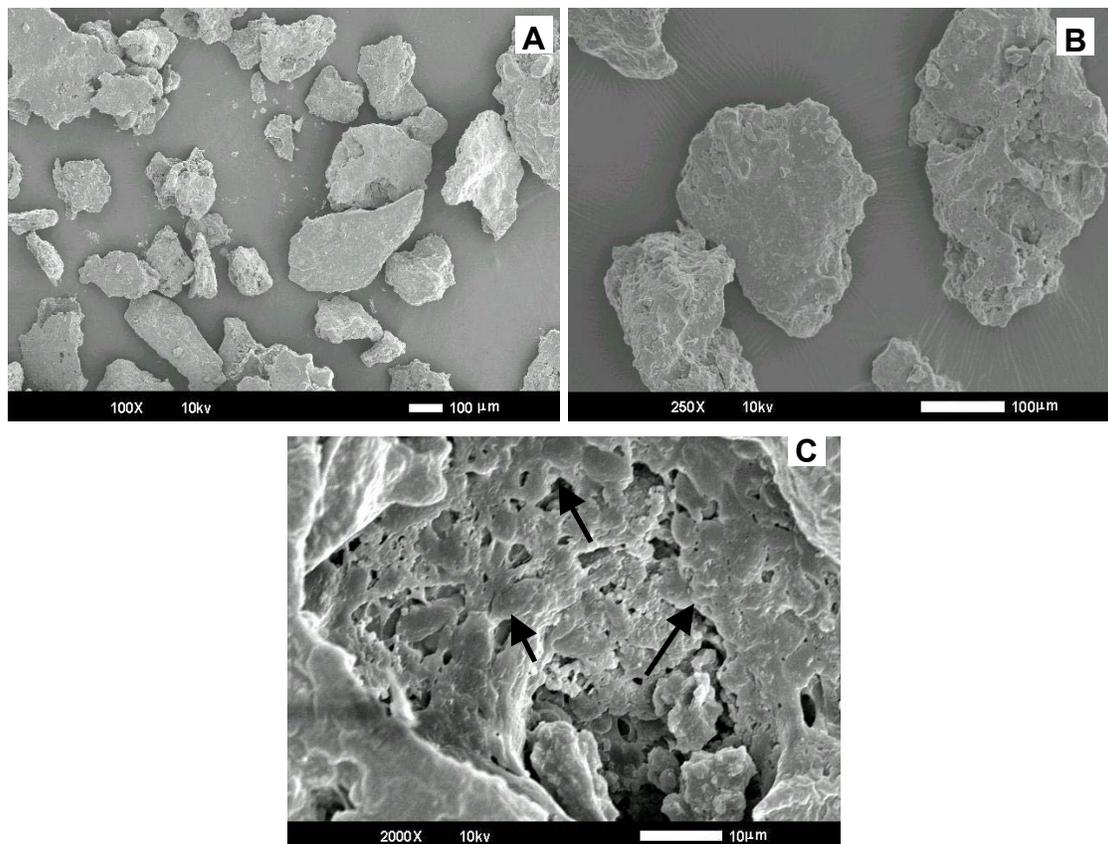


**Figura 22:** Imagens obtidas por microscopia ótica de dietas re-hidratadas. DOPC (A e B) – Dieta adicionada de óleo de milho (adição manual) recoberta no aglomerador com quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p), DOGPC (C e D) – Dieta adicionada de óleo de milho (adição manual) recoberta no aglomerador com duas passagens de gelatina (2% p/p) e quatro passagens de pectina (1%p/p) e cálcio (1%p/p). Meio de captação: água. Barras = 40 µm.

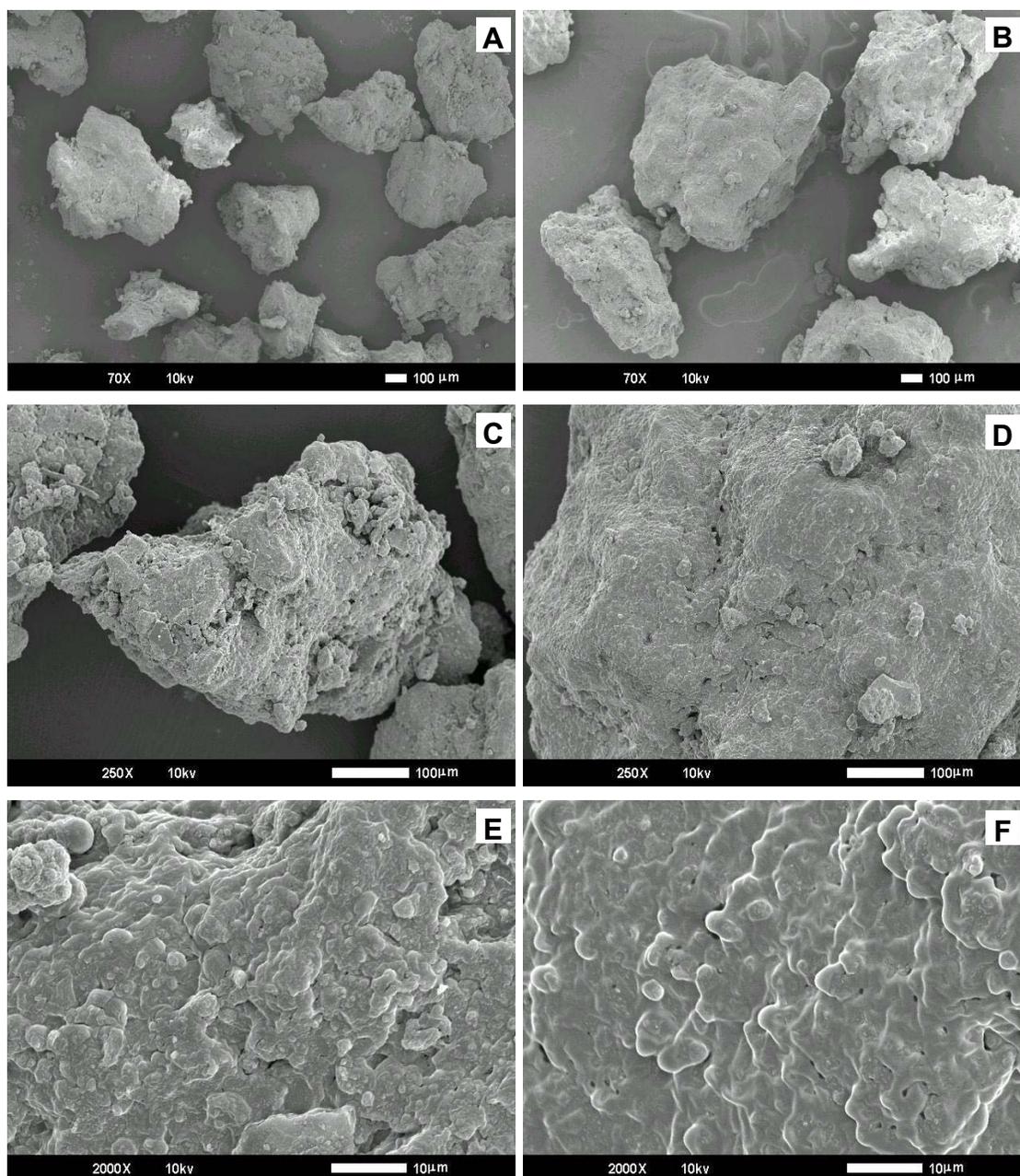
Os materiais aglomerados com cobertura polimérica DOPC e DOGPC quando colocados em água, apresentaram-se como partículas grandes e coesas (Figura 22), sendo isso um indicativo de que apesar da pouca eficiência para a retenção dos nutrientes, a cobertura depositada em partes dos grânulos e as pontes de ligação entre as partículas foram suficientes para manter a integridade dos aglomerados ao serem colocados na água. O aspecto da dieta é citado por diversos autores como de grande importância na aceitação de dietas inertes por larvas de peixes [Önal & Langdon, 2005; Kvale et al., 2005].

**4.3.7.4. Dietas comerciais**

Os aspectos das dietas comerciais são apresentados nas Figuras 23 e 24.



**Figura 23:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de Varredura de dieta comercial de procedência americana (USA). A e B: barras = 100 µm; C: barra = 10 µm. Setas pretas – falhas no recobrimento.



**Figura 24:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de Varredura de dietas comerciais de procedência japonesa: JP400 (A, C com barras = 100  $\mu\text{m}$  e E com barra = 10  $\mu\text{m}$ ). JP700 (B, D com barras = 100  $\mu\text{m}$  e F com barra = 10  $\mu\text{m}$ ).

As dietas comerciais apresentaram formatos muito irregulares com aspectos compactados. A dieta de origem americana (Figura 23) aparenta certa irregularidade quanto à distribuição de tamanho das partículas, quando comparada à dieta de origem japonesa (Figura 24).

Foi possível observar, nos aumentos maiores, o aspecto dos recobrimentos sobre as dietas comerciais, que se distribuíram uniformemente nas partículas (Figura 23-C e Figura 24 – E e F). Os recobrimentos dessas partículas apresentaram aparência similar aos recobrimentos dos aglomerados da Figura 21.

A dieta de origem americana apresentou algumas falhas no recobrimento (setas pretas - Figura 23-C) em quantidade inferior aos aglomerados produzidos nesse trabalho, mas que justificam sua maior solubilidade frente às dietas de origem japonesa, que mostram um recobrimento denso e uniforme (Figura 24).

O aspecto uniforme da superfície das partículas de dieta de origem japonesa pode ser decorrência de uma camada de recobrimento mais espessa, que elimina o aspecto irregular. **Sinchaipanid et al. [2004]** mostrou o efeito do aumento da camada de recobrimento na diminuição do aspecto rugoso de partículas recobertas com gordura.

**CAPITULO 5.****TÉCNICA DE COACERVAÇÃO COMPLEXA  
NA PRODUÇÃO DE DIETAS PARA LARVAS DE PEIXE****5.1. RESUMO**

A coacervação complexa é uma separação espontânea de fases baseada em uma interação eletrostática entre dois polímeros com cargas opostas em solução, que se associam formando um complexo neutro que precipita. Através da manipulação de condições do meio como pH ou força iônica, esses complexos podem formar-se ao redor de partículas ou gotículas de interesse, ocorrendo a microencapsulação por coacervação complexa, que vem sendo usada há décadas na proteção e controle da liberação de diversos compostos. Essa técnica é eficiente na encapsulação de compostos com baixa solubilidade ou insolúveis, mas é pouco eficiente para encapsulação de compostos hidrossolúveis. Um artifício para encapsulação de compostos solúveis por coacervação complexa é a retenção desses compostos em matrizes hidrofóbicas, que em seguida podem ser encapsuladas por coacervação. Esse capítulo apresenta a produção de micropartículas por coacervação complexa contendo compostos hidrofóbicos (oleoresina de páprica/óleo de soja) ou compostos hidrofílicos (glicose e isolado protéico de soro de leite) retidos em matrizes lipídicas (ácido esteárico e gordura vegetal hidrogenada 1:1). As micropartículas coacervadas contendo compostos hidrofóbicos também foram submetidas à secagem por estufa com circulação de ar, liofilizador e *spray dryer* com o uso de reticulantes (glutaraldeído e transglutaminase) São apresentados e discutidos dados relativos a diâmetro médio e distribuição de tamanho de partículas, morfologia, e perfis de liberação dos diversos compostos.

## 5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1. Materiais

Gelatina do tipo B fornecida pela Leiner Davis Gelatin Brasil (Cotia-SP), Goma Arábica da Synth, lote 30841, óleo de soja comercial Lisa, oleoresina de páprica Citromax, gordura vegetal Hidrogenada Saúde, ácido esteárico Vetec, HCl fumegante (37%) marca Merck lote UM 1789, Clorofórmio Synth Lote 64071, Metanol Synth 59868, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> marca Dinâmica Lote 0521, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> marca Synth, papel de filtro qualitativo da Merse, Glutaraldeído (25%) marca Nuclear, Transglutaminase (Activa TG-S<sup>®</sup>) cedida pela Aginomoto, glicose PA Synth, isolado protéico de soro de leite (Newzeland %proteína: 96%), kit para determinação de glicose LABORLAB (enzimático-colorimétrico), etanol 99% Comercial Chemco, SDS Vetec, trioleato de sorbitana (Dhaytan, T80) monoestearato de sorbitana (Dhaytan S60), triestearato de sorbitana (Dhaytan TS60) cedidos pela Dhaymers.

### 5.2.2. Equipamentos

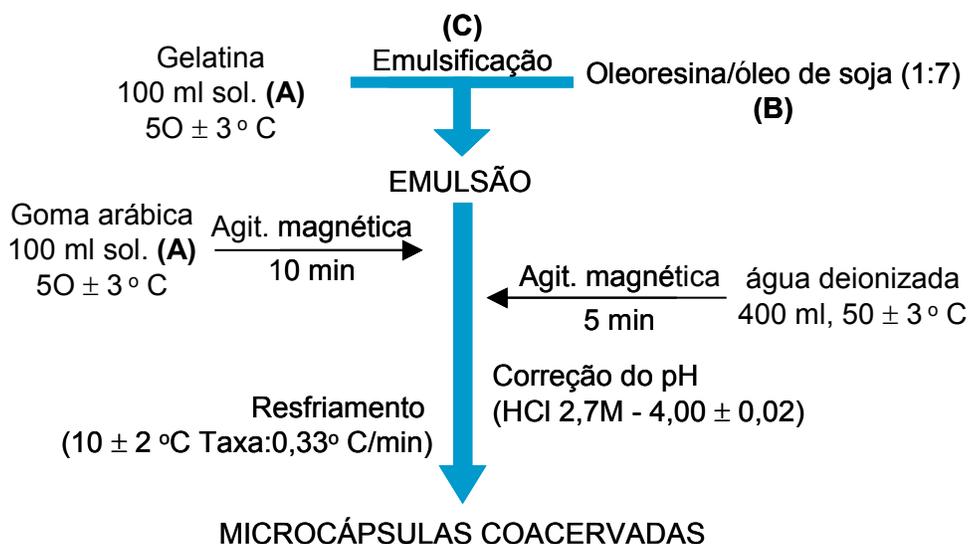
Mini *Spray dryer* BÜCHI mod. B-191, placas de agitação magnética com aquecimento Fisaton, pHmetro Digimed mod. MD20, balança analítica Ohaus mod. AS200, balança semi-analítica Marte mod. AS2000C, Ultraturrax mod. T18, marca IKA, liquidificador Sire, Homogeneizador rotativo para tubos Phoenix mod. AP22, agitador vibratório para tubos Super-Mixer Cole Palmer mod. 4722., ultrassom Thornton modelo C/T número de série 0697074, estufa Tecnal, liofilizador Edwards Pirani 501, espectrofotômetro Beckman DU70, centrífuga IECHN-S e vidrarias em geral.

### **5.2.3. Produção das micropartículas por coacervação**

A obtenção de micropartículas por coacervação é mostrada no fluxograma da Figura 25 e foi adaptada dos procedimentos descritos por **Thies [1995]** e **Lamprecht et al. [2000]**. Na obtenção das micropartículas coacervadas foram usados como materiais de parede soluções de gelatina e goma arábica e como recheio uma mistura de oleoresina de páprica e óleo de soja.

O pH de coacervação foi avaliado para valores de 4,5, 4,0, 3,5 e 3,0. Após a mistura da goma arábica (2,5% p/p) com a emulsão gelatina (2,5% p/p) – recheio (50% do total de material de parede em base seca) o pH foi acertado para o valor desejado. Após o resfriamento, as amostras produzidas foram observadas quanto ao aspecto do sistema (ocorrência de precipitação; aspecto do sobrenadante, presença de recheio não encapsulado na superfície do sobrenadante) e por microscopia ótica (integridade das partículas, esfecicidade e recheio não encapsulado).

As definições das condições de produção de micropartículas coacervadas foram divididas em testes preliminares e planejamento experimental. Os testes preliminares foram necessários para familiarização com a técnica de produção das micropartículas e também direcionaram a escolha das variáveis e níveis das mesmas no planejamento experimental. As condições de produção avaliadas nos testes preliminares estão listadas na Tabela 17.



**Figura 25:** Fluxograma de produção das micropartículas por coacervação. As letras entre parênteses indicam os pontos estudados nos testes preliminares.

**Tabela 17:** Variáveis avaliadas nos testes preliminares na produção de micropartículas por coacervação complexa.

Variáveis	Níveis
Quantidade total de polímeros (recheio fixo em 25% p/p. Letra A no fluxograma)	2,5, 5,0, 7,5 e 11% (p/p)
Quantidade de recheio (massa de recheio em relação à massa total de polímeros – b.s. Letra B no fluxograma)*	15, 25, 50 e 100% (p/p)
Velocidade para a formação da emulsão (sol.de gelatina-recheio – Letra C no fluxograma)	Ag. magnética por 5 minutos Liquidificador por 3 minutos Ultraturrax (14.000 rpm/ 2 min)

\* Nos testes preliminares foi utilizada uma mistura de oleoresina de páprica e óleo de soja na proporção 1:7.

Baseado nas indicações fornecidas pelos testes preliminares foi gerado um planejamento fatorial  $2^3$  com três pontos centrais. O planejamento permitiu a definição das condições finais de produção dos coacervados. A Tabela 18 apresenta as variáveis e respectivos níveis usados no planejamento experimental.

A eficiência de encapsulação (%EE) foi determinada como resposta para avaliação do planejamento.

**Tabela 18:** Variáveis e respectivos níveis usados no planejamento experimental.

Variável	-1	0	+1
Concentração de polímero <sup>1</sup>	2,5	5,0	7,5
Concentração de recheio <sup>2</sup>	50	100	150
Velocidade de homogeneização <sup>3</sup>	6000	10000	14000

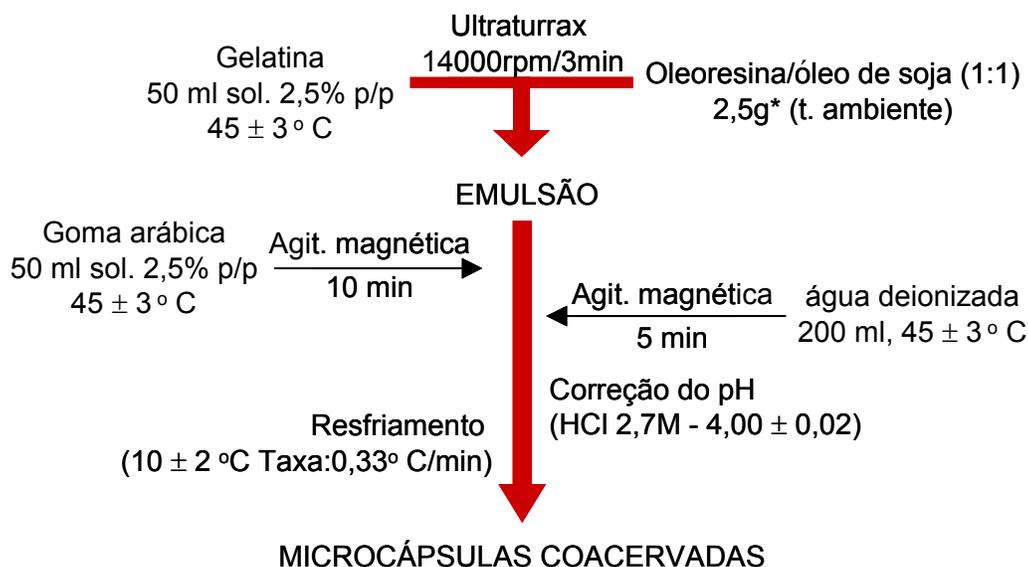
<sup>1</sup> Proporções iguais para gelatina e goma arábica (1:1). <sup>2</sup> Concentração calculada em relação à massa total de polímero do sistema em base seca. <sup>3</sup> UltraTurrax: etapa de emulsificação gelatina-recheio (rpm/2minutos). O pH de coacervação foi de  $4,00 \pm 0,02$ .

A quantidade de recheio retida pelas micropartículas coacervadas produzidas, segundo o planejamento experimental, foi determinada pelo teor de lipídeos totais, de acordo com o método descrito por **Bligh & Dyer [1959]** com modificações.

### **5.2.3.1. Obtenção de micropartículas coacervadas contendo compostos hidrofóbicos (recheio: oleoresina de páprica/óleo de soja)**

#### *5.2.3.1.1. Produção de micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja.*

A produção de micropartículas coacervadas contendo uma mistura de oleoresina de páprica e óleo de soja foi feita sob as condições apresentadas na Figura 26. A concentração das soluções de polímeros foi mantida em 2,5% e o recheio utilizado consistiu de uma mistura de oleoresina de páprica e óleo de soja na proporção de 1:1 (p/p).



**Figura 26:** Fluxograma da produção de micropartículas por coacervação complexa utilizando como recheio uma mistura de oleoresina de páprica e óleo de soja (1:1). \* massa de recheio referente a 100% do total de polímeros de parede do sistema em base seca.

#### 5.2.3.1.2. Uso de reticulantes para enrijecimento da parede das micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja.

Para reticulação das paredes das micropartículas coacervadas contendo oleoresina/óleo de soja foram usados glutaraldeído e transglutaminase.

O glutaraldeído foi testado nas concentrações de 0,1, 0,25 e 1,0 milimolares por grama de proteína (mM/g.ptn). Após o resfriamento em geladeira, a suspensão de partículas coacervadas foi ressuspensa sob agitação magnética e o volume da solução de glutaraldeído referente a cada concentração foi adicionado a ela. A mistura foi mantida em agitação durante três horas ou *por 18 horas*, em temperatura ambiente.

Após o tempo de reação, interrompeu-se a agitação para sedimentação das partículas, que foram lavadas para retirada do excesso de glutaraldeído pela remoção da água sobrenadante, sendo adicionado um novo volume de água, com

o pH ajustado para 4,0. Esse procedimento foi repetido por três vezes. Finalmente a água residual foi removida por peneiramento.

A reticulação com transglutaminase baseou-se em um valor de concentração testado para a gelatina em trabalhos anteriores utilizando-se 10U por grama de proteína [Chambi, 2004]. A quantidade de enzima foi devidamente pesada, solubilizada com 5mL de água deionizada (pH ajustado para 4,0) e adicionada à suspensão de partículas após o tempo de resfriamento na geladeira. A suspensão de partículas coacervadas adicionada de enzimas foi mantida sob agitação *por 18 horas* em temperatura ambiente. Após o período de reação, as partículas úmidas foram peneiradas e lavadas por três vezes com água deionizada.

Após a reticulação com glutaraldeído ou transglutaminase, seguida de lavagem, as micropartículas úmidas foram submetidas imediatamente à secagem (congelamento lento para liofilização ou secagem em *spray dryer*). Uma parte das amostras úmidas foi usada para caracterização, com alíquotas pesadas em tubos para determinação do perfil de liberação e em placas de Petri para determinação de umidade.

#### 5.2.3.1.3. Secagem de micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja.

Para a secagem das micropartículas coacervadas com ou sem reticulação foram utilizados estufa com circulação de ar, liofilizador e *spray dryer*. A Tabela 19 apresenta as condições de processo utilizadas em cada método.

**Tabela 19:** Condições de processo e preparo das amostras de micropartículas coacervadas contendo oleoresina/óleo para secagem.

Processo	Preparo da amostra	Condições
Spray Dryer	Susp. de micropartículas* (25° C) em agitação Reticulação: glutaraldeído: 1,0 e 0,25mM/g.ptn (3h e 18 horas); 0,1mM/g.ptn (18 horas). Transglutaminase: 10U/g.ptn (18 horas)	T entrada: 225° C T Saída: 125° C
Estufa**	Decantação das micropartículas* retirada da água superficial. Deposição do material em placas Reticulação: glutaraldeído: 1,0 e 0,25mM/g.ptn (3h/o.n.)	Temperatura 35° C Tempo: 18 horas ou até secagem completa
Liofilização	Decantação das micropartículas* retirada da água superficial. Deposição do material em placas Congelamento: Lento: Freezer (-18° C)/24h; Rápido: Adição direta de N <sub>2</sub> líquido. Reticulação: glutaraldeído: 1,0/g.ptn (3h e 18 horas); 0,1mM/g.ptn (18 horas). Transglutaminase: 10U/g.ptn (18 horas)	Temperatura: -40° C Pressão: 0,1mmHg Temp. final: 25°C/2h Tempo: 48h

\*Características das micropartículas: soluções de polímeros de parede: 2,5% p/p; recheio: 100% do total de material de parede em base seca (oleoresina/óleo de soja 1:1). \*\* Estufa com circulação de ar.

### **5.2.3.2. Obtenção de micropartículas coacervadas contendo compostos hidrofílicos (recheio: matrizes lipídicas carreando glicose ou isolado protéico de soro de leite)**

#### **5.2.3.2.1. Produção de micropartículas lipídicas (MPLs): Determinação da proporção de compostos hidrofóbicos constituintes da matriz**

Testes com misturas de ácido esteárico (AE: ponto de fusão aproximadamente de 70° C) e gordura vegetal hidrogenada (GVH: ponto de fusão aproximado de 35° C) foram feitos para determinação de uma proporção com ponto de fusão acima de 45-50°C, permitindo a obtenção de uma matriz relativamente macia que suportasse as condições de processamento na coacervação (temperatura da reação: 45-50° C).

Os lipídios fundidos a 85°C foram misturados ainda líquidos nas proporções de 75:25; 50:50; 25:75 (AE:GVH, p/p) em tubos de ensaio. Após o resfriamento e conseqüente enrijecimento das misturas, os tubos foram colocados em banho

aquecido e submetidos às temperaturas de 35, 40, 45, 50, 55 e 60° C. Decorridos 15 minutos de permanência em cada temperatura os tubos foram inclinados horizontalmente para verificar a firmeza do material, classificando-o em sólido (S), pastoso (P) ou líquido (L).

#### *5.2.3.2.2. Produção de micropartículas lipídicas (MPLs): Determinação da proporção entre mistura lipídica e solução de recheio.*

A determinação das proporções adequadas entre mistura lipídica e solução de recheio na produção das micropartículas lipídicas foi feita pela formação de emulsões com partes dos dois componentes. Foram preparadas uma mistura lipídica de ácido esteárico e gordura vegetal hidrogenada e uma solução de glicose a 50% (p/p). Elas foram misturadas nas proporções 50/50, 60/40 70/30, 80/20, 90/10 (mistura lipídica/solução de glicose) sendo homogeneizadas com o ultraturrax a 10000 rpm por 30 segundos. A temperatura da mistura foi mantida a 65° C com um banho-maria. As misturas foram avaliadas quanto à estabilidade visual da emulsão, fluidez e escoabilidade.

#### *5.2.3.2.3. Produção de micropartículas lipídicas (MPL): Planejamentos experimentais*

Para o estudo na produção de micropartículas lipídicas contendo glicose ou proteína (MPL-GLI ou MPL-PTN) foi utilizado um planejamento experimental 2<sup>3</sup> com três pontos centrais. As variáveis estudadas são listadas nas Tabelas 20 e 21.

**Tabela 20:** Variáveis e níveis do planejamento experimental 2<sup>3</sup> utilizado no estudo de produção de micropartículas lipídicas contendo glicose (MPL-GLI).

Variável	-1	0	+1
Concentração de glicose (p/p)	10	45	80
Proporção lipídio/sol. glicose (p/p)	70/30	80/20	90/10
Tensoativos*	B2	B3	B1

\*Tensoativos utilizados na quantidade de 5% do total de lipídios: B1 - Blenda1 (1:1): Dhaytan T80 (trioleato de sorbitana)/Dhaytan S60 (monoestearato de sorbitana); B2 - Blenda2 (1:1): Dhaytan TS80 (triestearato de sorbitana)/Dhaytan S60 (monoestearato de sorbitana); B3 - Blenda3 (1:1:2): Dhaytan TS80 (trioleato de sorbitana)/Dhaytan T80 (triestearato de sorbitana)/Dhaytan S60 (monoestearato de sorbitana).

**Tabela 21:** Variáveis e níveis do planejamento experimental 2<sup>3</sup> utilizado no estudo de produção de micropartículas lipídicas contendo proteína (MPL-PTN).

Variável	-1	0	+1
Concentração de proteína (p/p)	8	24	40
Proporção lipídio/sol. proteína (p/p)	70/30	80/20	90/10
Tensoativos*	B2	B3	B1

\*Tensoativos utilizados na quantidade de 5% do total de lipídios: B1 - Blenda1 (1:1): Dhaytan T80 (trioleato de sorbitana)/Dhaytan S60 (monoestearato de sorbitana); B2 - Blenda2 (1:1): Dhaytan TS80 (triestearato de sorbitana)/Dhaytan S60 (monoestearato de sorbitana); B3 - Blenda3 (1:1:2): Dhaytan TS80 (trioleato de sorbitana)/Dhaytan T80 (triestearato de sorbitana)/Dhaytan S60 (monoestearato de sorbitana).

A proporção entre o ácido esteárico e a gordura vegetal hidrogenada foi determinada experimentalmente e mantida fixa em 1:1 (p/p). A quantidade de tensoativos adicionada ao sistema baseou-se nos resultados observados por **Magee & Olson [1998a]** sendo de 5% (p/p) do total de lipídios do ensaio. As blendas foram formuladas nas proporções de 1:1 para as blendas B1 (Dhaytan T80/Dhaytan S60) e B2 (Dhaytan TS80/Dhaytan S60) e 1:1:2 para blenda B3 (Dhaytan TS80/Dhaytan T80/Dhaytan S60).

Para as MPL-GLI as respostas levantadas para avaliação do planejamento foram porcentagem liberada de glicose em 30 minutos (solvente: água destilada) e

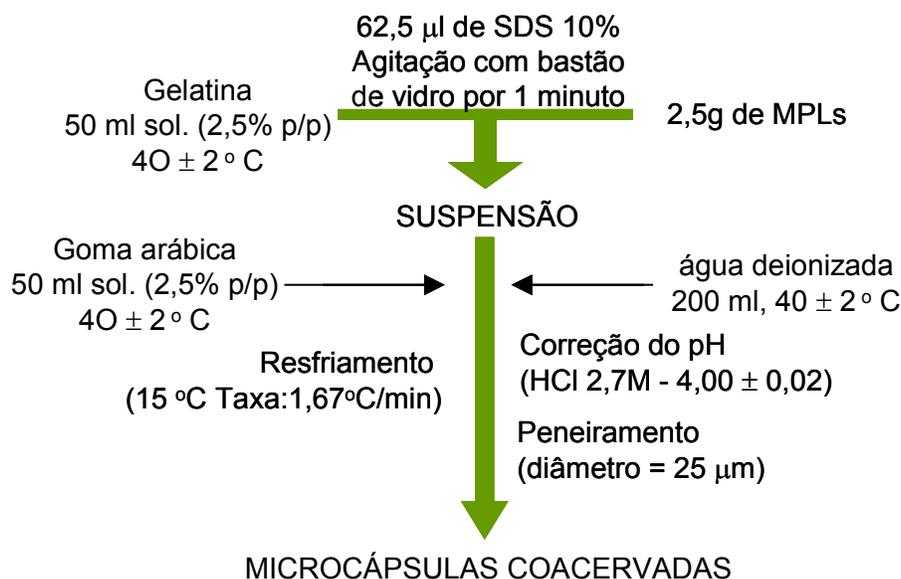
eficiência de encapsulação (%EE). Para as MPL-PTN a %EE foi utilizada como resposta na avaliação do planejamento.

#### 5.2.3.2.4. Produção de micropartículas lipídicas (MPL): Processamento

A mistura lipídica, as soluções de glicose ou proteína e as blendas de tensoativos, nas proporções definidas para cada ensaio do planejamento, foram aquecidas até 65°C e homogeneizadas a 10000 rpm/30 segundos no UltraTurrax. A formatação das micropartículas lipídicas (MPLs) foi feita pela pulverização com o atomizador duplo fluído do mini *spray dryer* Buchi, aquecido a 90° C e com pressão de ar de 1,0 kgf/cm<sup>2</sup>. A temperatura da câmara não foi superior a de 30°C e a temperatura ambiente foi mantida a 22° C. As emulsões preparadas, como descrito acima, foram adicionadas manualmente, na entrada de alimentação do atomizador do *spray dryer*, e pulverizadas na câmara. Terminado o processo, a câmara de vidro foi resfriada naturalmente e as MPLs recolhidas, com a ajuda de um pincel, sendo armazenadas em potes plásticos para análise.

#### 5.2.3.2.5. Incorporação de micropartículas lipídicas contendo glicose ou proteína em micropartículas coacervadas (CMPLs).

A incorporação das MPLs em micropartículas coacervadas seguiu o procedimento descrito no fluxo grama da Figura 27.



**Figura 27:** Fluxograma da produção de micropartículas por coacervação utilizando como recheio micropartículas lipídicas contendo glicose ou proteína.

Foram preparados três sistemas independentes para cada MPL-GLI e três para MPL-PTN. Ainda foram preparados três sistemas contendo MPLs produzidas sem recheio, constituídas apenas de mistura lipídica atomizada, para serem usadas com “brancos” .

#### 5.2.4. Caracterização das micropartículas coacervadas

##### 5.2.4.1 Determinação de umidade

A umidade dos produtos foi determinada por secagem em estufa a 105°C por 16 horas, segundo metodologia da **AOAC [1998]**. O cálculo da umidade das amostras leva em consideração a perda de massa ocorrida na secagem.

#### **5.2.4.2. Determinação do diâmetro médio de partículas e distribuição de tamanho**

A determinação de tamanho de partículas foi feita por microscopia ótica, com captação de imagens através de uma câmera digital controlada pelo programa Global Lab Image. O aumento total de captação foi de 15,6x (objetiva de 12.5x de aumento e optivar com 1,25x de aumento). As fotos digitalizadas foram processadas e o tamanho de partícula determinado pelo programa Scion Image ([www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com)). Entre 100 e 150 partículas foram medidas para cada amostra analisada.

#### **5.2.4.3. Flutuabilidade**

A determinação da flutuabilidade da dieta e dos aglomerados foi adaptada do método descrito em **Pedrosa-Islas et al. [2000]**, Em tubos de ensaio de vidro de 5mL foram adicionadas em torno de 30 mg e 3 mL de água destilada a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Os tubos foram submetidos à agitação intermitente em agitador vibratório por 10 segundos. Rapidamente a mistura foi transferida para uma cubeta de vidro e a variação da transmitância foi monitorada a 600nm em um espectrofotômetro Beckman DU 70, nos tempos 15, 30 e 45 segundos, 1,2, 3, 4, 5, 10, 15 e 30 minutos.

#### **5.2.4.4. Morfologia e microestrutura**

A morfologia e microestrutura das micropartículas coacervadas foi avaliada por microscopia ótica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV - micropartículas desidratadas) e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).

Para observação das micropartículas lipídicas e micropartículas coacervadas úmidas e secas utilizou-se um microscópio ótico (NIKON – eclipse

E800 - Japan) munido do software Image Pro Plus 4.0 para obtenção das imagens. A observação e captação das imagens foram feitas em água (partículas úmidas e re-hidratadas) e glicerina (micropartículas lipídicas e partículas desidratadas).

A observação por MEV foi feita para as micropartículas lipídicas e micropartículas coacervadas contendo oleoresina/óleo desidratadas. O preparo das amostras para observação seguiu o procedimento descrito no capítulo 4, item 4.2.5.5. A aceleração da voltagem durante a observação e captação das imagens foi de 10kv para as micropartículas coacervadas e de 5kv para as micropartículas lipídicas.

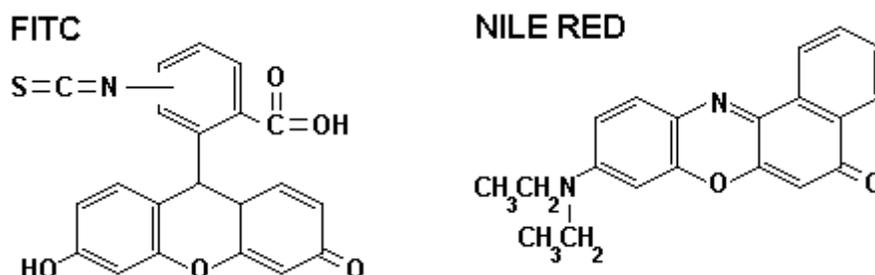
A microscopia confocal foi empregada com base nos procedimentos de **Lamprech et al. [2000]** com algumas modificações, usando-se os corantes fluorescentes FITC (isotiocianato de fluoresceína) e *Nile Red*. Três tipos de micropartículas foram avaliadas por essa microscopia:

- Micropartículas coacervadas úmidas contendo como recheio uma mistura de gordura vegetal hidrogenada (GVH) fundida a 50° C e uma solução de caseína a 11% (homogeneização: ultraturrax - 14000rpm/2min);
- Micropartículas lipídicas contendo proteína (MPL-PTN);
- Micropartículas coacervadas contendo micropartículas lipídicas com proteína (CMPL-PTN).

A produção das micropartículas coacervadas contendo gordura vegetal hidrogenada e caseína, seguiu o fluxograma da Figura 26 e as micropartículas lipídicas e seus coacervados foram produzidos como descrito em 5.2.3.2.3. e na Figura 27.

O FITC é uma molécula orgânica pequena (Figura 28) que tem como sítio de conjugação aminas primárias livres. O FITC, dissolvido em DMSO (dimetil sulfóxido) na proporção de 1 mg/mL, foi adicionado na quantidade de 50 µl para cada 2,5g de polímero em solução. A reação foi conduzida a 40°C, sob agitação

por uma hora. O *Nile Red* (Figura 28) reage com substâncias apolares por interações hidrofóbicas. O corante foi adicionado na proporção de 1mg para cada 30g de óleo e a mistura foi mantida em agitação até completa dissolução do corante.



**Figura 28:** Estruturas químicas dos corantes FITC e *Nile Red* (site da Sigma: [http://www.sigmaaldrich.com/cgi-bin/hsrun/Distributed/HahtShop/HAHTpage/HS\\_StructureImage](http://www.sigmaaldrich.com/cgi-bin/hsrun/Distributed/HahtShop/HAHTpage/HS_StructureImage) - acesso em junho, 2003).

A Tabela 22 apresenta diversas amostras que foram produzidas pela reação de constituintes distintos das micropartículas coacervadas e micropartículas lipídicas com os corantes fluorescentes.

**Tabela 22:** Lotes de micropartículas coacervadas e micropartículas produzidos com ingredientes marcados por corantes fluorescentes para microscopia confocal.

Micropartículas coacervadas contendo GVH e caseína				
Tratamento*	Goma Arábica	Gelatina	Gord. Veg. Hidrogenada	Caseína (sol 10% p/p)
GAF	FITC <sup>a</sup>	Não corada	Não corada	Não corada
GF	Não corada	FITC <sup>a</sup>	Não corada	Não corada
GFGVN	Não corada	Não corada	<i>Nile Red</i> <sup>b</sup>	FITC <sup>a</sup>
GVNCF	Não corada	FITC <sup>a</sup>	<i>Nile Red</i> <sup>b</sup>	Não corada
Micropartículas lipídicas contendo proteína (MPL-PTN)				
MLNPF	Mistura lipídica <i>Nile Red</i> <sup>b</sup>		Solução de proteína FITC <sup>a</sup>	
Micropartículas coacervadas contendo MPL-PTN				
GFMLN	Goma Arábica Não corada	Gelatina FITC <sup>a</sup>	Mistura lipídicas <i>Nile Red</i> <sup>b</sup>	proteína Não corada

\* As siglas foram montadas em função dos componentes corados no sistema: GAF – goma arábica corada com FITC; GF – gelatina corada com FITC; GFGVN - gelatina corada com FITC e Gordura Vegetal corada com *Nile Red*; GVNCF – Gordura Vegetal corada com *Nile Red* e Caseína corada com FITC. MLNPF – mistura lipídicas corada com *Nile Red* e proteína coarada com FITC; GFMLN – Gelatina corada com FITC e mistura lipídica corada com *Nile Red*. <sup>a</sup> – 50µl/2,5g de polímero; <sup>b</sup> – 1,0mg/30g de lipídio.

As observações foram feitas em um microscópio de Varredura Laser Confocal Olympus LSM – Fluoview versão 3-2 (Olympus, Tóquio, Japão) nos laboratórios da divisão Farmanguinhos do Instituto Adolfo Lutz - RJ. As condições de trabalho, para coleta de imagens são descritas no anexo 2.

#### ***5.2.4.5. Determinação da quantidade total de compostos hidrofílicos ou hidrofóbicos contidos nas micropartículas lipídicas e nos coacervados***

##### *5.2.4.5.1. Determinação da quantidade total de oleoresina de páprica contida nas micropartículas coacervadas (CORP).*

A determinação da quantidade total de oleoresina nas micropartículas coacervadas úmidas após o processamento foi feita por diferença entre a quantidade inicialmente pesada para formação da emulsão com a solução de gelatina e a oleoresina perdida durante o processo até o peneiramento das partículas. O monitoramento das perdas foi feito cuidadosamente de forma a produzir baixa variabilidade entre as repetições. A quantificação da oleoresina das micropartículas desidratadas por liofilização foi feita considerando que essas amostras foram obtidas pela secagem dos respectivos sistemas úmidos. Sendo assim, a quantidade de oleoresina contida nos sistemas desidratados, foi considerada a mesma dos sistemas úmidos corrigidos para base seca.

##### *5.2.4.5.2. Determinação da quantidade total de glicose contida nas micropartículas lipídicas (MPL-GLI) e seus coacervados (CMPL-GLI).*

Em tubo com tampa foi adicionado 0,1g de micropartículas lipídicas contendo glicose e 6g de água destilada. Os tubos foram mantidos em banho-maria em temperatura de 85° C por 15 minutos para a total liquefação da mistura lipídica, sendo submetidos a agitação manual por 5 segundos, a cada 5 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados e uma alíquota da água foi removida para

análise por método enzimático (glicose oxidase) com determinação colorimétrica do teor de glicose contido em 20 µl de amostra (leitura em espectrofotômetro a 505nm). A quantificação da glicose foi feita a partir de uma curva padrão construída utilizando a mesma glicose adicionada às micropartículas (resultados apresentados em mg de glicose/100 mL de amostra).

Para os coacervados contendo micropartículas lipídicas com glicose, usou-se uma solução de SDS 10% p/p que, nessa concentração, desfez o complexo coacervado e solubilizou a mistura lipídica, liberando totalmente a glicose. Em tubo com tampa foram pesados 0,1g de CMPL-GLI, adicionando-se 5g de solução SDS 10% agitando levemente para dispersar as partículas. A mistura foi mantida em repouso 18 horas e em seguida foram adicionados 5g de água destilada. O material foi filtrado e a glicose determinada no permeado.

Para avaliação de possíveis interferências na reação colorimétrica foram testadas em triplicata a determinação de uma quantidade de glicose livre conhecida em SDS e a determinação de glicose em um coacervado produzido com MPL constituídas apenas de lipídios (“brancos”).

A eficiência de encapsulação (%EE) para MPL-GLI, produzidas em cada ensaio do planejamento experimental, foi determinada pelo cálculo:

$$\%EE = \frac{\text{Glicose total quantificada}}{\text{Glicose total}^*} \times 100$$

\*Pesada inicialmente

#### 5.2.4.5.3. Determinação da quantidade total de proteína contida nas micropartículas lipídicas (MPL-PTN) e seus coacervados (CMPL-PTN).

A quantidade total de proteína foi determinada pelo método de Kjeldhal [AOAC, 1998] com fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,25.

Devido ao alto teor de gordura, as micropartículas lipídicas adicionadas de ácido sulfúrico concentrado e catalisador, foram mantidas sob aquecimento brando de 150°C por aproximadamente 24h para evitar a formação de espuma e conseqüente perda das amostras. Após esse período, a temperatura foi elevada gradualmente para 360°C e mantida até total digestão das amostras.

Para os coacervados, a quantificação da proteína livre foi feita por diferença entre o conteúdo protéico total de coacervados contendo micropartículas lipídicas com proteína e conteúdo protéico total de coacervados, contendo apenas micropartículas de mistura lipídica pura.

O cálculo da eficiência de encapsulação (%EE) para MPL-PTN produzidas em cada ensaio do planejamento experimental foi determinado como se segue:

$$\%EE = \frac{\text{Proteína total quantificada}}{\text{Proteína total}^*} \times 100$$

\* Pesada inicialmente

As quantidades de proteína quantificada e teórica são expressas em gramas de proteína por 100 gramas de micropartículas lipídicas.

### **5.2.5. Perfis de liberação de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos**

#### **5.2.5.1. Perfil de liberação de oleoresina de páprica de micropartículas coacervadas**

As amostras foram produzidas segundo o fluxograma da Figura 26 sendo reticuladas com glutaraldeído ou transglutaminase e também desidratadas por liofilização ou *spray dryer*. A Tabela 23 apresenta as amostras produzidas para avaliação da liberação de oleoresina de páprica.

As liberações de oleoresina das micropartículas coacervadas úmidas, com ou sem reticulação, foram feitas pesando-se entre 0,0700 e 0,0800g das amostras

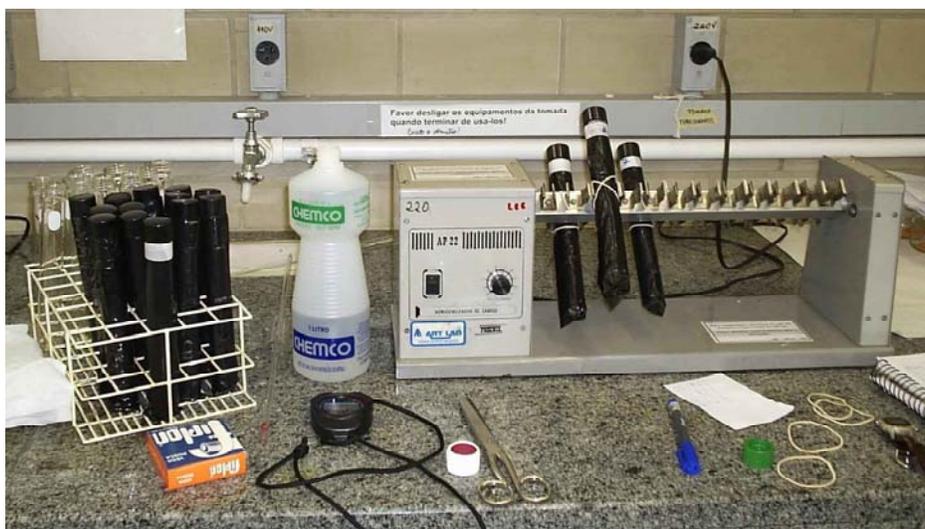
em tubo com tampa e adicionando-se 1mL de água deionizada para ressuspensão das partículas. Para as partículas desidratadas pesou-se 0,0175 a 0,0200g em tubos com tampa. Um volume de 50mL de etanol absoluto foi adicionado em cada tubo, vedado com o auxílio de fita veda roscas. Os tubos preparados em triplicatas para cada tempo foram cobertos com plástico preto para evitar possíveis degradações dos compostos corados de cor da oleoresina e foram mantidos em agitador rotativo sendo retirados após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, tendo o seu conteúdo filtrado em papel de filtro a baixo vácuo. O filtrado foi quantificado quanto ao conteúdo de oleoresina liberada (Figura 29).

**Tabela 23:** Amostras produzidas para avaliação da liberação de oleoresina de micropartículas coacervadas.

<b>Código</b>	<b>Descrição*</b>
SR	Micropartículas coacervadas sem reticulação úmidas.
SRL	Micropartículas coacervadas sem reticulação posteriormente secas por liofilização
G0,1	Micropartículas coacervadas reticuladas com 0,1mM de glutaraldeído/g de proteína, <i>18 horas</i> , úmidas.
G0,1L	Micropartículas coacervadas reticuladas com 0,1mM de glutaraldeído/g de proteína, <i>18 horas</i> , posteriormente secas por liofilização.
G0,1SD	Micropartículas coacervadas reticuladas com 0,1mM de glutaraldeído/g de proteína, <i>18 horas</i> , posteriormente secas em <i>spray dryer</i> .
G1	Micropartículas coacervadas reticuladas com 1mM de glutaraldeído/ g de proteína, <i>18 horas</i> , úmidas.
G1L	Micropartículas coacervadas reticuladas com 1mM de glutaraldeído/ g de proteína, <i>18 horas</i> , posteriormente secas por liofilização.
G1SD	Micropartículas coacervadas reticuladas com 1mM de glutaraldeído/ g de proteína, <i>18 horas</i> , posteriormente secas em <i>spray dryer</i> .
TG	Micropartículas coacervadas reticuladas com 10U de enzima/g de proteína, <i>18 horas</i> , úmidas.
TGL	Micropartículas coacervadas reticuladas com 10U de enzima/g de proteína, <i>18 horas</i> , posteriormente secas por liofilização.
TGSD	Micropartículas coacervadas reticuladas com 10U de enzima/g de proteína, <i>18 horas</i> , posteriormente secas em <i>spray dryer</i> .

\*As amostras foram produzidas com soluções poliméricas (gelatina e goma arábica) de concentração 2,5%. A quantidade de recheio (oleoresina/oleode soja 1:1) foi de 100% do total de material de parede em base seca.

Para quantificação da oleoresina liberada uma curva padrão da mistura de recheio foi construída (oleoresina/óleo de soja), pela solubilização de uma quantidade conhecida da mesma em etanol absoluto. Alíquotas (em triplicata) de diluições sucessivas de uma solução contendo uma quantidade conhecida de oleoresina (0,15mg/mL) foram lidas em espectrofotômetro a 452nm. A curva expressa valores em miligramas de oleoresina por mililitros de etanol.



**Figura 29:** Sistema composto de tubos e agitador rotativo usado na avaliação da liberação de oleoresina de micropartículas coacervadas.

### **5.2.5.2 Perfis de liberação de Glicose de micropartículas lipídicas e seus coacervados**

#### **5.2.5.2.1. Liberação de glicose de micropartículas lipídicas (MPL-GLI)**

Para avaliação do perfil de liberação de glicose das micropartículas lipídicas foi selecionado o ensaio do planejamento experimental com menor resposta quanto à liberação em 30 minutos. Essa amostra foi avaliada quanto à liberação de glicose nos tempos 30, 120, e 240 minutos, com ou sem agitação, nas temperaturas de 25 e 40°C. A liberação foi avaliada em triplicata para cada tempo/temperatura.

Para liberação da glicose sem agitação foi pesado 0,1g de micropartículas e 6g de água destilada em tubos com tampa, mantidos na temperatura desejada (25°C ou em banho-maria à 40°C). Nos tempos de 30, 120 e 240 minutos foram retiradas alíquotas do fundo dos tubos, com o auxílio de uma seringa, para quantificação da glicose liberada.

Na determinação da liberação da glicose, sob agitação, foram pesados 0.4g de MPL-GLI e 25 g de água destilada em *beckers* de 50mL. Os *beckers* foram mantidos sob agitação em *shaker* na temperatura desejada (25 ou 40°C) sendo removidos nos tempos determinados. Após um repouso por 5 min para flutuação das partículas de gordura, foram removidas alíquotas do fundo dos *beckers* com uma seringa para quantificação da glicose liberada.

#### *5.2.5.2.2. Liberação de glicose de micropartículas coacervadas contendo micropartículas lipídicas (CMPL-GLI)*

A determinação de glicose liberada dos coacervados foi feita após 1 e 20 horas. Foram pesados em *beckers* 3,10g de micropartículas coacervadas (produzidas segundo o fluxograma da Figura 27 e contendo as micropartículas lipídicas que foram usadas no item anterior) e adicionados volumetricamente 25mL de água. Os *beckers* foram mantidos tampados e sob agitação em *shaker*, em temperatura ambiente. Nos tempos determinados a agitação foi interrompida por 5 minutos para deposição das partículas e uma alíquota de 0,1mL foi recolhida da superfície para quantificação da glicose liberada. Foi feita a reposição de solvente no tempo de 60 minutos. Todas as análises foram feitas em triplicata.

#### **5.2.5.3 Perfis de liberação de proteína de micropartículas lipídicas e seus coacervados**

##### *5.2.5.3.1. Liberação de proteína de micropartículas lipídicas (MPL-PTN)*

Para avaliação do perfil de liberação de proteína das micropartículas lipídicas foram selecionados três amostras contendo quantidades diferentes de proteína produzidas no planejamento experimental. Essas amostras foram avaliadas quando à liberação nos tempos de 30, 120 e 240 minutos sem agitação, nas temperaturas de 25 e 40°C. A liberação foi avaliada em triplicata para cada tempo/temperatura.

Foram pesados 0,1g de micropartículas e 6g de água destilada em tubos com tampa, mantidos na temperatura desejada (25 ou em banho à 40°C). No tempo determinado, três tubos de cada amostra foram removidos e filtrados. O papel de filtro contendo as MPL-PTN foi colocado em tubos de kjedhal para determinação do conteúdo de proteína residual.

A quantidade de proteína liberada foi calculada com a seguinte formula:

$$\%PTN \text{ LIB} = \frac{(PTN \text{ total} - PTN \text{ retida})}{PTN \text{ total}} \times 100$$

#### *5.2.5.3.2. Liberação de proteína de micropartículas coacervadas contendo micropartículas lipídicas (CMPL-PTN)*

Para avaliação da liberação de proteína das CMPLs foi produzido um lote de micropartículas lipídicas contendo 6,4% de proteína (base seca). Essas micropartículas foram usadas para produção de três lotes independentes de micropartículas coacervadas segundo o fluxograma da Figura 26.

Quantidades de 0,35g dos coacervados produzidos foram pesados em tubos com tampa e adicionados de 20 mL de água, mantidos em agitador rotativo à velocidade lenta e sendo retirados nos tempos estudados. O conteúdo dos tubos foi filtrado e a amostra retida mais o papel de filtro, foram colocados em tubos de kjedhal para determinação da proteína residual. As liberações foram feitas em triplicata (3 tubos) para cada processamento e para cada tempo. A quantidade de proteína liberada foi calculada com descrito em 5.2.5.2.1.

### 5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.3.1. *Produção de micropartículas coacervadas - Testes preliminares com caracterização (diâmetro médio, distribuição de tamanho e morfologia)*

##### 5.3.1.1. *pH de coacervação*

Na determinação do pH de coacervação foi observado que, para os sistemas com correção do pH para 3,5 e 3,0, não houve formação de precipitado, indicando a não ocorrência da coacervação. Para os sistemas com correção do pH para 4,5 e 4,0 ocorreu a formação de precipitado, sendo observado na microscopia a presença de partículas esféricas, multinucleadas e com parede definida. No sistema de pH 4,5 o sobrenadante mostrou-se ligeiramente turvo, indicando a presença de polímeros em solução. O sistema com pH corrigido para 4,0 se apresentou límpido, indicativo de uma maior interação entre os polímeros e, conseqüentemente, maior formação de coacervado, sendo então o pH escolhido para os testes. O pH de coacervação do sistema gelatina-goma arábica pode variar na faixa de 3,0 até 5,0 dependendo da origem dos polímeros [Thies, 1995; Ijichi et al., 1997; Menger & Sykes, 1998; Burgess & Ponsart, 1998; Lamprecht et al., 2000; Lamprecht et al., 2001],

##### 5.3.1.2. *Preparo da emulsão gelatina/recheio*

Quanto ao preparo da emulsão gelatina-recheio foi observado que, para os sistemas de agitação mais rápida, como o turrax e o liquidificador, as emulsões produzidas foram mais estáveis enquanto que, com agitação magnética, a separação de fases ocorreu rapidamente. A agitação no liquidificador produziu grande quantidade de espuma, interferindo na produção dos coacervados. O Ultraturrax produziu pouca espuma, exigindo menos tempo de processo para obtenção de uma emulsão estável.

**Lamprecht et al. [2001]** avaliou o rendimento de encapsulação em função da velocidade de homogeneização da emulsão gelatina-recheio utilizando um agitador magnético, um agitador de pás (1000 – 1500 rpm) e um ultraturrax (8000 rpm) obtendo melhores resultados quando usou o ultraturrax (~ 80% de rendimento de encapsulação, quando comparado a 5% para agitação magnética e 32% para agitação por pás).

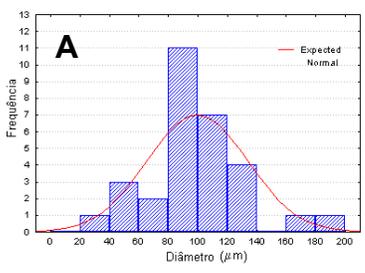
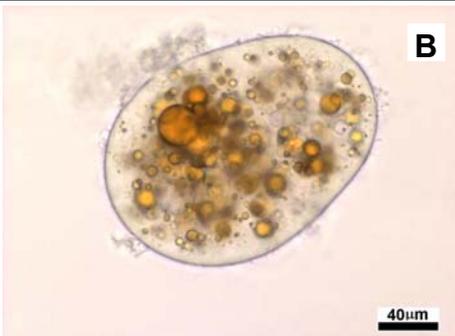
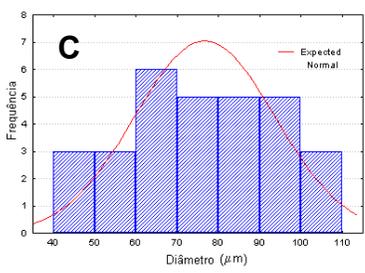
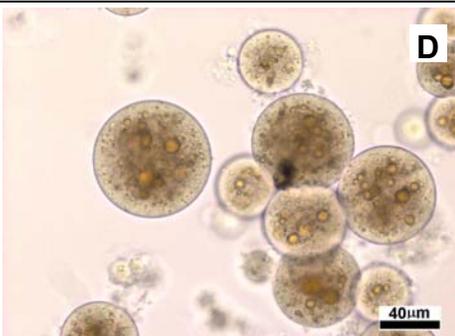
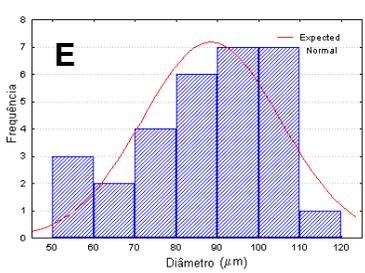
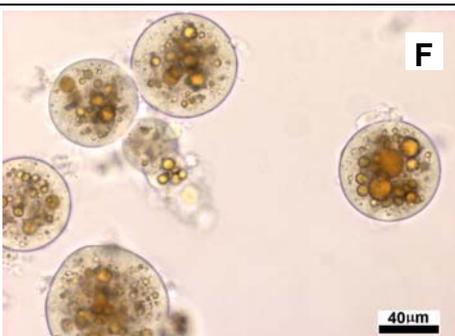
A escolha das condições para emulsificação da gelatina com o recheio definiu as condições operacionais de produção das micropartículas coacervadas que são apresentadas na Tabela 24.

**Tabela 24:** Condições usadas na produção de micropartículas coacervadas.

Emulsificação recheio-gelatina	Ultraturrax
Agitação durante o processo	Agitador magnético
Temperatura durante o processo	50 ± 3° C (mantida até o acerto do pH)
pH de coacervação	4,00 ± 0,02
Resfriamento	Até 10° C – Taxa: 0,33°C/minuto
Decantação das partículas	Geladeira (5°C) 18 horas

A Tabela 25 apresenta os resultados de diâmetro médio, distribuição de tamanho das micropartículas e morfologia para as amostras produzidas com emulsões obtidas por diferentes formas de homogeneização.

**Tabela 25:** Diâmetro médio, distribuição de tamanho das micropartículas e morfologia para as amostras produzidas com diferentes homogeneizações da emulsão recheio/gelatina.

Emulsão	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) e Distribuição de tamanho	Morfologia***
Agitação magnética	<p><math>164 \pm 50^a</math></p> 	
Liquidificador	<p><math>77 \pm 17^c</math></p> 	
Turrax**	<p><math>100 \pm 34^b</math></p> 	

\* Sistemas: Materiais de parede: soluções 2,5% (p/p); recheio (oleoresina/óleo de soja 1:7): 25% do total de material de parede. \*\* Velocidade: 14000rpm/2min. \*\*\*Morfologia: réguas de 40  $\mu\text{m}$ . As letras minúsculas sobrescritas indicam a análise estatística (letras diferentes = diferença estatística para  $p < 0,05$ ).

As micropartículas produzidas a partir de emulsões agitadas pelo liquidificador e pelo ultraturrax apresentaram um recheio composto por gotículas menores do que aquelas nas quais a emulsão foi preparada por agitação

magnética. A diferença do tamanho das micropartículas também fica evidente para as captações feitas num mesmo aumento (Tabela 25 - Figuras B, D e F).

As partículas com diâmetros médios maiores foram produzidas a partir da emulsão preparada por agitação magnética. O aumento da velocidade no preparo das emulsões, com a mudança para liquidificador e ultraturrax, produziu partículas menores.

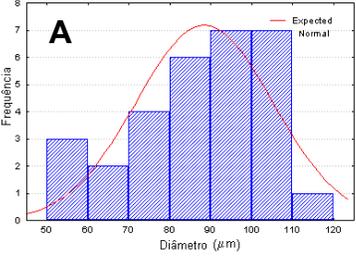
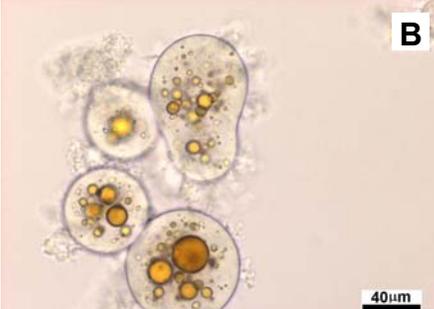
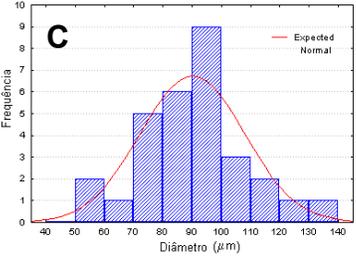
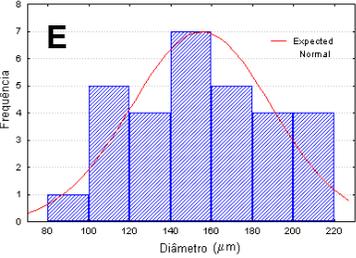
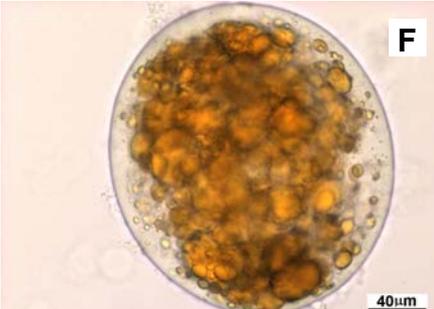
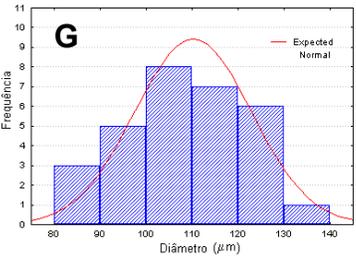
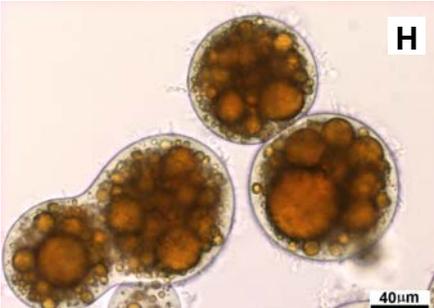
Quanto às distribuições de tamanho, no caso das micropartículas obtidas com diferentes velocidades no preparo da emulsão, todos os sistemas apresentaram distribuições próximas à normal (Tabela 25 – Figuras A, C e E).

Após a definição das condições operacionais para produção dos coacervados foram feitos alguns testes quanto à quantidade de recheio e polímeros utilizados. Os sistemas foram produzidos segundo o fluxograma da Figura 30. A emulsificação recheio/gelatina foi feita no Turrax (14000rpm/2min). As quantidades de recheio e polímeros testadas foram citadas na Tabela 17.

### **5.3.1.3. Quantidade de recheio**

Os resultados de diâmetro médio, distribuição de tamanho das micropartículas e morfologia para as amostras produzidas com aumento crescente de recheio são apresentados na Tabela 26.

**Tabela 26:** Diâmetro médio, distribuição de tamanho das micropartículas e morfologia para as amostras produzidas com aumento crescente de recheio

% Recheio *	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) e Distribuição de tamanho	Morfologia**
15%	<p style="text-align: center;"><math>88 \pm 17^c</math></p> 	
25%	<p style="text-align: center;"><math>90 \pm 18^c</math></p> 	
50%	<p style="text-align: center;"><math>155 \pm 34^a</math></p> 	
100%	<p style="text-align: center;"><math>110 \pm 13^b</math></p> 	

\* Sistemas: Materiais de parede: soluções 2,5% (p/p); porcentagem de recheio (oleoresina/óleo de soja 1:7) em relação ao total de material de parede. \*\*Morfologia: régua de 40  $\mu\text{m}$ . As letras minúsculas sobrescritas indicam a análise estatística (letras diferentes = diferença estatística para  $p < 0,05$ ).

Para todas as concentrações de recheio adicionadas ocorreu a precipitação característica da coacervação e apenas o sistema com 100% de adição de recheio (em relação ao total de polímero) formou um halo vermelho na superfície do sobrenadante, indicando a presença de recheio não encapsulado. Com a adição crescente de recheio foi possível observar a nítida mudança na distribuição do mesmo dentro das partículas (Tabela 26 – Figuras B, D, F e H).

**Lamprecht et al. [2001]** observaram em seus estudos que o aumento da adição de recheio também aumentou o volume do mesmo nas micropartículas até uma determinada quantidade a partir da qual foi possível observar recheio não encapsulado.

Os diâmetros médios das micropartículas produzidas com menores quantidades de recheio (15 e 25%) foram menores que para as micropartículas produzidas com maiores quantidades (50 e 100% - Tabela 26). Os sistemas com menor quantidade de recheio tiveram curvas mais características de distribuição normal, comparados com os tratamentos de 50 e 100% (Tabela 26 - Figuras A, C, E e G).

**Thies [1995]** definiu dois comportamentos básicos para micropartículas coacervadas em função da densidade, onde partículas mais densas que a água precipitam, e as menos densas flutuam. Esse comportamento está relacionado com a estrutura da micropartícula formada e com distribuição do recheio. Em geral partículas onde a quantidade de recheio hidrofóbico em relação à parede é maior tendem a flutuar, pois nesse tipo de sistema a cápsula torna-se menos densa que a água. Para as partículas onde a quantidade de recheio é igual ou menor que a de parede, a densidade da partícula aumenta e esta pode decantar. **Lamprecht et al. [2001]** observaram a flutuação de partículas coacervadas para sistemas com grande quantidade de recheio.

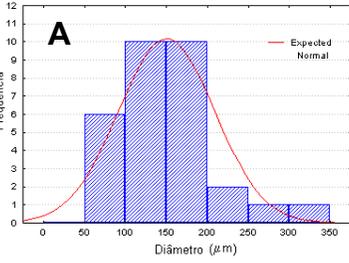
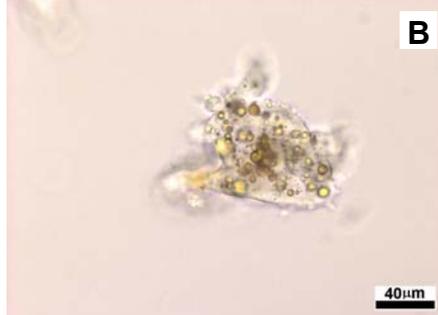
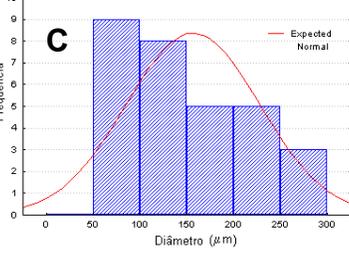
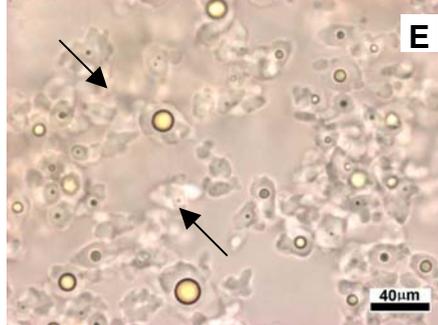
#### 5.3.1.4. Quantidade total de polímeros de parede

A Tabela 27 apresenta o diâmetro médio, distribuição de tamanho das micropartículas e morfologia para as amostras produzidas com aumento crescente de polímeros.

Para quantidades de polímeros de 2,5, 5% e 7,5% (p/p) ocorreu precipitação característica com formação de micropartículas multinucleadas com formas irregulares para os sistemas 5,0 e 7,5% (Tabela 27 - Figuras B e D). Para o sistema contendo 11% de polímeros de parede (p/p) não ocorreu precipitação com a gelificação do mesmo (Tabela 27 – Figura E). A adição crescente de polímeros provocou uma deformação nas partículas, que perderam a esfericidade característica. Segundo **Schmitt et. al. [1999]** um excesso de polímero pode levar a uma quantidade de cargas excedentes, prejudicando a formação do complexo. Além disso o aumento da viscosidade do meio pelo aumento da quantidade de polímeros em solução também pode interferir na formação das micropartículas **[Thies, 1995]**. Para os sistemas 7,5 e 11% pode-se observar polímeros coacervados sem recheio indicados pelas setas pretas.

Para o aumento da quantidade de polímero o tratamento de menor proporção, 2,5% (Tabela 27 – Figura C), mostrou uma distribuição normal característica quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 27 – Figuras A e C).

**Tabela 27:** Diâmetro médio, distribuição de tamanho das micropartículas e morfologia para as amostras produzidas com aumento crescente de polímeros

% Polímeros *	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) e Distribuição de tamanho	Morfologia**
2,5%	Tabela 26 Figura C $150 \pm 59^a$	Tabela 26 Figura D
5,0%		
7,5%		
11,0%	Não determinado	

\* Sistemas: concentração crescente de polímeros nas soluções de gelatina e goma arábica (volumes utilizados - 1:1) ; recheio (oleoresina/óleo de soja 1:7): 25% do total de material de parede. \*\*Morfologia: régua de 40  $\mu\text{m}$ . As letras pequenas sobrescritas indicam a análise estatística (letras diferentes = diferença estatística para  $p < 0,05$ ). Setas pretas indicam coacervados sem recheio.

A faixa de tamanho das micropartículas obtidas nos testes preliminares com diversas variações nas condições de produção foi de 77 a 164  $\mu\text{m}$  sendo considerado um tamanho adequado para alimentação de larvas nos primeiros

estágios de desenvolvimento. Diversos trabalhos apresentaram dietas inertes com tamanho variando entre 50 a 600  $\mu\text{m}$  como substitutas para alimentos vivos mais usados como rotíferos (*Brachionus plicatilis*) e *Artemia spp* que apresentam tamanhos de 125–300  $\mu\text{m}$  e 428–517  $\mu\text{m}$ , respectivamente. [Yúfera et al., 1999; Cahu & Zambonino Infante, 2001; Genodepa, Southgate & Zeng, 2004; Carvalho et al., 2004; Kvale et al., 2005].

Os diâmetros médios reportados para micropartículas obtidas por coacervação variam entre 10 a 800  $\mu\text{m}$ , em diversos trabalhos que tem associado essa variação como uma função da proporção entre os polímeros de parede, o total de polímeros utilizados, quantidade de recheio, tamanho das gotas da emulsão recheio/solução, velocidade de agitação do sistema, taxa de resfriamento, tipo, forma de reticulação e secagem, dentre outras [Lamprecht et al., 2001; Menger et al., 2000; Bachtsi & Kiparissides, 1996; Nakagawa et al., 2004].

A produção dos coacervados, segundo o fluxograma da Figura 31, gerou em média 20g de micropartículas úmidas com teor de sólidos de 20% em média perfazendo um rendimento de processo de 80% aproximadamente. Lamprecht et al. [2001] citam rendimentos na faixa de 79,5 a 84,2% de rendimento para coacervados submetidos a enrijecimento da parede por diversos processos.

### **5.3.2. Produção de micropartículas coacervadas – Planejamento experimental**

Baseados nos dados obtidos nos testes preliminares, o planejamento experimental foi elaborado com as variáveis apresentadas na Tabela 18 e os resultados dos ensaios realizados são apresentados na Tabela 28.

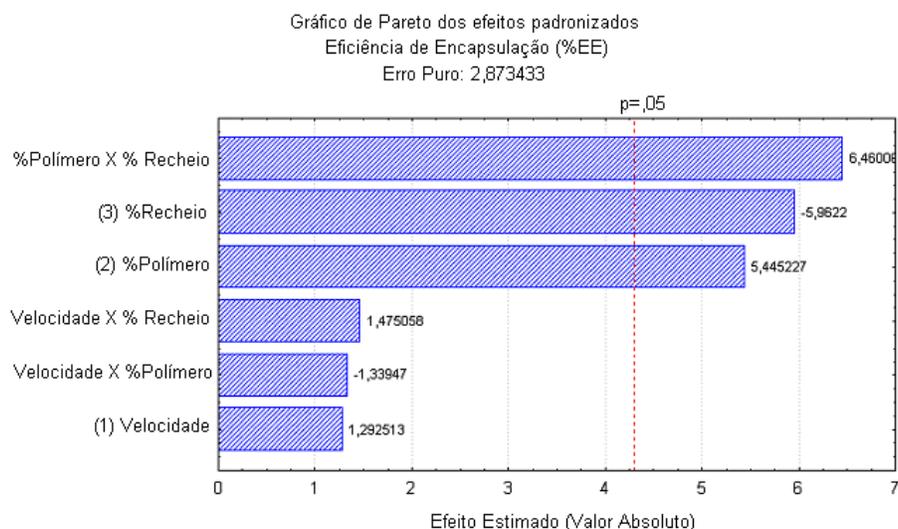
**Tabela 28:** Planejamento experimental (variáveis numéricas e codificadas) e resposta para avaliação da produção de micropartículas por coacervação.

Ensaio	Variáveis*			Resposta EE% <sup>4</sup>
	Velocidade <sup>1</sup>	[polímeros] <sup>2</sup>	[recheio] <sup>3</sup>	
1	6000 (-1)	2,5 (-1)	50 (-1)	87,54
2	6000 (-1)	2,5 (-1)	150 (+1)	73,22
3	6000 (-1)	7,5 (+1)	50 (-1)	90,29
4	6000 (-1)	7,5 (+1)	150 (+1)	86,76
5	14000 (+1)	2,5 (-1)	50 (-1)	91,29
6	14000 (+1)	2,5 (-1)	150 (+1)	75,79
7	14000 (+1)	7,5 (+1)	50 (-1)	86,10
8	14000 (+1)	7,5 (+1)	150 (+1)	90,83
9	10000 (0)	5,0 (0)	100 (0)	93,68
10	10000 (0)	5,0 (0)	100 (0)	94,70
11	10000 (0)	5,0 (0)	100 (0)	91,39

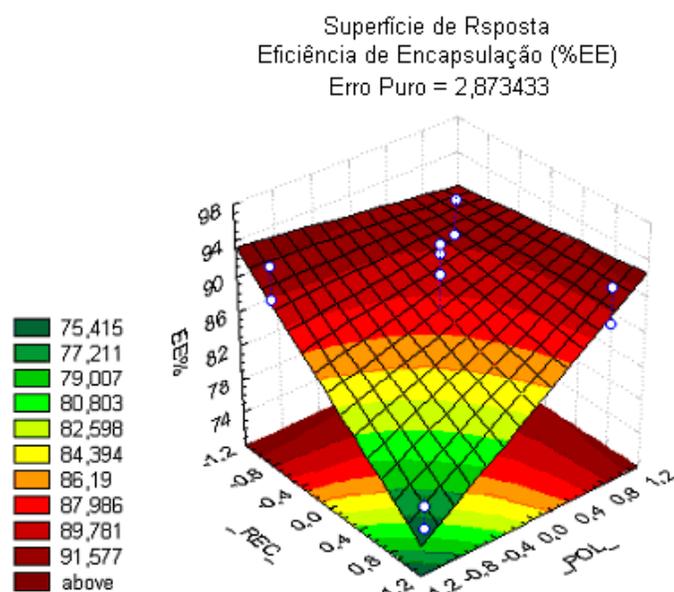
\* Números em parênteses representam as variáveis codificadas do planejamento.

**1** – UltraTurrax (rpm/2minutos); **2** – Proporção volumétrica de mistura de gelatina e goma arábica de 1:1; **3** – Porcentagem em relação a massa de polímeros de parede de cada sistema; **4** – Eficiência de encapsulação:  $Cf/Ci \times 100$ , onde Cf = recheio determinado por Bligh & Dyer nas micropartículas coacervadas, Ci = massa de recheio usada para formação da emulsão inicial com a gelatina.

A avaliação do planejamento indicou um efeito significativo da concentração de polímeros de parede, da concentração de recheio e da interação entre essas duas variáveis sobre a eficiência de encapsulação (EE%) das micropartículas produzidas por coacervação, como mostra o gráfico de Pareto da Figura 36. A velocidade de agitação na formação da emulsão não apresentou efeito significativo.



**Figura 30:** Gráfico de Pareto com valor estimado dos efeitos principais e interações de segunda ordem para as variáveis estudadas ao nível de 95% de confiança ( $p=0,05$ ).



**Figura 31:** Superfície de Resposta para Eficiência de encapsulação (%EE) de micropartículas produzidas por coacervação em função da quantidade de recheio adicionado (% em relação ao total de material de parede do sistema em base seca) e quantidade total de polímeros de parede utilizados (%).

A superfície de resposta (Figura 31) permitiu compreender a influência das variáveis que tiveram efeito significativo na eficiência de encapsulação da coacervação, nos níveis estudados. Foi observada uma relação inversamente proporcional entre concentração de polímeros de parede e quantidade de recheio adicionada, com aumento da eficiência de encapsulação para relações de alta concentração de polímeros e baixa quantidade de recheio e decréscimo de EE% para relações de baixa concentração de polímeros e alta quantidade de recheio. Isso pode ser relacionado com a disponibilidade de polímeros para recobrir as gotículas de recheio.

**Remunan-Lopez & Bodmeier [1996]** em estudos de coacervação entre gelatina e quitosana, também concluíram que a quantidade total de polímeros é decisiva para formação das micropartículas coacervadas, interferindo assim, nos rendimentos do processo.

Com as indicações do planejamento experimental, associadas aos aspectos morfológicos observados para as micropartículas produzidas nos testes preliminares, fixou-se a concentração das soluções de polímeros de parede em 2,5% p/p e a quantidade de recheio adicionado em 100% do total de material de parede utilizado, seguindo as condições para processamento descritas na Tabela 24.

### **5.3.3. Obtenção de micropartículas coacervadas contendo compostos hidrofóbicos (recheio: oleoresina de páprica e óleo de soja)**

#### **5.3.3.1. Produção de micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja.**

As micropartículas coacervadas produzidas para o estudo de liberação de oleoresina seguiram o fluxograma da Figura 26 com algumas modificações nas proporções do recheio incluído. Testou-se inicialmente a produção das

micropartículas usando-se oleoresina pura que apresentou viscosidade maior que da mistura de óleo de soja e oleoresina (7:1). A mudança não foi positiva, pois muita oleoresina foi perdida na haste do homogeneizador, no Becker utilizado para homogeneização e, após a conclusão da coacervação, seguida de resfriamento, constatou-se a presença de recheio não encapsulado na superfície da água.

O óleo de soja foi novamente introduzido para diminuir a viscosidade do recheio melhorando sua encapsulação. Testes feitos com misturas 1:9 e 1:1 (óleo de soja:oleoresina) mostraram que a mistura 1:1 obteve um melhor desempenho durante a produção sendo escolhida para ser incorporada nos coacervados produzidos para o estudo de liberação.

Para quantificação da quantidade de oleoresina encapsulada foi feita uma limpeza meticulosa com etanol absoluto do *becker* onde se pesou o recheio, da haste do turrax e do *Becker* onde foram produzidas as partículas. Os resíduos removidos foram transferidos para balão volumétrico e completou-se o volume com etanol, mantendo o balão em repouso no escuro por 48h para transferência completa da oleoresina para o solvente. Uma parte desse material foi filtrada a baixo vácuo e a quantidade de oleoresina foi determinada. A massa de oleoresina quantificada nessa perda foi descontada do total pesado e considerada a oleoresina efetivamente encapsulada.

### **5.3.3.2. Reticulação com glutaraldeído e com transglutaminase.**

As micropartículas reticuladas apresentaram diferenças macroscópicas em relação às micropartículas sem reticulação. Durante o peneiramento para separação das partículas da água foi observado que o sistema reticulado com 1,0mM de glutaraldeído apresentou uma água de cor ligeiramente laranja, o que não ocorreu para os outros dois sistemas reticulados (transglutaminase e glutaraldeído 0,1mM). Essa cor da água foi devido à passagem de partículas finas pela peneira. Como as partículas reticuladas com transglutaminase e glutaraldeído

0,1 e 1,0mM vieram de um mesmo processamento, supôs-se, por essa observação macroscópica, que a reticulação com maior concentração de glutaraldeído influenciou no tamanho das partículas coacervadas.

Outra diferença entre as partículas reticuladas em relação ao material sem reticulação foi quanto a adesividade nas paredes dos tubos utilizados na liberação durante a pesagem. O material sem reticulação escoou facilmente pelo vidro, enquanto que os materiais reticulados mostraram-se mais aderentes.

### **5.3.3.3. Secagem de micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja**

A secagem de micropartículas com alto teor de água obtidas em processos como coacervação, geleificação iônica, dentre outros, permite uma extensão da vida útil das mesmas além de ampliar as possibilidades de aplicações dessas partículas **[Burgess & Ponsart, 1998; Mukai-Corrêa, 2003]**.

A água presente em grandes quantidades contribui, em parte, na sustentação da estrutura das partículas e a retirada dessa água pode ocasionar ruptura da parede e, conseqüente, desestruturação da partícula **[Mukai-Corrêa et al., 2005]**.

**Mukai-Corrêa [2003]** observou a perda da forma esférica e ruptura de micropartículas obtidas por geleificação iônica (teor de água superior a 90%) e secas em estufa com circulação de ar.

A estrutura das micropartículas coacervadas pode ser reforçada com o uso de agentes reticulantes. **Lamprecht et al., [2000]** usaram diversas substâncias para aumentar a resistência da parede de micropartículas obtidas por coacervação, como ácido dehidroascórbico, glutaraldeído e etanol. **Burgess & Ponsart [1998]** estudaram a secagem de micropartículas coacervadas por *spray*

*dryer* e o glutaraldeído foi usado em um dos tratamentos para auxiliar na secagem das mesmas.

Três processos foram utilizados (estufa com circulação de ar, liofilização e *spray drying*) para desidratação de micropartículas coacervadas, produzidas segundo o procedimento da Figura 26.

As condições de reticulação das micropartículas e os testes de secagem são apresentados nas Tabelas 29 e 30. As condições de processamento para cada tipo de secagem foram descritas na Tabela 19.

**Tabela 29:** Condições de reticulação (glutaraldeído) e respectivos testes de secagem para micropartículas coacervadas contendo oleoresina/óleo de soja.

Concentração	Glutaraldeído			
	0,1mM/g de ptn	0,25mM/g de ptn		1,0mM/g de ptn
Tempo de reação	18 horas	3 horas	18 horas	3 horas 18 horas
Secagem	Liofilização <i>Spray dryer</i>	Estufa <i>Spray dryer</i>		Estufa Liofilização <i>Spray dryer</i>

**Tabela 30:** Condições de reticulação (transglutaminase) e respectivos testes de secagem para micropartículas coacervadas contendo oleoresina/óleo de soja.

Concentração	Tranlglutaminase
	10U/g de proteína
Tempo de reação	18 horas
Secagem	Liofilização <i>Spray dryer</i>

Além das micropartículas reticuladas, as micropartículas úmidas sem reticulação foram submetidas à secagem por estufa com circulação de ar, liofilização e *spray dryer*.

#### *5.3.3.3.1. Secagem de micropartículas coacervadas em estufa com circulação de ar*

Na secagem em estufa com circulação de ar, as micropartículas úmidas sem reticulação se apresentaram coladas umas às outras, formando um filme contínuo, duro e quebradiço quando destacado dos suportes.

As micropartículas reticuladas com glutaraldeído, na condição mais branda (0,25mM/3horas), também se apresentaram, ao final da secagem, como um filme contínuo semelhante ao das micropartículas sem reticulação.

Com o aumento das condições de reação na reticulação (aumento da concentração de glutaraldeído X aumento do tempo de reação) as amostras deixaram de formar um filme contínuo e passaram a se apresentar como pequenos pedaços de aglomerados de micropartículas.

#### *5.3.3.3.2. Secagem de micropartículas coacervadas por liofilização*

O processo de liofilização foi eficiente na obtenção das micropartículas secas para todos os tratamentos.

Ao final da secagem todas as amostras apresentaram aspecto característico de materiais liofilizados. Foi necessário um peneiramento das amostras para separar as micropartículas.

As micropartículas sem reticulação, reticuladas com transglutaminase e reticuladas com glutaraldeído nas menores concentrações (0,1 e 0,25mM/g de proteína) foram facilmente separadas em peneira. As amostras reticuladas com glutaraldeído na maior concentração (1,0mM/g de proteína) apresentaram certa resistência à separação, indicando a possível formação de ligações entre as paredes das partículas, formando aglomerados.

#### 5.3.3.3.3. Secagem de micropartículas coacervadas em *spray dryer*

A técnica de secagem por *spray dryer*, devido ao seu menor custo comparado à secagem por liofilização, foi utilizada prospectivamente e ainda preliminarmente, processando-se as amostras em um aparelho de bancada que não permite *scale up* para secadores industriais e apresenta baixos rendimentos de produto final, para avaliar se a reticulação permitiria a manutenção da integridade da parede das partículas durante a remoção da água na secagem.

Diversos experimentos preliminares (anexo 3) foram realizados para determinação das condições de secagem das micropartículas coacervadas. Com relação ao emprego da transglutaminase, foram testadas variáveis como: qual a melhor etapa para adição da enzima, concentração e tempo de atividade enzimática. O anexo 3 permite, ainda que preliminarmente, observar os experimentos potenciais para estudos futuros. A substituição dos reticulantes químicos basicamente utilizados industrialmente é desejável devido à toxicidade residual e a proibição para usos alimentícios [Strauss & Gibson, 2004; Soeda et al., 1997; Soper & Thomas, 1998].

A secagem das micropartículas coacervadas sem reticulação no *spray dryer* destruiu as partículas formando um pó laranja. A reticulação com glutaraldeído e transglutaminase possibilitou a manutenção da integridade das partículas durante a secagem produzindo um pó de cor próxima ao vermelho e de granulometria visivelmente diferente do obtido a partir da secagem das micropartículas sem reticulação.

O aumento das condições de reticulação implicou em aumento na manutenção da integridade das micropartículas secas no *spray dryer*, sendo que a reticulação com glutaraldeído na concentração de 1,0mM foi mais eficiente na manutenção da integridade das partículas coacervadas durante a secagem do que as reticulações com concentrações de glutaraldeído de 0,25 e 0,1mM/g.ptn e transglutaminase (10U/g de proteína, 18 horas). Essa maior eficiência pode estar associada à estequiometria entre os agentes ligantes e o substrato a ser ligado. A

funcionalidade quanto à resistência mecânica de filmes de gelatina intercrossados com transglutaminase [Taylor et al., 2005] mostraram diferença em relação a estequiometria utilizada. O aumento da quantidade de reticulante (glutaraldeído) aumentou o grau de organização da matriz filmogênica, aumentando sua resistência mecânica, porém a partir de certa quantidade o excesso de ligações cruzadas foi prejudicial à organização da matriz.

Todos os processamentos tiveram baixíssimo rendimento e para obtenção de uma quantidade suficiente de amostra para os testes de liberação e microscopias foram necessários 3 processamentos para cada tipo de reticulação. Lamprecht et al. [2001] também relatam baixos rendimentos (32%) na obtenção de coacervados desidratados por *spray dryer*. Os processamentos realizados nesse trabalho não tiveram os valores de rendimento determinados, mas ficaram seguramente abaixo dos citados por Lamprecht et al. [2001].

Quanto às condições operacionais, inicialmente a atomização foi feita com um bico de 0,7mm e a decantação das partículas no duto de alimentação causou entupimento. O uso de um bico de 2 mm de diâmetro permitiu uma atomização eficiente das amostras. O entupimento por separação de fase na secagem de partículas coacervadas por *spray drying* foi relatado por Burgess & Ponsart [1998] em seus estudos.

Todos os tratamentos formaram uma película nas paredes e fundo da câmara de secagem, composta pelas partículas que se aderiram ao vidro antes de estarem completamente secas. Para as amostras reticuladas com glutaraldeído nas concentrações de 1,0 e 0,25 mM/g de proteína, além desse filme, foi possível observar material íntegro no fundo da câmara.

### 5.3.4. Obtenção de micropartículas coacervadas contendo compostos hidrofílicos (recheio: matrizes lipídicas carreando glicose ou isolado protéico de soro de leite)

#### 5.3.4.1. Produção de micropartículas lipídicas (MPLs) – Ensaio Preliminares

##### 5.3.4.1.1. Determinação da proporção de compostos hidrofóbicos constituintes da matriz

A composição entre ácido esteárico (ponto de fusão 70° C [Bertan, 2003]) e gordura vegetal hidrogenada (ponto de fusão em torno de 35° C) permitiu a obtenção de misturas com durezas e pontos de fusão variados, apresentados na Tabela 31 para três proporções de misturas desses lipídios.

**Tabela 31:** Pontos de fusão das misturas de ácido esteárico (AE) e gordura vegetal hidrogenada (GVH).

AE:GVH (%)	Temperatura (°C)					
	35	40	45	50	55	60
25:75	S	S	P	P	L	L
50:50	S	S	S	S	P	L
75:25	S	S	S	S	S	P

S – estado sólido; P – pastoso; L – líquido.

A mistura contendo maior quantidade em ácido esteárico se manteve sólida até temperatura superior a 55°C, apresentando aspecto bem rígido característico do ácido graxo. O aumento da quantidade de gordura vegetal hidrogenada, abaixou o ponto de fusão e deu maior maciez à mistura de lipídios. Na proporção de maior quantidade de gordura vegetal hidrogenada, o ponto de fusão permaneceu muito próximo à faixa de temperatura de produção dos coacervados (45-50°C). Baseado nessa observação a composição de 1:1 (AE:GVH) foi definida para a produção das MPLs por apresentar ponto de fusão (55° C – Tabela 31) superior ao usado na coacervação.

**Langdon & Buchal [1998 a e b]** relatam estudos em que o perfil da mistura lipídica utilizada na produção de micropartículas de gordura influenciam na eficiência de encapsulação e no perfil de liberação de compostos hidrossolúveis como vitaminas e peptídeos. Além disso, a dureza das partículas de gordura interferiu na ação digestiva e absorção dos nutrientes encapsulados por organismos aquáticos, indicando que partículas menos rígidas, ou seja, com menores pontos de fusão, são mais adequadas para alimentação das larvas.

#### *5.3.4.1.2. Determinação das proporções entre mistura lipídica e soluções de recheios*

Para a etapa inicial da produção de micropartículas lipídicas foi necessária a formação de uma emulsão do tipo água em óleo. As quantidades dos lipídios e dos recheios possíveis de serem misturadas para formar esse tipo de emulsão dependem das características de cada componente, chegando a um limite onde a emulsão pode inverter e passar a ser do tipo óleo em água, perdendo suas características de retenção dos compostos hidrofílicos **[Magee & Olson, 1998a]**.

Foi testada a formação de emulsões entre massas de mistura lipídica (ácido esteárico/gordura vegetal hidrogenada 1:1, 65°C) e solução de recheio (glicose 50% p/p, 65°C) na faixa de 50:50 até 90:10. As características desejadas para as emulsões formadas foram: 1 – maior quantidade possível de solução de recheio; 2 – boa fluidez para permitir o escoamento e a atomização.

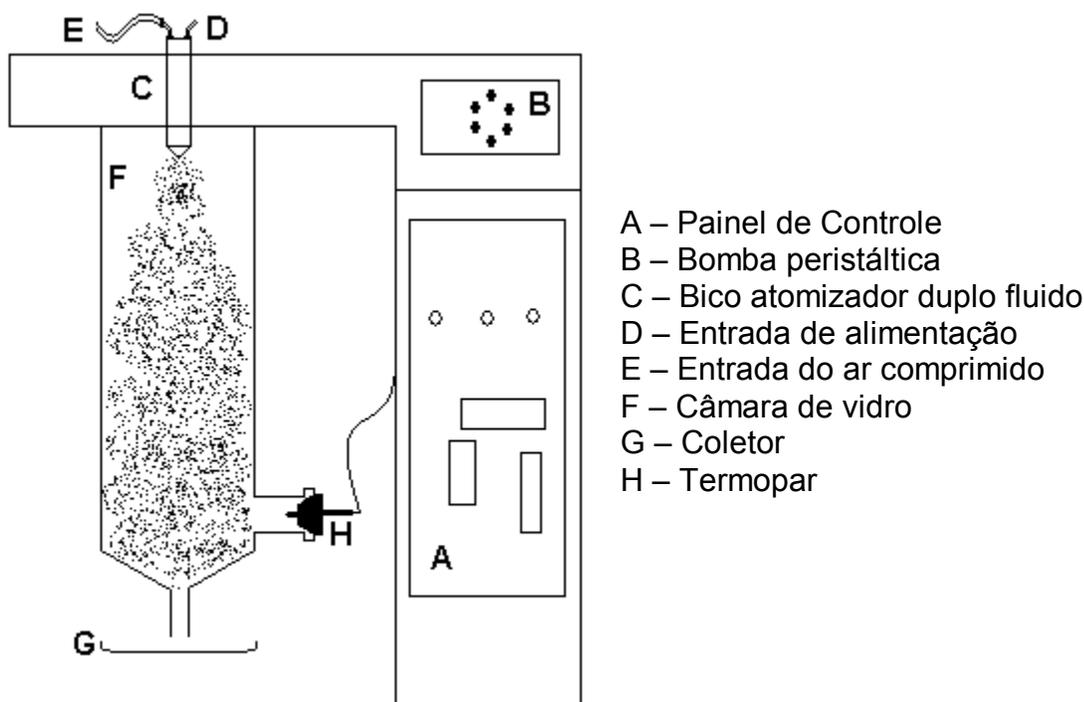
Proporções de 50:50 e 60:40 para solução de recheio (50% p/p) produziram emulsões com texturas pastosas, não apresentando escoamento adequado. No caso das outras combinações, as emulsões apresentaram fluidez suficiente para permitir a atomização sendo usadas no planejamento experimental (70:30; 80:20 e 90:10).

#### 5.3.4.1.3. Adição de tensoativos

Nos testes preliminares de formação das emulsões foi possível observar uma rápida separação de fases entre as soluções de glicose e a mistura lipídica. Essa separação de fases é indesejável, pois impede a obtenção de micropartículas com concentração uniforme de recheio e interfere na eficiência de encapsulação e perfis de liberação/retenção do mesmo **[Onal & Langdon, 2004]**. O uso de tensoativos é citado como fundamental na obtenção de boa eficiência de encapsulação e aumento da retenção de glicose e proteínas **[Magee & Olson, 1998a; Nokhodchi et al., 2002; Langdon e Buchal, 2004 a e b]**. Baseando-se nos resultados de **Magee & Olson [1998 a e b]** foram usadas duas blendas compostas de monoestearato e triestearato de sorbitana (Dhaytan S60 e Dhaytan T80 respectivamente – blenda 1) e monoestearato e trioleato de sorbitana (Dhaytan S60 e Dhaytan TS80 respectivamente – blenda 2). Com o uso das blendas, as emulsões permaneceram estáveis durante o tempo de processamento.

#### 5.3.4.1.4. Condições de processamento

As MPLs foram produzidas pela atomização das emulsões de misturas lipídicas e soluções de recheio em um *spray dryer* de bancada. Testes preliminares foram feitos para definir condições de produção das MPLs. O equipamento utilizado é apresentado esquematicamente na Figura 32.



**Figura 32:** Esquema de adaptação do *Spray dryer* Buchi para produção de micropartículas lipídicas.

A alimentação do atomizador foi feita pela deposição manual da emulsão diretamente na entrada do mesmo (Figura 32 – D)., A utilização do sistema convencional do equipamento com a bomba peristáltica para alimentação (Figura 32 – B), ficou inviabilizada devido à queda de temperatura no transporte da emulsão ao longo da mangueira, com conseqüente endurecimento e entupimento. Cada processamento foi limitado a 30g de emulsão, evitando assim o endurecimento pela queda de temperatura, a desestabilização da emulsão e exposição ao calor por período prolongado (atomizador sob aquecimento de 90°C).

O ponto de fusão da mistura lipídica permitiu sua pulverização em temperatura ambiente, na câmara de secagem, que foi adaptada para esse fim. A passagem entre a câmara de secagem e o ciclone (Figura 32 – H) foi fechada e a parte inferior (Figura 32 – G) foi mantida aberta para evitar que a temperatura do ar se elevasse. Com essas modificações a temperatura no interior da câmara

atingiu no máximo 30°C monitorada pelo próprio termopar do equipamento (Figura 32 – H). Após a pulverização, a câmara foi removida do equipamento e deixada em temperatura de 22° C para resfriamento. As partículas foram removidas da superfície de vidro com o auxílio de um pincel e foram estocadas em freezer (-18°C) para análises posteriores.

Diversas formas de obtenção de micropartículas lipídicas vêm sendo estudadas, incluindo sistemas de pulverização utilizados na obtenção dessas estruturas contendo diversos tipos de compostos [Langdon & Buchal, 1998a e b; Ribeiro dos Santos et al., 2002; Jennings et al., 2000; Onal & Langdon, 2004 a e b; Magee & Olson, 1981 a e b; Barbosa et al., 2004].

#### **5.3.4.2. Produção de micropartículas lipídicas (MPLs) – Planejamentos experimentais**

##### **5.3.4.2.1. Eficiência de Encapsulação (%EE)**

A produção de micropartículas lipídicas contendo glicose (MPL-GLI) ou proteína (MPL-PTN) em solução foi realizada com sucesso para todos os ensaios do planejamento. As amostras produzidas foram avaliadas quanto à liberação do recheio em 30 minutos para a glicose e quanto à eficiência de encapsulação (%EE) tanto para glicose quanto para proteína. As variáveis numéricas e codificadas, bem como as respostas obtidas para os ensaios, são apresentadas nas Tabelas 32 e 33.

**Tabela 32:** Planejamento experimental (variáveis numéricas e codificadas) e respostas para avaliação da produção de micropartículas lipídicas contendo glicose.

Ensaio	Variáveis*			Respostas	
	[GLI] (%p/p)	LIP/GLI (p/p)	Tensoativo**	%EE	LIB30' (%)
1	10 (-1)	70/30 (-1)	B1 (+1)	116,13	39,71
2	10 (-1)	70/30 (-1)	B2 (-1)	114,87	32,13
3	10 (-1)	90/10 (+1)	B1 (+1)	80,00	19,86
4	10 (-1)	90/10 (+1)	B2 (-1)	80,00	25,66
5	80 (+1)	70/30 (-1)	B1 (+1)	97,09	64,76
6	80 (+1)	70/30 (-1)	B2 (-1)	103,33	88,65
7	80 (+1)	90/10 (+1)	B1 (+1)	67,87	8,69
8	80 (+1)	90/10 (+1)	B2 (-1)	54,00	12,89
9	45 (0)	80/20 (0)	B3 (0)	77,32	37,40
10	45 (0)	80/20 (0)	B3 (0)	78,93	22,63
11	45 (0)	80/20 (0)	B3 (0)	82,35	16,82

\* Os números entre parênteses representam as variáveis codificadas. \*\*Tensoativos utilizados: Blenda1 (+1): Dhaytan T80 (trioleato de sorbitana)/Dhaytan S60 (monoestearato de sorbitana); Blenda2 (-1): Dhaytan TS60 (triestearato de sorbitana)/Dhaytan S60 (monoestearato de sorbitana); Blenda3 (0): Dhaytan T80 (trioleato de sorbitana)/Dhaytan TS60 (triestearato de sorbitana)/Dhaytan S60 (monoestearato de sorbitana).

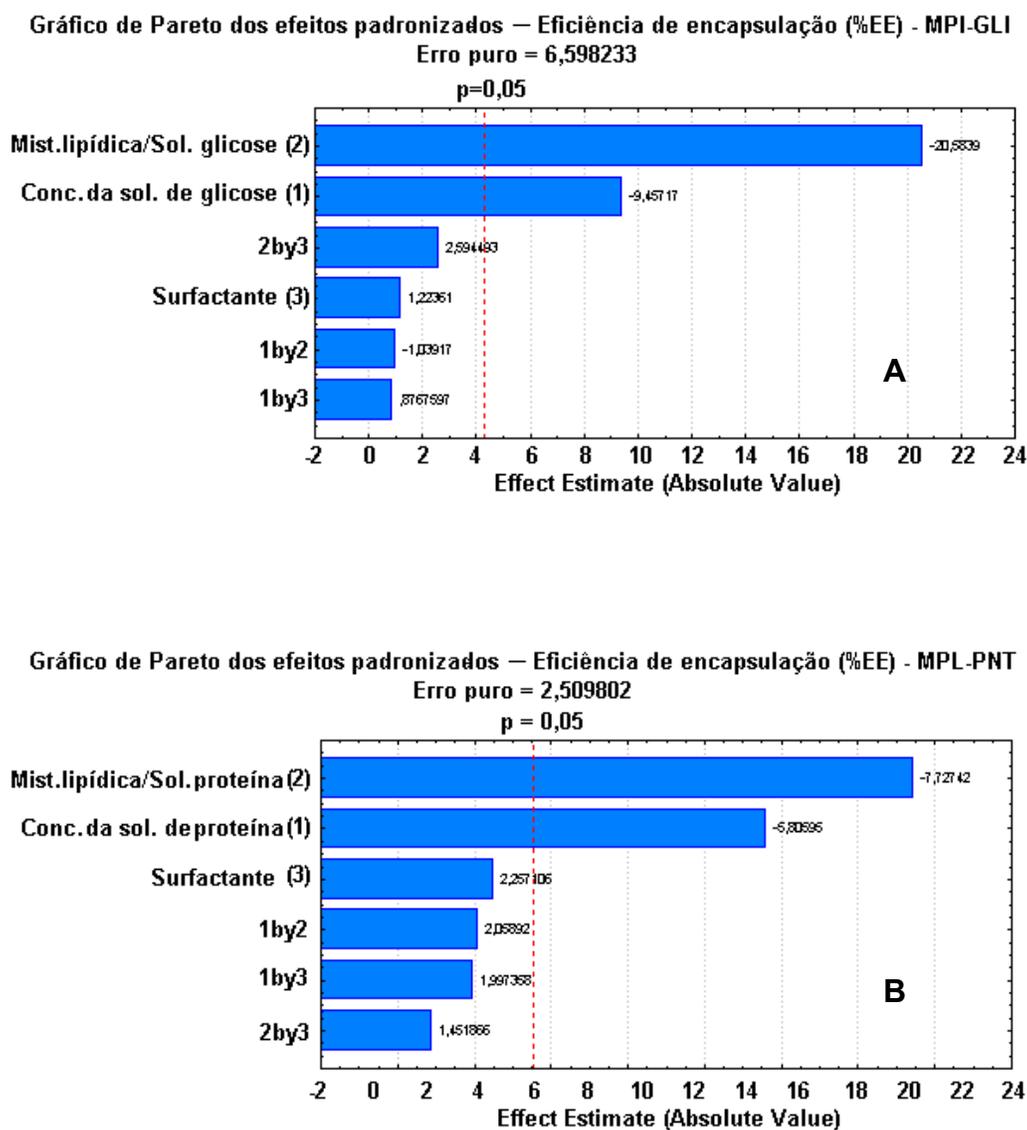
**Tabela 33:** Planejamento experimental (variáveis numéricas e codificadas) e respostas para avaliação da produção de micropartículas lipídicas contendo proteína.

Ensaio	Variáveis*			Resposta
	[PTN] (%p/p)	LIP/PTN (p/p)	Tensoativo**	%EE
1	8 (-1)	70/30 (-1)	B1 (+1)	104,81
2	8 (-1)	70/30 (-1)	B2 (-1)	104,71
3	8 (-1)	90/10 (+1)	B1 (+1)	76,50
4	8 (-1)	90/10 (+1)	B2 (-1)	75,43
5	40 (+1)	70/30 (-1)	B1 (+1)	83,99
6	40 (+1)	70/30 (-1)	B2 (-1)	79,32
7	40 (+1)	90/10 (+1)	B1 (+1)	75,13
8	40 (+1)	90/10 (+1)	B2 (-1)	54,24
9	24 (0)	80/20 (0)	B3 (0)	86,94
10	24 (0)	80/20 (0)	B3 (0)	86,53
11	24 (0)	80/20 (0)	B3 (0)	84,01

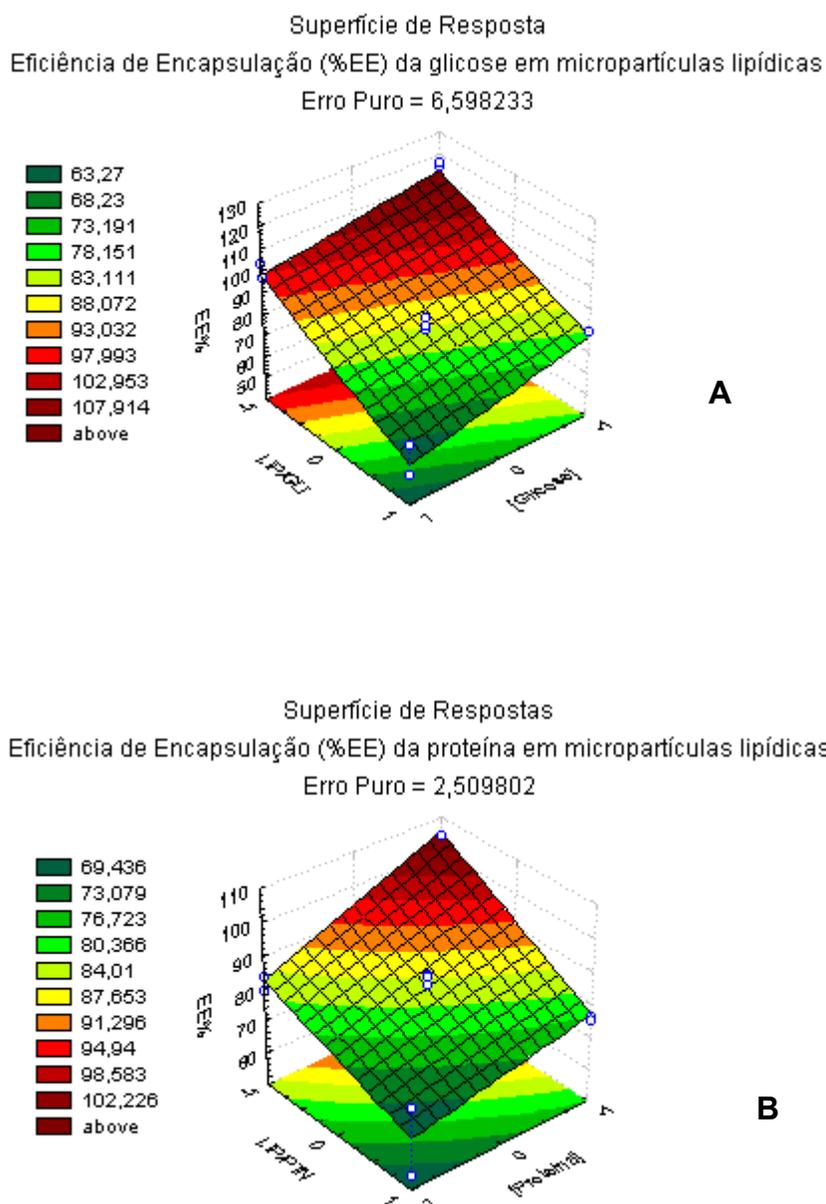
\* Os números entre parênteses representam as variáveis codificadas. \*\*Tensoativos utilizados: Blenda1 (+1): Dhaytan T80 (trioleato de sorbitana)/Dhaytan S60 (monoestearato de sorbitana); Blenda2 (-1): Dhaytan TS80 (triestearato de sorbitana)/Dhaytan S60 (monoestearato de sorbitana); Blenda3 (0): Dhaytan T80 (trioleato de sorbitana)/Dhaytan TS60 (triestearato de sorbitana)/Dhaytan S60 (monoestearato de sorbitana).

As Tabelas 32 e 33 apresentaram valores acima de 100% para eficiência de encapsulação, sendo isso atribuído às perdas de material lipídico na etapa de homogeneização entre este e a solução de recheio. Uma pequena quantidade do material ficou aderida na parede do Becker e não foi descontada para correção do cálculo da eficiência de encapsulação. Assumiu-se nesses casos que toda glicose foi encapsulada.

As Figuras 33 e 34 apresentam análises estatísticas dos planejamentos quanto à eficiência de encapsulação na forma de gráficos de Pareto dos efeitos padronizados (efeitos significativos representados pelas barras que cruzam a linha indicativa de  $p=0,05$ ) e superfícies de resposta.



**Figura 33:** Gráficos de Pareto com valores estimados dos efeitos principais e interações de segunda ordem para as variáveis estudadas sobre a eficiência de encapsulação (%EE) na produção de micropartículas lipídicas, ao nível de 95% de confiança ( $p=0,05$ ). A – Micropartículas lipídicas contendo glicose (MPL-GLI) B - Micropartículas lipídicas contendo proteína (MPL-PTN).



**Figura 34:** Eficiência de encapsulação (%EE): A - Superfície de Resposta para proporção mistura lipídica/solução de glicose X concentração da solução de glicose X %EE. B - Superfície de Resposta para proporção mistura lipídica/solução de proteína X concentração da solução de proteína X %EE.

Os gráficos de Pareto na Figura 33 apresentaram a proporção entre a mistura lipídica e soluções de recheios e a concentração dessas soluções com efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) sobre as eficiências de encapsulação, tanto para

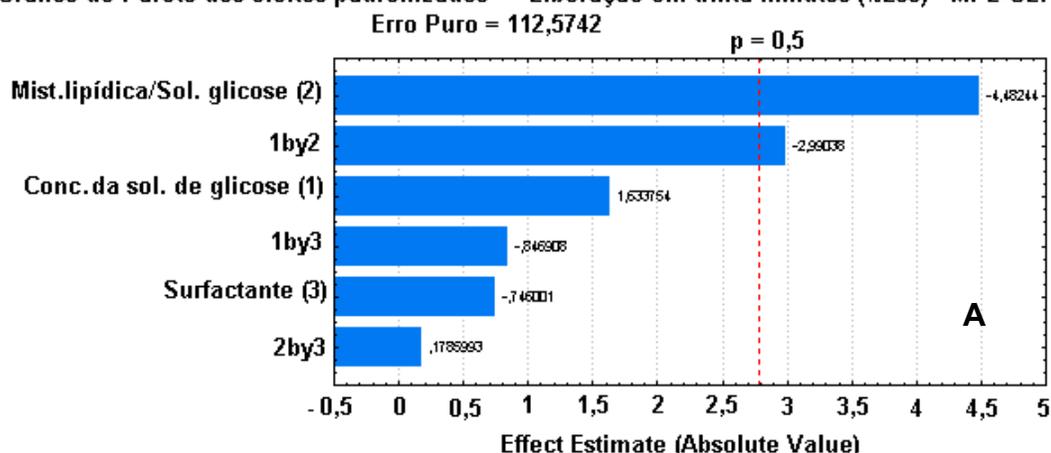
glicose quanto para proteína. Não foi observado efeito significativo na interação entre as variáveis.

A Figura 34 A e B apresenta as superfícies de resposta para os planejamentos. As eficiências de encapsulação aumentaram para ambos os recheios à medida que se aumentou a proporção entre material lipídico e solução de recheio e diminuiu-se a concentração das mesmas. Esse comportamento pode estar fortemente associado com a estabilidade das emulsões formadas pelas diferentes combinações entre as variáveis que influenciam na distribuição do recheio pela matriz. Na produção convencional de micropartículas desidratadas por *spray dryer*, a proporção entre material de parede e recheio é determinante na obtenção de altas eficiências de encapsulação e retenção do material desejado [Ré, 1998; Reineccius, 1988].

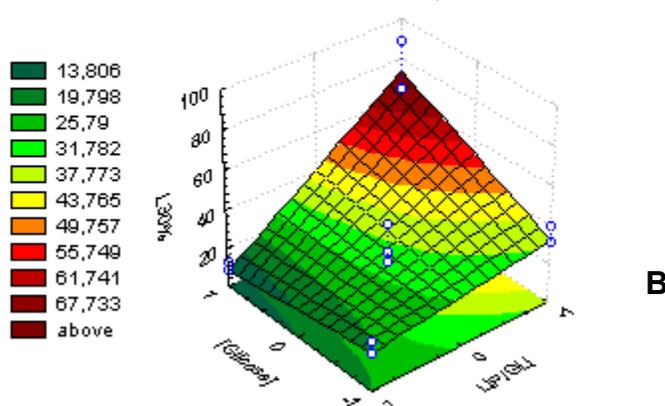
#### 5.3.4.2.2. Liberação da glicose em 30 minutos (%L30)

As micropartículas lipídicas contendo glicose (MPL-GLI), produzidas nos vários ensaios do planejamento experimental, foram avaliadas quanto à liberação desse recheio em água, para um período de trinta minutos. Os resultados estatísticos são apresentados na Figura 35, na forma de um gráfico de Pareto e uma superfície de resposta.

Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados – Liberação em trinta minutos (%L30) - MPL-GLI



Superfície de Resposta  
 Liberação em de glicose em trinta minutos (%L30)  
 Erro Puro = 112,5742



**Figura 35:** Liberação de glicose em 30 minutos (%L30): A - Gráfico de Pareto com valor estimado dos efeitos principais e interações de segunda ordem para as variáveis estudadas na produção de micropartículas lipídicas contendo proteína, ao nível de 95% de confiança ( $p=0,05$ ). B - Superfície de Resposta para proporção mistura lipídica/solução de proteína X concentração da solução de proteína X %L30.

O gráfico de Pareto da Figura 35 indica que, para liberação em trinta minutos, as variáveis concentração e proporção entre mistura lipídica e solução de recheio apresentaram efeito estatisticamente significativo. A superfície de resposta (Figura 35 - B) mostra que a liberação aumenta com o aumento da proporção

entre mistura lipídica e solução de recheio e a concentração dessa. **Magee & Olson [1998a]** obtiveram altas eficiências de encapsulação para glicose, porém também encontraram dificuldade para retê-la em matrizes lipídicas.

O tipo de blenda de tensoativos utilizados não apresentou efeito estatisticamente significativo ( $p > 0,5$ ) para nenhuma das respostas avaliadas nos dois planejamentos. No entanto, quanto ao aspecto dos produtos obtidos, foi observada uma maior aglomeração entre as partículas com o uso da blenda 2. O Dhaytan TS60 que compõe essa blenda, é líquido em temperatura ambiente, podendo ser o responsável pela aglomeração das MPLs.

#### **5.3.4.3. Produção de coacervados contendo micropartículas lipídicas**

Para produção de micropartículas coacervadas contendo micropartículas lipídicas foram necessárias algumas adaptações às condições já estabelecidas (Figura 27). A fragmentação das MPLs poderia levar à perdas de recheio. Sendo assim, a dispersão das MPLs na solução de gelatina passou a ser feita com a ajuda de um bastão de vidro no lugar do ultraturrax. No entanto as MPLs separaram rapidamente da solução, dificultando a sua incorporação nos coacervados. Para melhorar a dispersibilidade das MPLs na gelatina foi adicionado um pequeno volume de solução de SDS 10% (p/p). Isso permitiu uma certa estabilidade na dispersão, sem prejudicar a formação dos coacervados.

A temperatura de processo foi reduzida para 40°C para favorecer a integridade das micropartículas lipídicas. Segundo **Thies [1995]** a temperatura na coacervação pode estar entre 40 e 60°C. O tempo de resfriamento, após o ajuste de pH, foi reduzido para 30 minutos, evitando que o aquecimento a 40°C juntamente com a agitação levasse a uma perda excessiva por lixiviação dos componentes hidrofílicos.

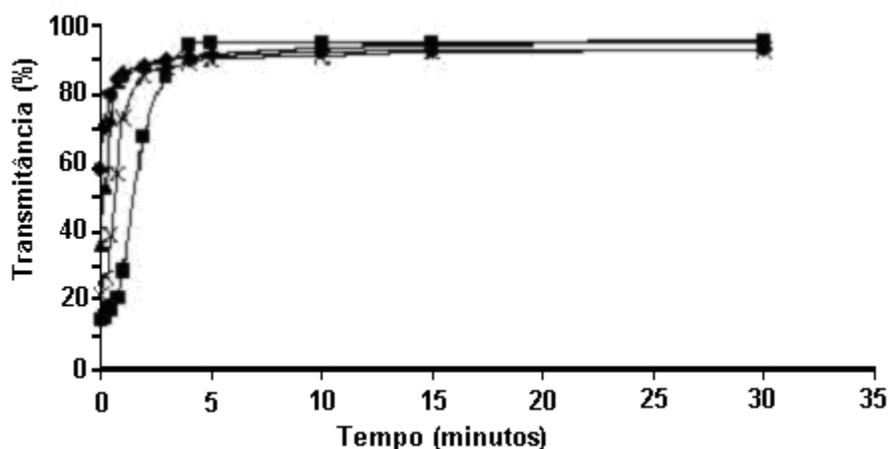
A formação do coacervado ocorreu, como já observado, nos experimentos anteriores para a oleoresina de páprica com a precipitação das micropartículas formadas.

As micropartículas coacervadas foram peneiradas imediatamente após o resfriamento e amostras para liberação e determinação de umidade foram pesadas rapidamente para evitar variações na quantidade de água do material úmido.

### 5.3.5. Caracterização das micropartículas coacervadas

#### 5.3.5.1. Flutuabilidade

O perfil de sedimentação das micropartículas coacervadas foi determinado para amostras produzidas com diferentes quantidades de recheio nos testes preliminares e são apresentados na Figura 36.



**Figura 36:** Sedimentações das micropartículas coacervadas produzidas com diferentes quantidades de recheio em relação a quantidade de polímeros de parede (base seca): 15% (●), 25% (■), 50% (▲) e 100% (X). Monitoramento das porcentagens de transmittância ao longo do tempo. Coeficiente de variação (desvio padrão / média X 100) máximo = 3,9%.

Todas as amostras de micropartículas coacervadas tiveram rápida precipitação, atingindo valores acima de 80% de transmitância até 5 minutos. Para o tempo de trinta minutos todas as suspensões das amostras apresentaram transmitância superior a 90% com valores estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ). O tempo de sedimentação pode influenciar a detecção e aceitação das dietas inertes por larvas de peixes. Tempos de sedimentação entre 1,15 e 11,11 minutos para dietas inertes foram determinados por **Pedroza-Islas et al., [2000]** correlacionando os valores à aceitação dessas dietas pelas larvas.

**Mukai-Corrêa et al. [2005]** avaliaram por registro fotográfico a sedimentação de micropartículas produzidas por gelificação iônica obtendo amostras que ficaram dispersas na coluna de água sem sedimentarem por um período de 60 minutos.

Diferentemente dos aglomerados (capítulo 2), as micropartículas coacervadas apresentam matrizes insolúveis que podem ser filtradas dos tanques de larvicultura.

### ***5.3.5.2. Determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanho de partículas (micropartículas lipídicas e coacervados em geral)***

#### ***5.3.5.2.1. Diâmetro médio e distribuição de tamanho para micropartículas coacervadas contendo composto hidrofóbico (oleoresina/óleo de soja).***

Os diâmetros médios determinados por microscopia ótica das micropartículas coacervadas contendo oleoresina/óleo de soja (1:1) úmidas e secas, submetidas às várias condições de reticulação são apresentados na Tabela 34. A dispersão das amostras foi feita em diversos meios (água para as amostras úmidas e re-hidratadas, glicerina para amostras desidratadas e etanol para todas

as amostras) seguida de tomada das imagens e posterior utilização de software para o dimensionamento.

**Tabela 34:** Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) determinado por microscopia ótica para micropartículas coacervadas úmidas, desidratadas por liofilização e por *spray dryer*, com captação em diversos meios.

	Meio de captação					
	Água		Glicerina		Etanol	
	Úmido	Liofilizado	Spray Dryer	Úmido	Liofilizado	Spray Dryer
<b>SR</b>	52,20*	39,10		46,42	43,78	
	3,75**	3,92	ND****	6,11	8,06	ND****
	7,18***	10,03		13,16	18,41	
<b>G0,1</b>	82,24	60,18	58,37	70,49	65,42	63,22
	11,78	2,26	17,38	4,43	6,13	12,16
	14,32	3,76	29,78	6,28	9,37	19,23
<b>G1</b>	43,68	38,07	56,59	41,31	41,71	59,50
	3,41	5,36	11,74	4,14	6,15	12,79
	7,81	14,08	20,75	10,02	14,74	21,50
<b>TG</b>	96,43	56,66	65,17	76,04	63,89	66,68
	10,25	10,78	16,09	13,71	9,67	12,70
	10,63	19,03	24,69	18,13	15,14	19,05

\* Média; \*\* Desvio Padrão. \*\*\*Coeficiente de variação = desvio padrão/média X 100, \*\*\*\* ND = não determinado. SR - micropartículas coacervadas contendo oleoresina de paprica sem reticulaao; TG - micropartulas coacervadas reticuladas com transglutaminase (10U/g.ptn); G01 - micropartulas coacervadas reticuladas com glutaraldeido (0,1mM/g.ptn); G1 - micropartulas coacervadas reticuladas com glutaraldeido (1,0mM/g.ptn).

As micropartulas úmidas foram avaliadas apos a produçao, suspensas em gua. Os tratamentos reticulados com glutaraldeido na menor concentraao (0,1mM/g.ptn) e transglutaminase produziram micropartulas com diâmetros medios maiores que os observados para partulas úmidas não reticuladas. O aumento na concentraao de glutaraldeido entretanto produziu micropartulas menores que o padrão não reticulado. Diversos fatores podem estar envolvidos com esse comportamento e, entre eles, deve-se considerar que a molécula de glutaraldeido, apos a formaao das ligaoes cruzadas, permanece associada aos grupos amino das lisinas envolvidas [Gerrard, 2002] enquanto a enzima transglutaminase atuando sobre acido glutâmico e a amina da lisina efetua as ligaoes cruzadas saindo do sistema apos a reaao. Estes dois mecanismos poderiam gerar diferentes espaçamentos moleculares entre as cadeias

poliméricas da matriz da micropartícula influenciando conseqüentemente no tamanho da mesma, bem como em diferentes porosidades e diferentes velocidades de difusão do material de recheio. **Mwangi & Ofner [2004]** estudaram o efeito do aumento do percentual de reticulação com glutaraldeído em características diversas de géis de gelatina e observaram que o aumento do número de pontos de ligação entre as cadeias poliméricas diminuiu o diâmetro da malha da matriz formada de 325 para 90 angstroms.

**Vandelli et al. [2001]** produziram microesferas de gelatina e reticularam as mesmas com gliceraldeído, observando uma pequena redução no tamanho das microesferas com o aumento da intensidade das condições de reticulação.

**Strauss & Gibson [2004]** apresentam microscopias que revelam uma pequena diminuição no tamanho de micropartículas coacervadas de gelatina e pectina reticuladas com suco de uva (polifenol) e em relação às mesmas sem reticulação.

Micropartículas liofilizadas avaliadas opticamente apresentaram a mesma relação de tamanho observada para as partículas úmidas. Assim os coacervados reticulados com glutaraldeído na menor concentração (0,1mM) e com transglutaminase apresentaram diâmetros médios maiores que as partículas não reticuladas. O aumento da concentração de agente químico produziu partículas ligeiramente menores que as não reticuladas.

Os diâmetros médios determinados para partículas reticuladas e secas por *spray dryer* novamente indicaram maior diâmetro para as produzidas com a enzima e suave decréscimo com o aumento da concentração do agente químico.

Considerando que os estudos de liberação da oleoresina foram feitos em etanol anidro e que esse solvente é um agente desidratante, a medida do diâmetro médio de todos os sistemas foi também efetuada após as partículas terem sido transferidas ao etanol e mantidas no mesmo por 5 minutos antes da captação das imagens no microscópio (Tabela 34). Como esperado, todas as partículas úmidas,

independentes dos tratamentos de reticulação utilizados, apresentaram redução de tamanho, com menor variação observada para a condição de reticulação com glutaraldeído na maior concentração (1,0mM/g ptn). Comparando os efeitos da desidratação para as partículas liofilizadas (medidas em glicerina) e as partículas úmidas desidratadas pelo etanol, observa-se a mesma ordem, com valores absolutos próximos nos dois casos. O mesmo comportamento foi observado para as partículas secas em *spray dryer* observadas em glicerina, comparadas às partículas úmidas desidratadas pelo etanol.

A desidratação das micropartículas ocasionou diferentes variações percentuais de diâmetro em relação às partículas úmidas. As partículas reticuladas com transglutaminase desidratadas em liofilizador apresentam uma redução acentuada de tamanho (41,2%) em relação à sua respectiva amostra, úmida sendo a maior variação dentre as amostras liofilizadas. A menor variação foi observada para as micropartículas reticuladas com glutaraldeído na maior concentração (1,0mM/g ptn), apresentando uma redução de tamanho de 12,8% em relação ao mesmo material úmido. As micropartículas sem reticulação e reticuladas com glutaraldeído na concentração de 0,1mM/g.ptn tiveram diminuição de tamanho próximas e intermediárias aos outros tratamentos.

Redução do tamanho médio também foi observada para as partículas secas por *spray dryer*, sendo a maior redução observada para transglutaminase (30,80%), seguida pelo glutaraldeído, na menor concentração de 0,1mM/g ptn (23,12%).

As micropartículas coacervadas secas por liofilização ou por *spray dryer* foram re-hidratadas em água (10 minutos entre adição da água e captação das imagens) e o diâmetro médio desse material é apresentado na Tabela 35.

**Tabela 35:** Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) de micropartículas coacervadas secas por liofilização ou por *spray dryer* re-hidratadas em água (10 minutos).

	Captação em água			
	SR	G0,1	G1	TG
<b>Liofilizado</b>	65,12*	101,77	62,54	106,86
	2,37**	7,71	7,54	26,14
	3,64***	7,58	12,06	24,46
<b>Spray Dryer</b>		100,31	97,97	90,42
	ND****	23,46	17,87	15,23
		23,38	18,24	16,84

\* Média; \*\* Desvio Padrão. \*\*\*Coeficiente de variação = desvio padrão/média X 100, \*\*\*\* ND = não determinado. SR - micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica sem reticulação; TG – micropartículas coacervadas reticuladas com transglutaminase (10U/g.ptn); G01 - micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído (0,1mM/g.ptn); G1 - micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído (1,0mM/g.ptn).

Para os dois processos de secagem e todos os tratamentos de reticulação foi observada a absorção de quantidade significativa de água, com os diâmetros médios, atingindo valores próximos aos tamanhos originais das micropartículas úmidas antes da secagem e em alguns casos, até superando esses valores.

Os diâmetros das amostras liofilizadas, após a re-hidratação, foram comparados com os diâmetros de suas respectivas amostras observadas em glicerina. Para a reticulação com glutaraldeído observou-se uma porcentagem de inchamento (calculada da seguinte maneira: (diâmetro médio da partícula re-hidratada – diâmetro médio da partícula seca)/diâmetro médio da partícula seca X 100) maior para a concentração de 0,1mM/g ptn do que para a concentração de 1,0mM/g ptn (69,1 e 64,3% respectivamente). A literatura apresenta diversos trabalhos com estudos nos quais o nível de absorção de água de matrizes poliméricas tende a ser inversamente proporcional ao grau de reticulação [Ofner & Bubnis, 1996; Brazel & Peppas, 1999; Vandelli et al., 2001; Mwangi & Ofner, 2004; Strauss & Gibson, 2004]. Para essas mesmas amostras submetidas à secagem por *spray dryer*, observou-se quase a mesma porcentagem de inchamento (0,1mM/g ptn com 71,9% e 1,0mM/g ptn com 73,1%) sendo esses valores maiores que os apresentados para a liofilização.

Para a amostra liofilizada reticulada com transglutaminase o diâmetro médio após a re-hidratação foi 88,6% maior que o original e no caso das partículas desidratadas por *spray dryer* esse valor caiu para 38,7%.

Como já discutido na sessão 3.3.1.4, o diâmetro médio apresentado por todas as amostras úmidas e re-hidratadas estão de acordo com a faixa de tamanho desse tipo de micropartículas encontrada em literatura (10 a 800  $\mu\text{m}$ ) [Lamprecht, Shafer & Lehr, 2001; Menger et al., 2000; Bachtisi & Kiparissides, 1996; Nakagawa et al., 2004]. As amostras desidratadas por liofilização ou *spray dryer* também se encontram nessa faixa e se aproximam a valores citados para outras micropartículas desidratadas [Vandelli et al., 2001; Lamprecht, 2001; Iwanaga et al., 2003].

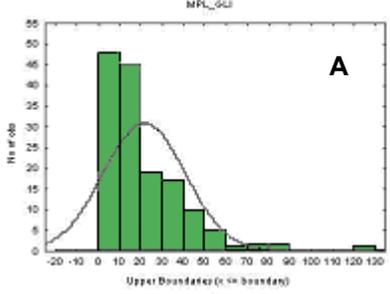
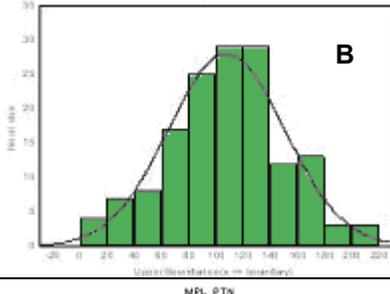
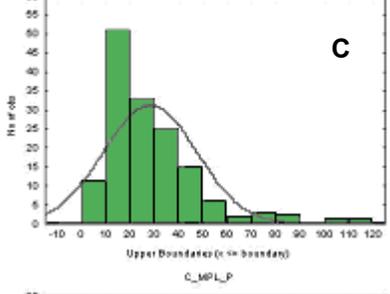
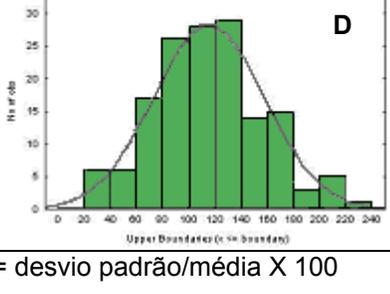
Algumas amostras de micropartículas coacervadas desidratadas apresentaram diâmetros médios abaixo do limite inferior da faixa citada como adequada para alimentação de larvas de peixe (50 a 600  $\mu\text{m}$ ). No entanto essas partículas após a re-hidratação tiveram um aumento significativo de diâmetro voltando a estarem adequadas, quanto ao tamanho, para o uso como substitutos de alimentos vivos. [Yúfera et al., 1999; Cahu & Zambonino Infante, 2001; Genodepa et al., 2004; Carvalho et al., 2004; Kvale et al., 2005].

#### 5.3.5.2.2. Diâmetro médio e distribuição de tamanho para micropartículas coacervadas contendo compostos hidrofílicos (glicose e isolado protéico de soro de leite).

As micropartículas lipídicas foram dispersas em glicerina para a captação das imagens para determinação do tamanho de partícula, permanecendo separadas e sem alteração de estrutura. Os diâmetros médios dos coacervados foram determinados com a dispersão das partículas em água. A Tabela 36 mostra os diâmetros médios e distribuição de tamanho de partículas das micropartículas

lipídicas contendo compostos hidrofílicos (glicose e proteína) e de micropartículas coacervadas contendo essas micropartículas lipídicas.

**Tabela 36:** Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ) e distribuição de tamanho de partículas das micropartículas lipídicas contendo compostos hidrofílicos (glicose e proteína) e de micropartículas coacervadas contendo essas micropartículas lipídicas.

		Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	Distribuição de tamanho
GLICOSE	Micropartícula Lipídica	21,61* $\pm$ 19,30** (89,31)***	
	Coacervado	107,76 $\pm$ 42,91 (39,82)	
PROTEÍNA	Micropartícula Lipídica	28,21 $\pm$ 19,14 (67,85)	
	Coacervado	115,13 $\pm$ 42,37 (36,80)	

\* Média; \*\* Desvio Padrão. \*\*\*Coeficiente de variação = desvio padrão/média X 100

\* Média; \*\* Desvio Padrão. \*\*\*Coeficiente de variação = desvio padrão/média X 100

O diâmetro médio dos dois tipos de micropartículas lipídicas foi característico de partículas produzidas por atomização na secagem em *spray dryer* que fica em uma faixa de 5 a 100  $\mu\text{m}$ . Na secagem convencional em *spray dryer*, o diâmetro do bico atomizador tem influência no tamanho da gota formada na secagem e, conseqüentemente, no tamanho da partícula sólida. Era esperado que o mesmo ocorresse com as gotas de mistura lipídica.

Diâmetros médios de micropartículas lipídicas obtidas por atomização são citados em literatura na faixa de 2 a 40  $\mu\text{m}$  [Magee & Olson, 1989; Onal & Langdon, 2004a; Barbosa et al., 2004]. Os desvios padrão altos indicam pouca homogeneidade nos tamanhos, mas atendem a uma distribuição normal, como mostram os gráficos nas Figuras A e C da Tabela 36.

Os coacervados contendo micropartículas lipídicas de glicose apresentaram diâmetro médio 5 vezes maior que de suas partículas lipídicas, enquanto que para os coacervados contendo micropartículas lipídicas de proteína, mostraram-se na média, 4 vezes maiores que suas micropartículas lipídicas. O alto desvio padrão nos dois casos mostra uma ampla distribuição de tamanho, observada também na microscopia ótica, com coacervados praticamente vazios e outros envolvendo grandes aglomerados de micropartículas lipídicas. Os histogramas dos dois coacervados apresentaram uma distribuição normal (Tabela 36 - Figuras B e D). Onal & Langdon [2005] obtiveram micropartículas poliméricas contendo micropartículas lipídicas na faixa de 20 a 500 $\mu\text{m}$  de diâmetro associando a variação às condições de atomização que influenciam o tamanho das partículas.

### 5.3.5.3. Morfologia e microestrutura

#### 5.3.5.3.1. Produção de micropartículas coacervadas - Testes preliminares

A microscopia confocal de varredura a laser é originalmente muito utilizada pelas ciências biológicas para o estudo de estruturas como células e tecidos, e

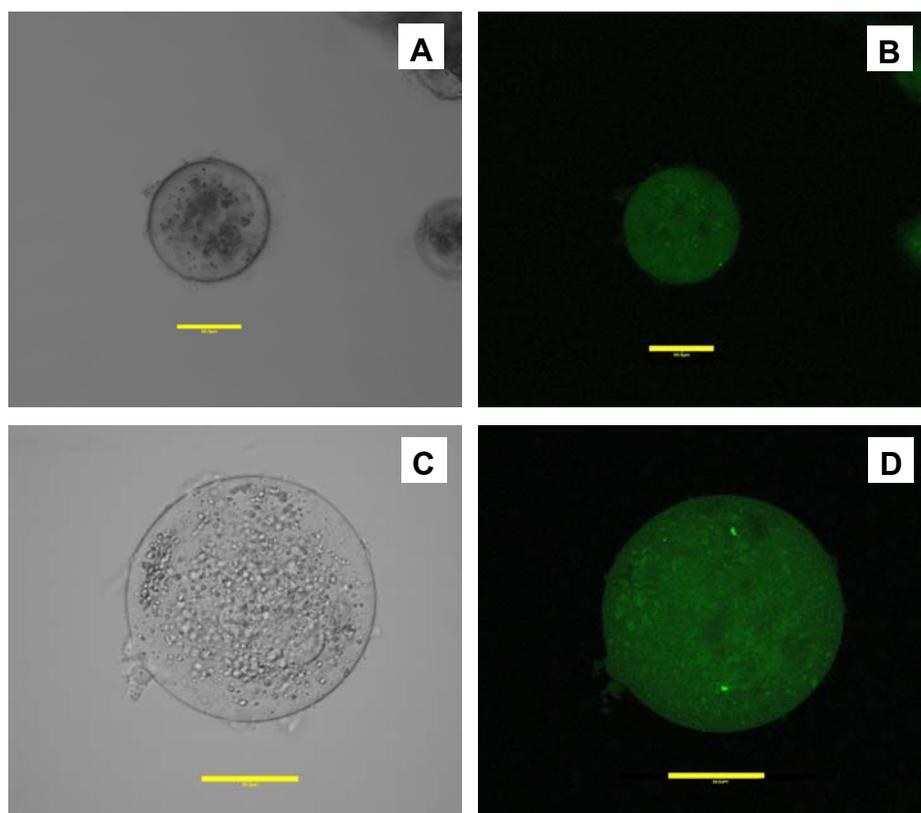
vem ganhando espaço nas áreas de colóides e ciência de alimentos **[Kerstens, et al., 2005]** A vantagem deste tipo de microscopia é o fato de ser uma técnica não invasiva que permite a observação interna de diversos tipos de estruturas sem que essas tenham que ser fragmentadas ou desidratadas **[Bertan, 2003; Lamprecht et al., 2000 e 2001; Al-Maaieh & Flanagan, 2001]**. A técnica é relativamente simples baseada na excitação de substâncias com propriedades fluorescentes, pela incidência de um feixe de *laser* (ajustado no comprimento de ondas apropriado para cada substância) e captação da energia emitida pelas substâncias após a excitação, formando uma imagem. O composto analisado pode ter uma fluorescência natural ou pode ser associado a um componente fluorescente seguido de observação em microscópio apropriado **[Bertan, 2003]**.

A microscopia de varredura laser confocal vem sendo aplicada recentemente em diversos estudos de microencapsulação na tentativa de melhorar a observação da distribuição dos componentes de parede e recheio. **[Lamprecht et al., 2000 e 2001; Zimmermann et al., 2003; Al-Maaieh & Flanagan, 2001; Bouillot et al., 1999; Rahman & Mathiovitz, 2004; Lulevich et al., 2003]**.

As micropartículas coacervadas, usando gordura vegetal hidrogenada misturada à solução de caseína como recheio, foram produzidas paralelamente aos testes preliminares com oleoresina, sendo obtidas com sucesso e apresentando características similares às obtidas com o recheio de oleoresina/óleo de soja (sessão 5.3.1.). As condições de produção seguiram o fluxograma da Figura 26 com temperatura de 50°C para manutenção da gordura na forma líquida, favorecendo a formação da emulsão e, posteriormente, das micropartículas coacervadas. A complexação dos componentes envolvidos na produção das micropartículas coacervadas (gelatina, goma arábica e caseína, corados com FITC, e gordura vegetal hidrogenada corada com *Nile Red*) também não influenciou na formação das mesmas, sendo característico o aspecto observado primeiramente por microscopia ótica.

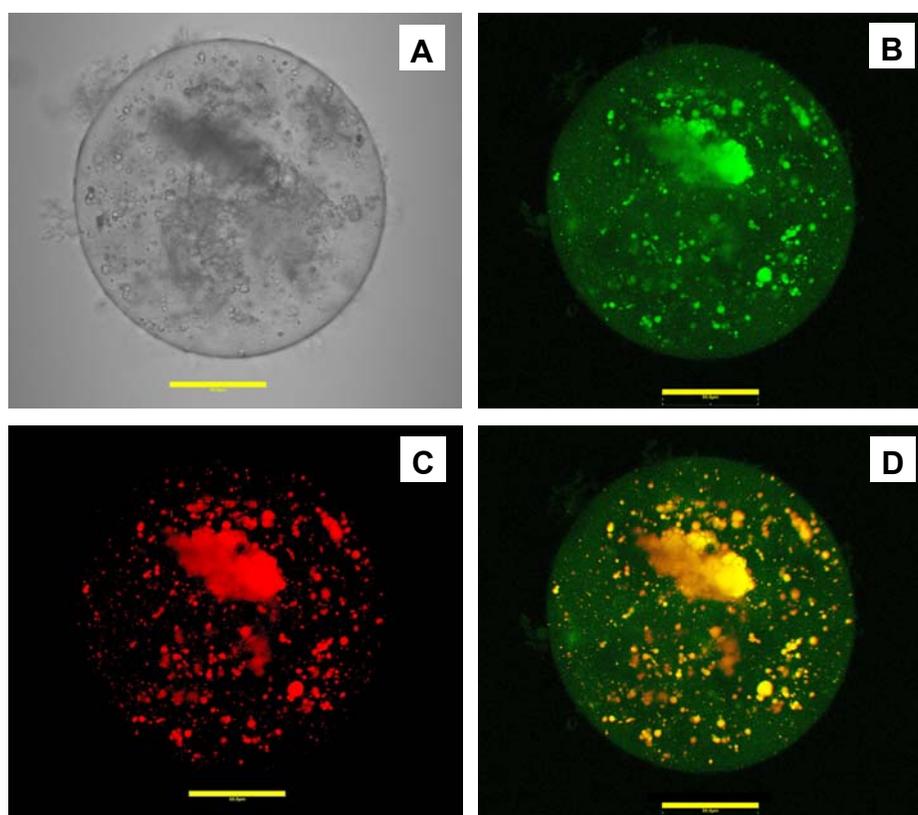
As Figuras apresentadas a seguir mostram os diversos tratamentos corados com os corantes *Nile Red* e FITC e captação das imagens por microscopia laser confocal.

Nas imagens da Figura 37 observa-se uma distribuição do corante FITC por toda a estrutura, indicando uma conformação matricial, diferente do observado por **Lamprecht et al. [2000]** com um halo contornando o recheio. Esse aspecto saturado do material pode ser decorrência de uma “contaminação” dos outros polímeros (inicialmente não corados) pelo resíduo de FITC livre que pode ter se ligado a eles durante o processamento das micropartículas coacervadas.



**Figura 37:** Imagens obtidas por microscopia Confocal: Sistema 1: A – observação por transmitância, B- Goma arábica-FITC. Sistema 2: C – observação por transmitância, D - Gelatina- FITC (fluorescência observada-cor verde). Barras = 50  $\mu\text{m}$ . Observação e captação das imagens em aproximadamente metade da altura da micropartícula.

A Figura 38 apresenta as micropartículas coacervadas produzidas com gelatina corada com FITC e gordura vegetal hidrogenada corada com *Nile Red* mostrando nitidamente a distribuição da gordura na estrutura (Figura 38 - C) e confirmando o arranjo multinucleado e estrutura matricial (Figura 38 B e D) já observado na microscopia ótica (Figuras nas Tabelas 25, 26 e 27). **Mukai-Corrêa et al. [2005]** utilizou a microscopia confocal para visualização dos componentes de micropartículas obtidas por geleificação iônica (polímero de parede corado com FITC e gordura vegetal hidrogenada corada com *Nile Red*) obtendo resultados similares aos observados para as micropartículas coacervadas.



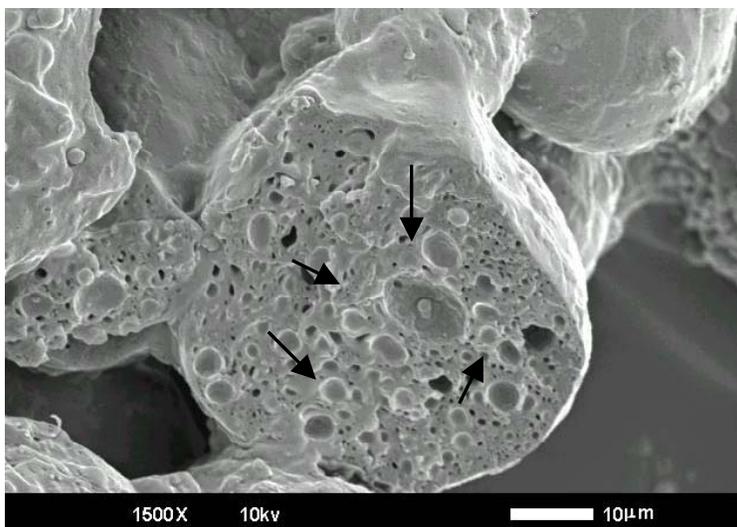
**Figura 38:** Imagens obtidas por microscopia Confocal: Gelatina-FITC + goma arábica sem coloração (fluorescência observada na cor verde) e Gordura vegetal hidrogenada-*Nile Red* + caseína sem coloração (fluorescência observada na cor vermelha): A - Observação por transmitância; B - Gelatina-FITC; C - Gordura Hidrogenada-*Nile Red*; D - Sobreposição de B e C. Barras = 50  $\mu\text{m}$ . Observação e captação das imagens em aproximadamente metade da altura da micropartícula.

**Lamprecht et al. [2000]** obtiveram por microscopia confocal a distribuição dos polímeros de parede e do recheio para microcápsulas mononucleadas obtidas por coacervação complexa.

**Rahman & Mathiovitz [2004]** observaram localizações variadas de soro albumina bovina corada com FITC (BSA-FITC) usada como recheio em micropartículas com paredes compostas por poliésteres com essa localização variando de acordo com as condições de obtenção das micropartículas.

A Figura 39 corrobora a estrutura matricial observada pela microscopia ótica e confocal apresentando uma microscopia eletrônica de varredura da estrutura interna de uma micropartícula coacervada reticulada com glutaraldeído na concentração de 1,0mM/g.ptn, seca no *spray dryer*.

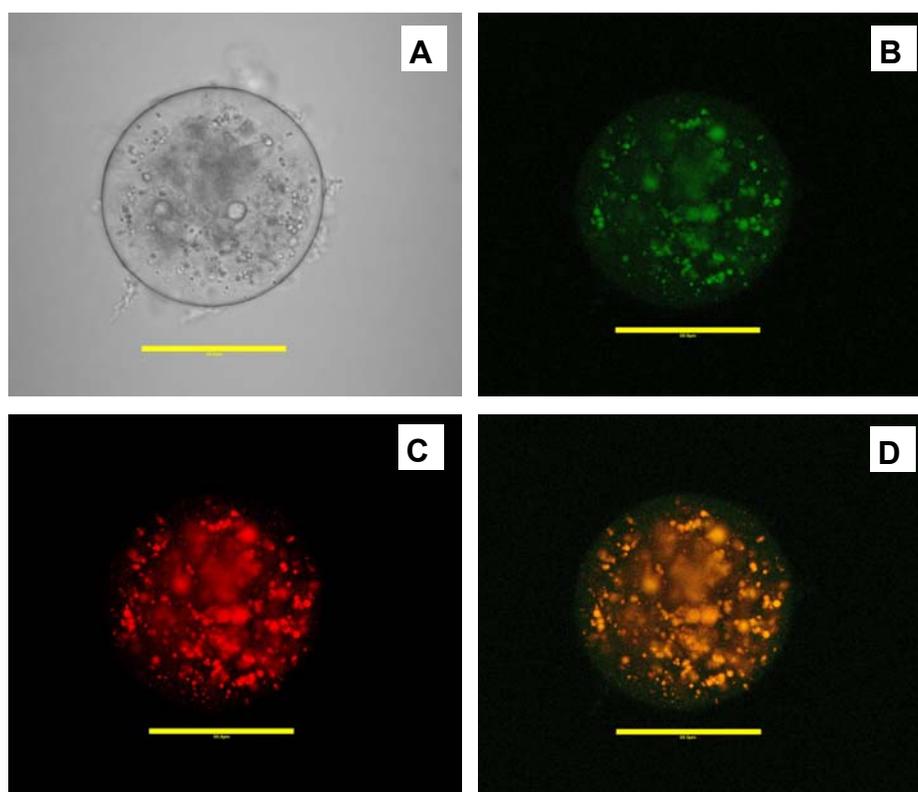
A imagem da Figura 39 permite identificar o local das gotas de recheio (setas pretas). A microscopia ótica e a microscopia confocal confirmaram as micropartículas coacervadas como multinucleadas. A microscopia eletrônica de varredura do interior da partícula seca permitiu adicionalmente, a visualização clara da conformação da matriz.



**Figura 39:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da estrutura interna de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído na

concentração de 1,0mM/g.ptn, seca no *spray dryer*. Barra = 10 $\mu$ m. Setas pretas – localização do recheio.

A Figura 40 apresenta uma microscopia confocal de micropartículas coacervadas nas quais apenas o recheio foi corado, ou seja, a gordura vegetal hidrogenada foi marcada com *Nile Red* e a caseína (misturada a gordura na forma de uma solução 11%) foi corada com FITC.



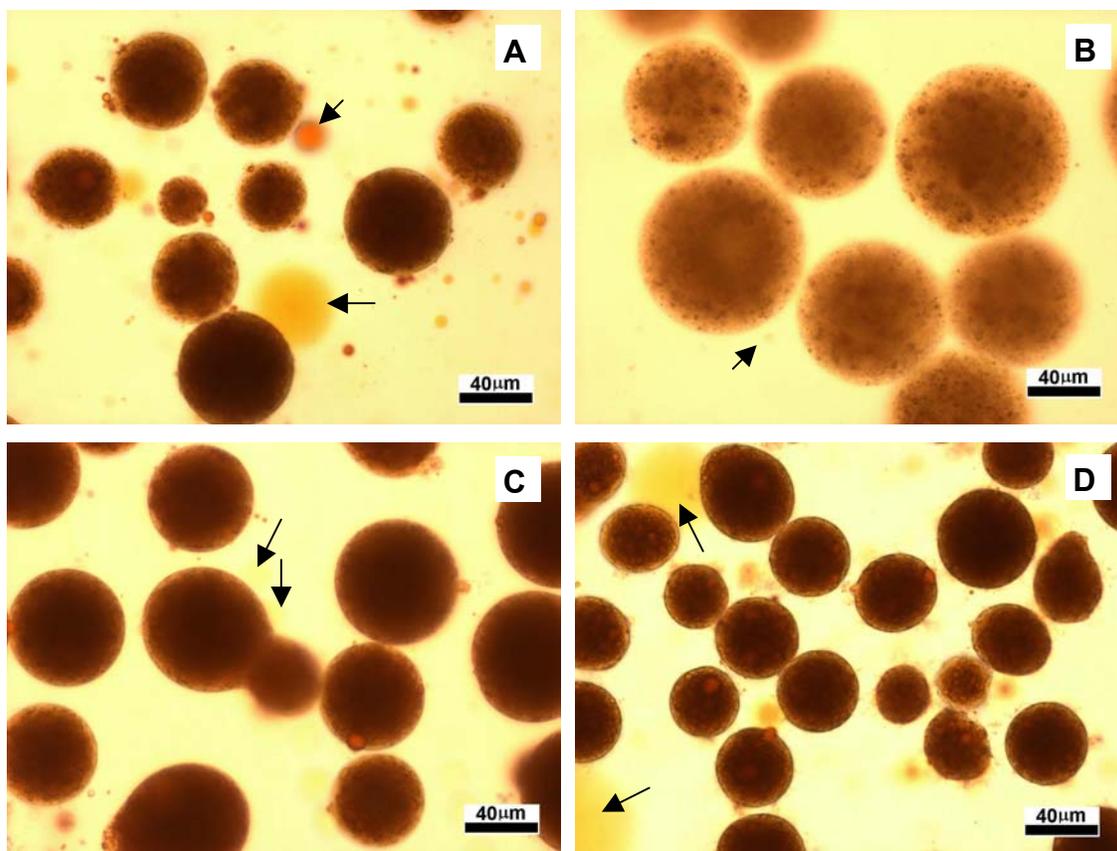
**Figura 40:** Imagens obtidas por microscopia Confocal: Sistema Gelatina + goma arábica sem coloração e Gordura Hidrogenada-*Nile Red* (fluorescência observada na cor vermelha) + caseína-FITC (fluorescência observada na cor verde): A - Observação por transmitância; B - Caseína-FITC; C - Gordura Hidrogenada-*Nile Red*; D - Sobreposição de B e C. Barras = 50  $\mu$ m. Observação e captação das imagens em aproximadamente metade da altura da micropartícula.

A distribuição da gordura vegetal hidrogenada pode ser observada claramente na Figura 40 (C) Figura 38 (C). A distribuição da caseína acompanha a conformação apresentada pela gordura (Figura 40 – B e D), decorrência natural da

emulsificação dos dois compostos para formação do recheio. A matriz apresenta uma tênue coloração verde devido à migração do FITC livre que complexou com os polímeros de parede, e também por uma difusão de caseína corada pela matriz polimérica.

*5.3.5.3.2 Obtenção de micropartículas coacervadas contendo compostos hidrofóbicos (recheio: oleoresina de paprica e óleo de soja) – Partículas midas sem reticulação, reticuladas com glutaraldeído e com transglutaminase.*

A produção de micropartículas com 100% de recheio em relação ao total de polímeros de parede (em base seca) utilizados nos estudos dos perfis de liberação de compostos hidrofóbicos foi realizada com sucesso, gerando cápsulas esféricas com contorno definidos. A Figura 41 apresenta imagens de micropartículas coacervadas contendo óleo de soja e oleoresina de paprica (1:1) sem reticulação, reticuladas com transglutaminase (10U/g ptn) ou com glutaraldeído (0,1mM/g ptn e 1,0mM/g ptn).



**Figura 41:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas contendo óleos resina de páprica e óleo de soja (1:1). A – Sem reticulação; B – Reticulação com transglutaminase (10U/g.ptn); C – Reticulação com glutaraldeído (0,1mM/g.ptn); D – Reticulação com glutaraldeído (1,0mM/g.ptn). Barras = 40µm. Captação em água. Setas pretas – óleo não encapsulado.

Os testes preliminares (sessão 5.3.1.) indicaram a presença de óleo não encapsulado, que também pode ser observado na Figura 41 (setas pretas) para todos os tratamentos. Esse óleo não encapsulado pode influenciar nos perfis de liberação desse composto.

A reticulação com glutaraldeído não alterou significativamente a aparência das micropartículas em nenhuma concentração (Figura 41 – C e D) quando comparadas à amostra não reticulada (Figura 41 – A). As micropartículas reticuladas com transglutaminase, ao contrário, apresentaram aparência nitidamente diferente das demais.

### 5.3.5.3.3 Secagem e re-hidratação de micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja

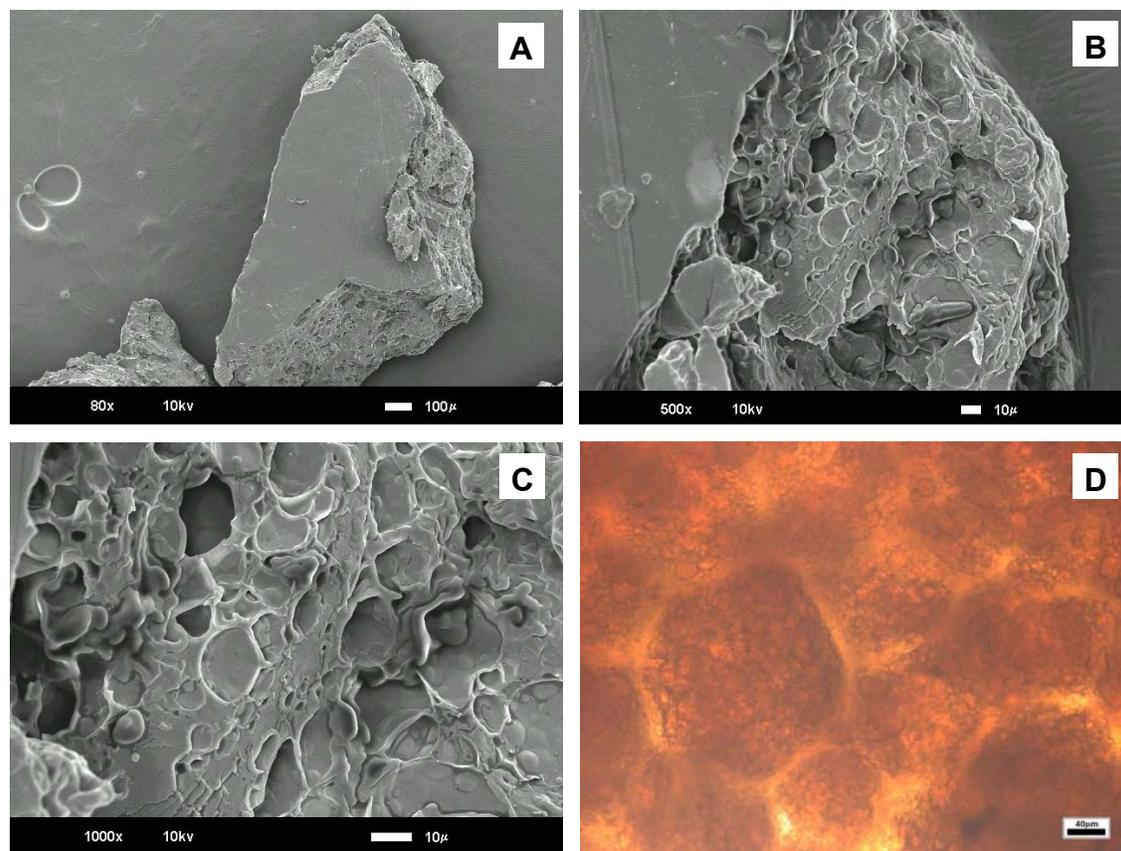
Os aspectos dos materiais desidratados produzidos a partir das micropartículas úmidas sem reticulação, reticuladas com glutaraldeído (1,0mM, 0,25mM, 0,1mM/g.ptn) ou transglutaminase (10U/g.ptn) e secos por diversos processos são mostrados nas figuras a seguir.

#### 5.3.5.3.3.1. Secagem em estufa

A secagem em estufa foi testada com amostras sem reticulação e com amostras reticuladas com glutaraldeído nas concentrações de 0,25mM/g.ptn e 1,0mM/g.ptn com tempos de reação de três horas ou *por 18 horas*.

A Figura 42 apresenta a morfologia de micropartículas coacervadas contendo oleoresina/óleo sem reticulação, secas em estufa, onde se observa a total perda da estrutura original das partículas úmidas (partículas individualizadas). Em aumento de 1000 vezes (Figura 42 – C) é possível observar que, apesar da perda de estrutura individualizada, o material seco ainda apresenta a estrutura matricial semelhante a da Figura 39, podendo se identificar na lateral do fragmento a presença de vários sulcos, prováveis localizações das gotículas de oleoresina.

A microscopia ótica do material seco adicionado de água para re-hidratação (Figura 42 – D) mostrou um sistema altamente coeso onde se pode observar o contorno das micropartículas e a intensa ligação entre elas.

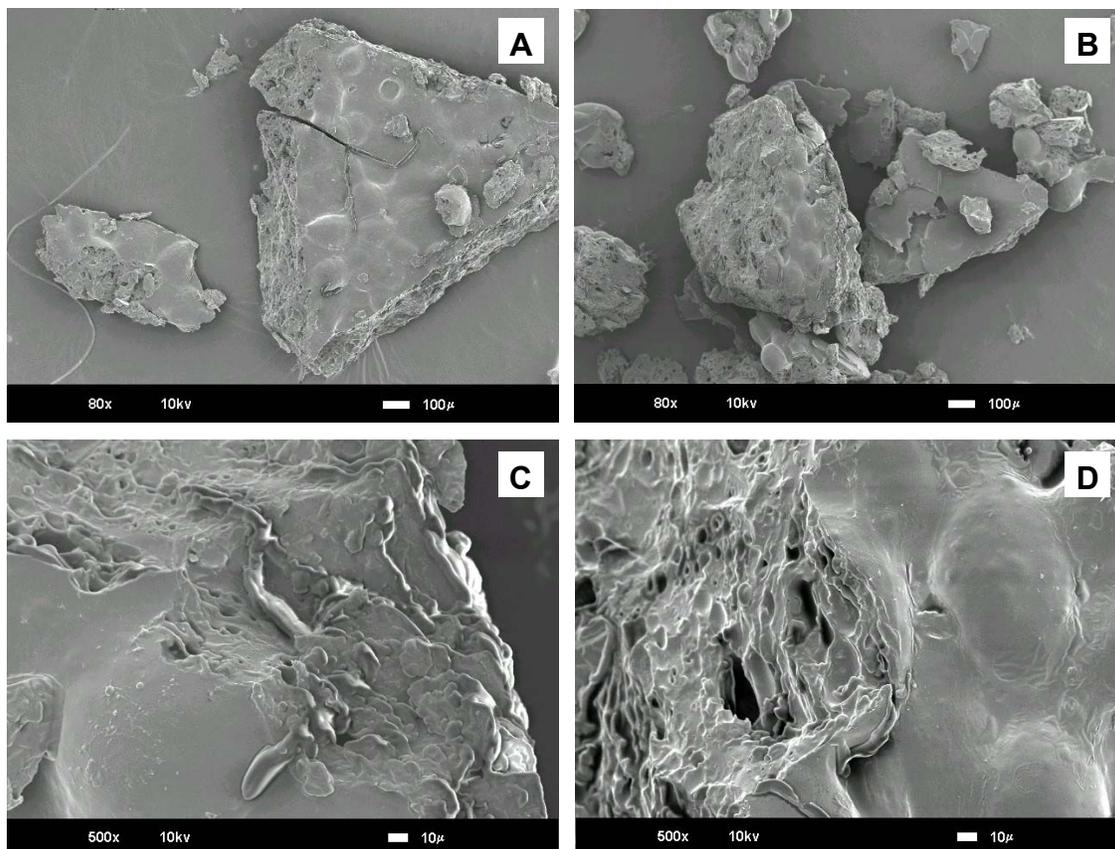


**Figura 42:** Imagens obtidas por micropartículas coacervadas sem reticulação secas em estufa. Microscopia eletrônica de varredura: Barras: A = 100 mµ; B e C = 10 mµ. D - Microscopia ótica: amostra em água. Barra = 40 µm.

A reticulação com glutaraldeído promoveu alterações na morfologia dos materiais obtidos pela secagem das micropartículas em estufa. Apesar de todas as amostras apresentarem-se aglomeradas, o aumento do grau de reticulação (aumento da concentração X aumento do tempo de reação) permitiu a definição gradativa das estruturas esféricas das micropartículas nos fragmentos de aglomerados.

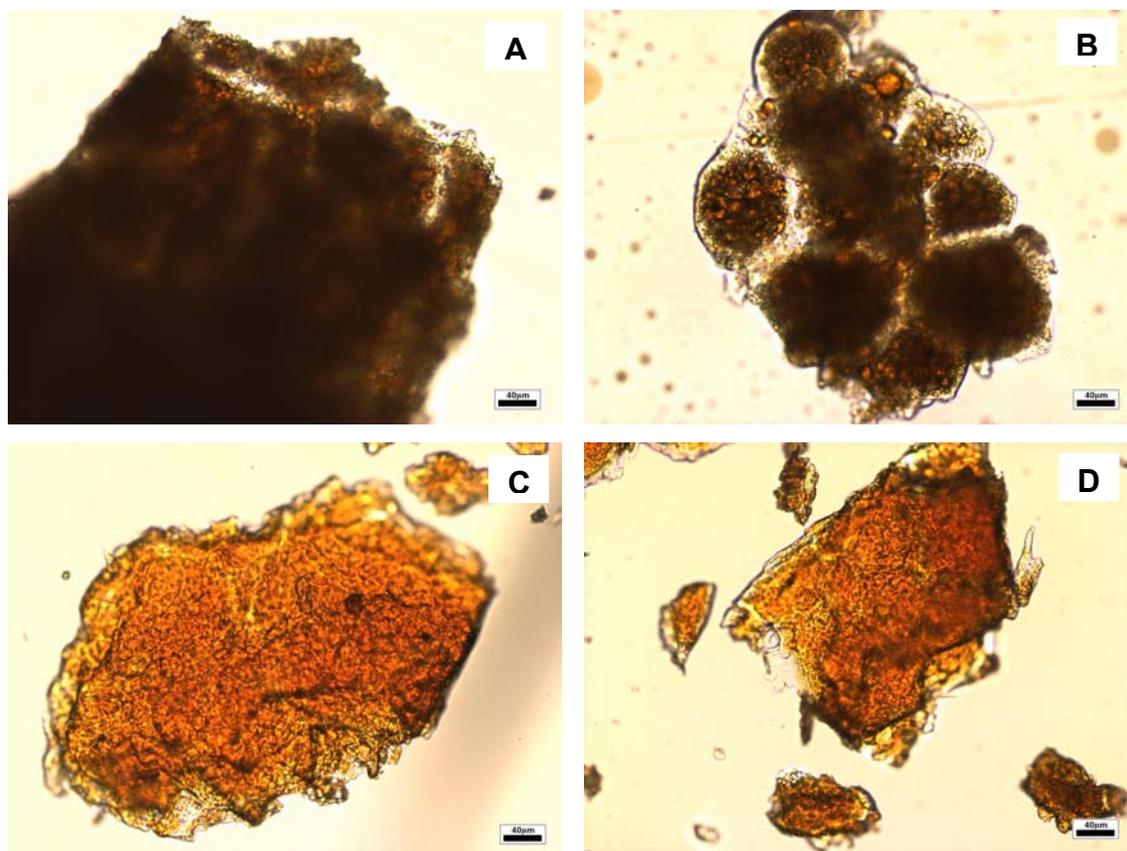
Nas condições mais brandas de reticulação (Figura 43), as amostras tratadas com 0,25mM de glutaraldeído por três horas ou *por 18 horas*, apresentaram formas arredondadas nas superfícies dos fragmentos de material seco, indicando integridade parcial das micropartículas. Nos aumentos maiores

(Figura 43 C e D), são observados novamente a estrutura matricial e os sulcos nas partes internas das estruturas.



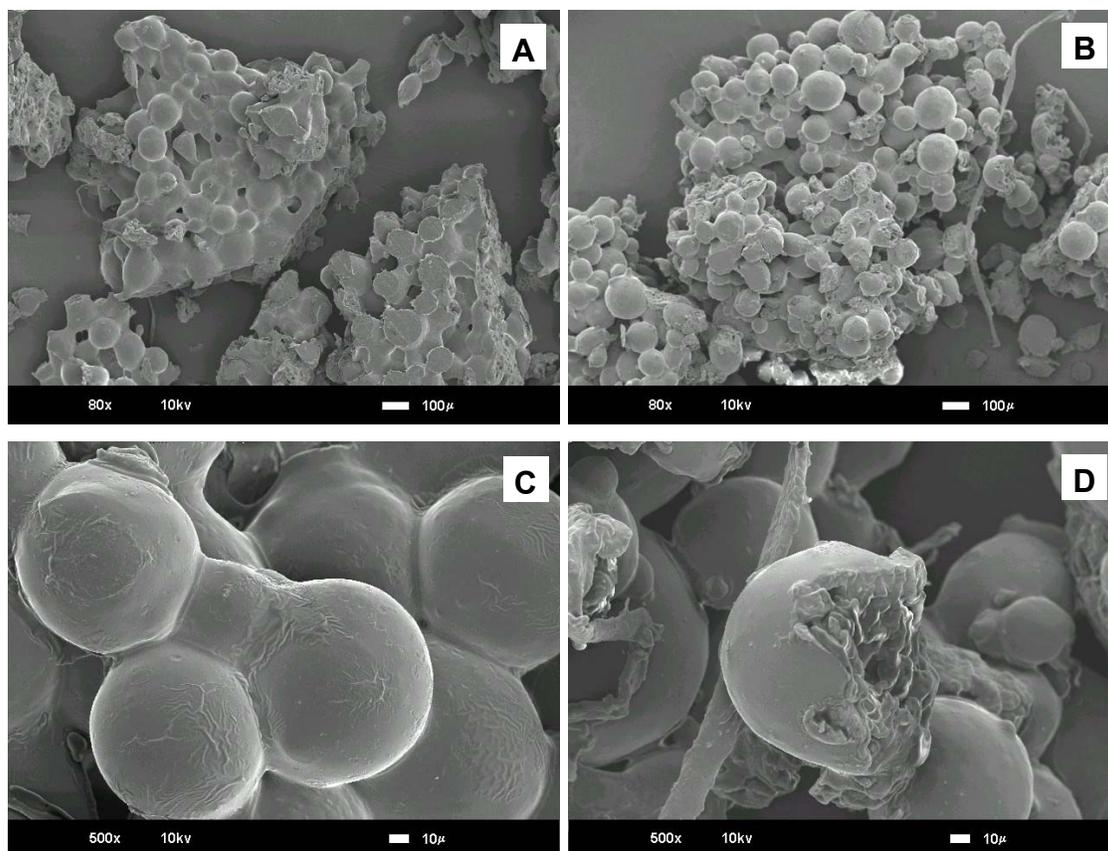
**Figura 43:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído (0,25mM por g de proteína) por três horas (A e C) ou *por 18 horas* (B e D), secas em estufa. Barras: A e B = 100 μm, C e D = 10 μm.

A Figura 44 apresenta aspectos da re-hidratação (A e B) e da captação de imagens em glicerina das amostras secas em estufa das micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído (0,25mM/g.ptn) por três horas ou *por 18 horas*, observando-se novamente a perda da estrutura individual das micropartículas. Para a reticulação *por 18 horas* (Figura 44 – B), pode-se ver o contorno das partículas no filme formado.



**Figura 44:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído (0,25mM/g.ptn) por três horas (A – captação em água, C – captação em glicerina) ou por 18 horas (B – captação em água, D – captação em glicerina), secas em estufa. Barras = 40  $\mu$ m.

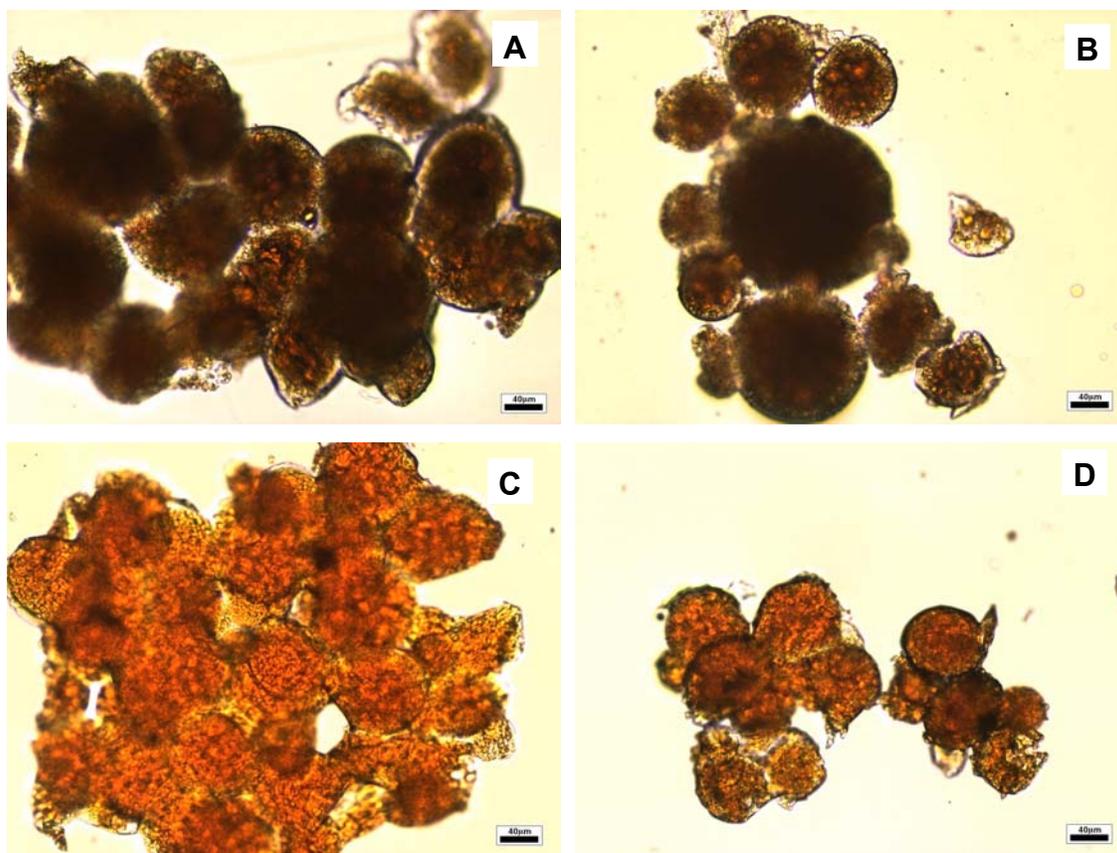
As amostras com maior grau de reticulação (glutaraldeído 1,0mM/g.ptn com tempos de reação de três horas e por 18 horas), secas em estufa, têm sua morfologia apresentadas na Figura 45, onde é possível observar a nítida manutenção das formas esféricas das micropartículas para as duas condições de reticulação. As micropartículas apresentam-se aglomeradas para as duas amostras, o que não permitiu a separação das mesmas. No tratamento de reticulação pelo período de 18 horas (Figura 45 – B), as micropartículas podem ser identificadas quase totalmente separadas.



**Figura 45:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído (1,0mM/g.ptn) por 3 horas (A e C) ou 18 horas (B e D), secas em estufa. Barras: A e B = 100  $\mu\text{m}$ , C e D = 10  $\mu\text{m}$ .

Detalhes da parte interna das micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído pelo período de 18 horas, secas em estufa, são apresentados na Figura 45 – D, onde podem ser observadas as estruturas matriciais e os mesmos tipos de sulcos vistos nas demais amostras (Figuras 42 e 43).

A re-hidratação das amostras secas (Figura 46 – A e B) e a observação em glicerina (Figura 46 – C e D) apresentam a manutenção da forma física das partículas, sendo que as micropartículas da amostra com maior tempo de reticulação (Figura 46 – B e D) parecem menos ligadas que a reticulada com três horas.



**Figura 46:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído (1,0mM/g.ptn) por três horas (A – captação em água, C – captação em glicerina) ou *por 18 horas* (B – captação em água, D – captação em glicerina), secas em estufa. Barras = 40 µm.

Em geral, o aumento na intensidade da reticulação com glutaraldeído diminui as propriedades de alongação de filmes de gelatina [Carvalho, 2002]. Nas micropartículas secas em estufa isso pôde ser observado pela diminuição gradativa da deformação das mesmas durante a secagem, com aumento da manutenção da esfericidade. A agregação excessiva, apresentada por todas as amostras, inviabiliza a utilização desse método na obtenção de produtos desidratados constituídos por micropartículas individualizadas. A obtenção de micropartículas coacervadas desidratadas e individuais é citada por Thies [1995] e Burgess & Ponsart [1998] como uma das limitações desse método de

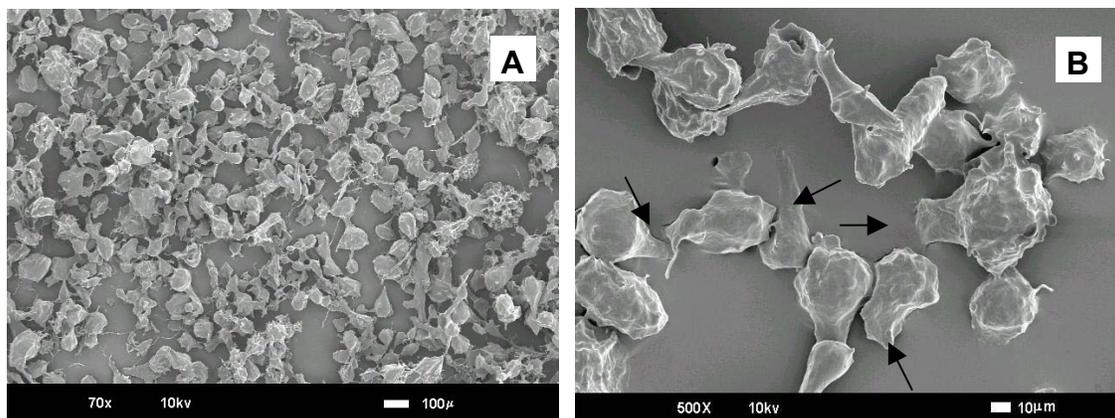
encapsulação, pois a agregação altera características funcionais das cápsulas, como o perfil de liberação do recheio.

#### *5.3.5.3.3.2. Secagem por liofilização*

No preparo das amostras de micropartículas coacervadas, com ou sem reticulação, para secagem por liofilização, foram testadas duas formas de congelamento. O congelamento lento foi feito em freezer (-18° C) e o congelamento rápido foi feito pela adição de nitrogênio líquido diretamente sobre a amostra acondicionada em placas de metal (diâmetro de 10 cm aproximadamente).

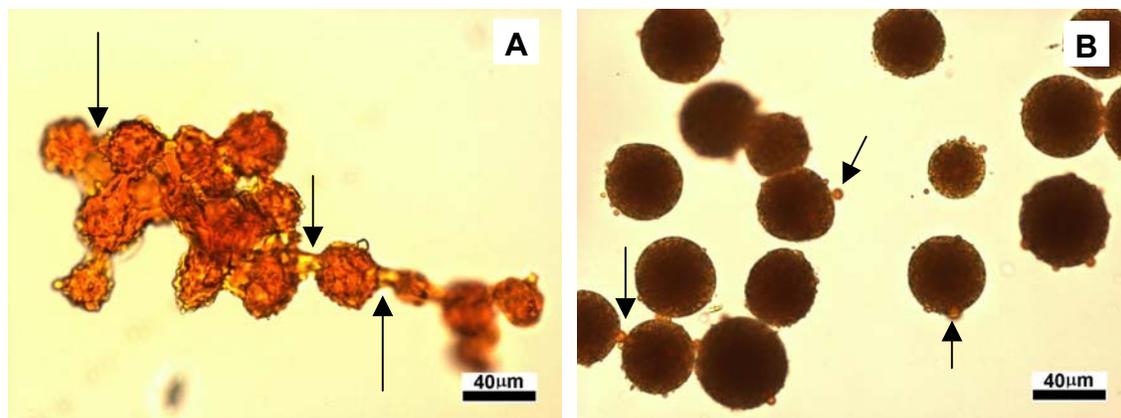
O congelamento lento resultou na produção de amostras desidratadas compostas de micropartículas com paredes contínuas, enquanto que o congelamento rápido, ocasionou na produção de micropartículas com paredes de aspecto irregular (morfologia apresentada no anexo 4). Dessa forma o congelamento lento foi escolhido para produção das micropartículas coacervadas sem reticulação, reticuladas com glutaraldeído (1,0mM e 0,1mM/g.ptn) ou transglutaminase (10U/g.ptn pelos tempo de reação de 18 horas) usadas na determinação do perfil de liberação de oleoresina de páprica.

A Figura 47 apresenta a microscopia eletrônica de varredura de micropartículas coacervadas sem reticulação, secas por liofilização. As partículas assemelham-se à uma forma esférica, apresentando muitas arestas nas superfícies (Figura 47 – B, setas pretas).



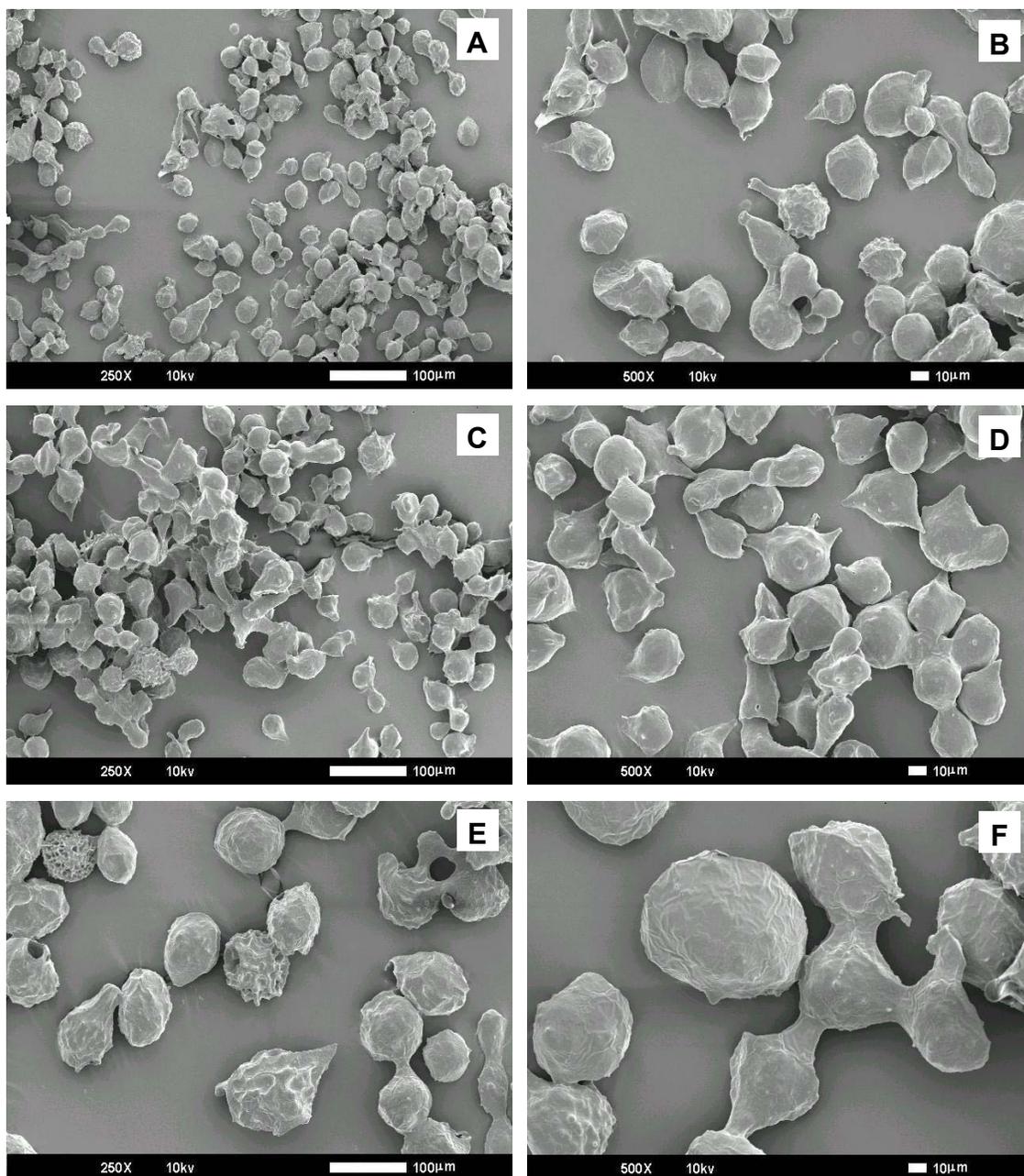
**Figura 47:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas coacervadas sem reticulação secas por liofilização (congelamento lento =  $-18^{\circ}$  C). Barras: A = 100  $\mu$ m e B = 10  $\mu$ m. Setas pretas em B – pontas nas partículas.

A Figura 48 apresenta a morfologia das microcápsulas sem reticulação, re-hidratadas (B) e com captação em glicerina (A). Como observado na Figura 47, o aspecto das micropartículas coacervadas liofilizadas é esférico, com uma espécie de “cauda” aparecendo em diversas unidades (Figura 48 – A, setas pretas). A re-hidratação ocorreu com sucesso (Figura 48 – B), restituindo a forma esférica das micropartículas e mantendo um aspecto muito semelhante à amostra úmida original (Figura 41 – A). Foi possível observar a presença de gotas de recheio para fora das partículas após a re-hidratação (Figura 48 – B setas pretas), o que pode ter contribuído para o efeito *burst* apresentado na liberação da oleoresina.



**Figura 48:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas sem reticulação secas por liofilização. A – micropartículas liofilizadas (captação em glicerina, setas pretas = pontas nas partículas); B – micropartículas rehidratada (captação em água, setas pretas – recheio não encapsulado). Barras = 40 µm.

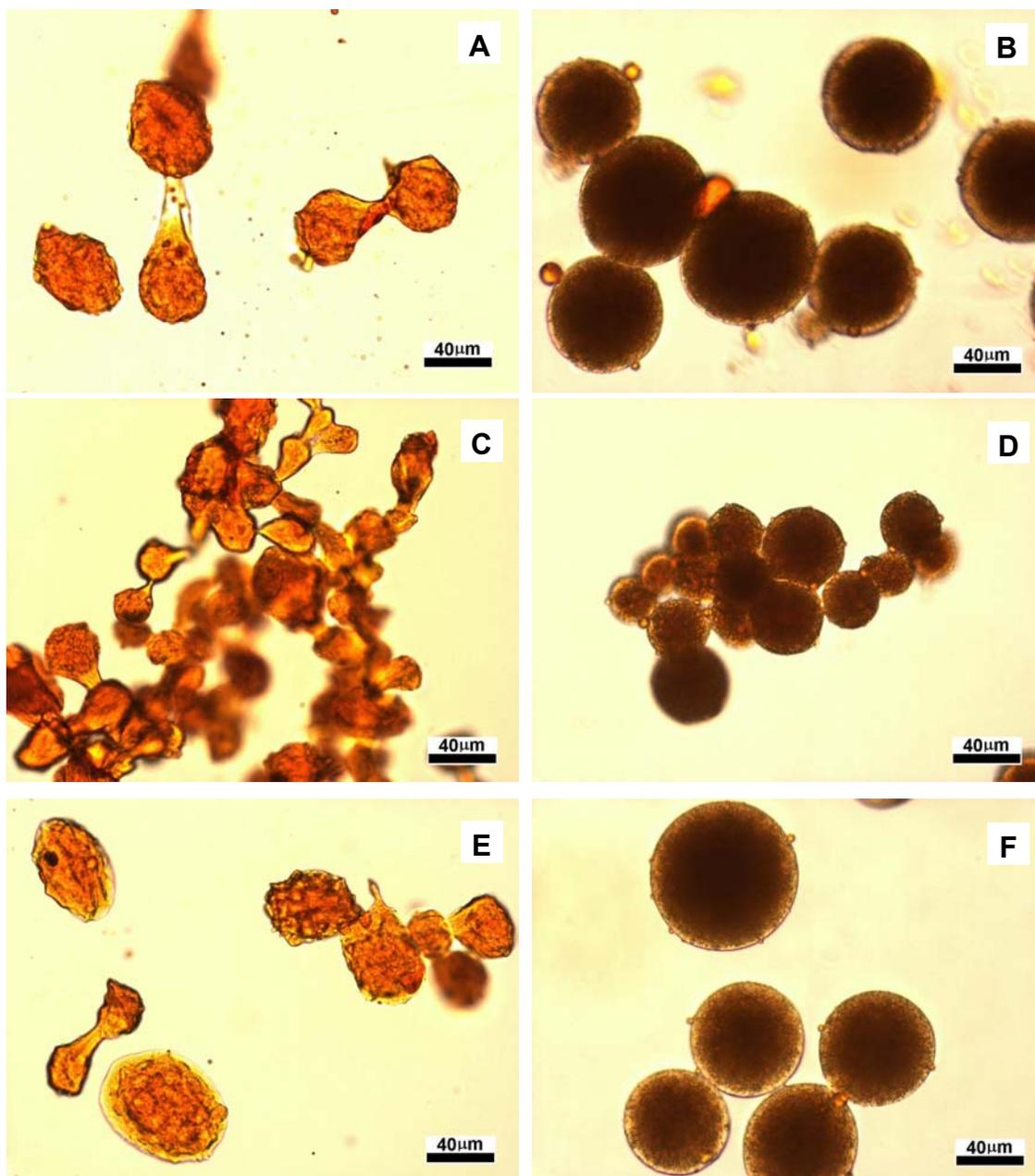
A Figura 49 apresenta as microscopias eletrônicas de varredura das amostras reticuladas com glutaraldeído (0,1mM/g ptn – A e B e 1,0mM/g ptn – C e D, 18 horas) ou transglutaminase (10U/g ptn – E e F, 18 horas). As reticulações das micropartículas, com qualquer dos reticulantes, seguidas de liofilização, não alterou significativamente suas estruturas, que apresentaram aparência similar à amostra sem reticulação, com forma próxima à esférica e observando-se deformações ao longo da parede e a presença de pontas em algumas partículas. Mudanças significativas de morfologia foram observadas por **Polk et al. [1994]** para micropartículas de quitosana-alginato, que ao serem desidratadas por solvente, perderam parte da esfericidade, apresentando pontas.



**Figura 49:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas coacervadas secas por liofilizador: reticuladas com glutaraldeído (A e B – 0,1mM/g.ptn; C e D – 1,0mM/g.ptn) e com transglutaminase (E e F – 10U/g.ptn). Período de reação de 18 horas. Barras: A, C e E = 100µm; B, D e F = 10 µm.

A Figura 50 apresenta as microscopias óticas das amostras reticuladas com glutaraldeído (0,1mM/g.ptn – A e B e 1,0mM/g.ptn – C e D, 18 horas) ou

transglutaminase (10U/g.ptn – E e F, 18 horas) liofilizadas e re-hidratadas (10 minutos).



**Figura 50:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas secas por liofilização e re-hidratadas, reticuladas com glutaraldeído (0,1mM/g.ptn: A – captação em glicerina e B – captação em água; 1,0mM/g.ptn: C – captação em glicerina e D – captação em água) e com transglutaminase (10U/g.ptn: E – captação em glicerina e F – captação em água). Período de reação de 18 horas. Barras = 40 µm.

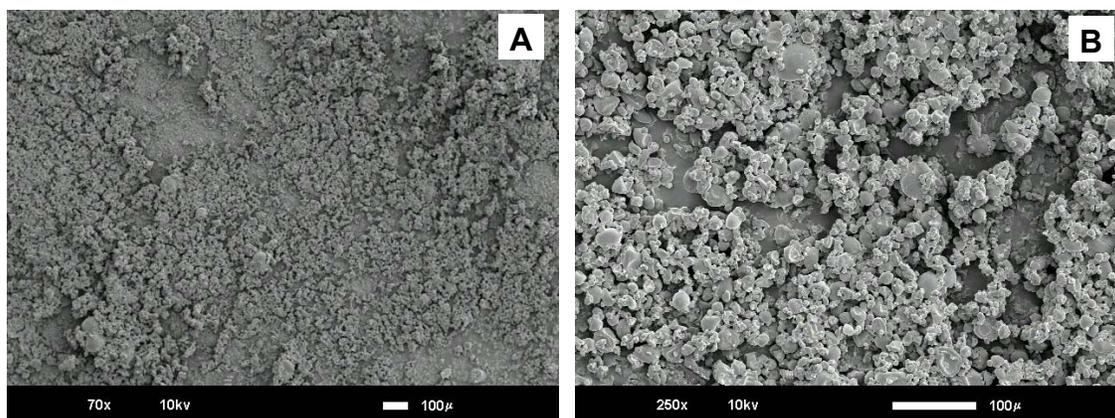
Aparentemente o processo de secagem por liofilização causou pouco dano à estrutura da matriz das micropartículas reticuladas, pois na re-hidratação (Figura 50 – B, D e F) todas as amostras readquiriram a forma esférica do material original (Figura 41 – B, C e D). A variação de tamanho entre as micropartículas das amostras secas e das re-hidratadas pode ser observada por microscopia ótica (Figura 50). A presença de recheio para fora das partículas em todos os materiais pode ter contribuído para incrementar o efeito *burst*, observado na liberação da oleoresina e discutido na próxima sessão.

**Mukai-Corrêa et al. [2005]** desidrataram, por liofilização, micropartículas produzidas por gelificação iônica, obtendo amostras similares às apresentadas nesse trabalho. Os autores também relatam a boa re-hidratação das partículas, com recuperação parcial da forma original.

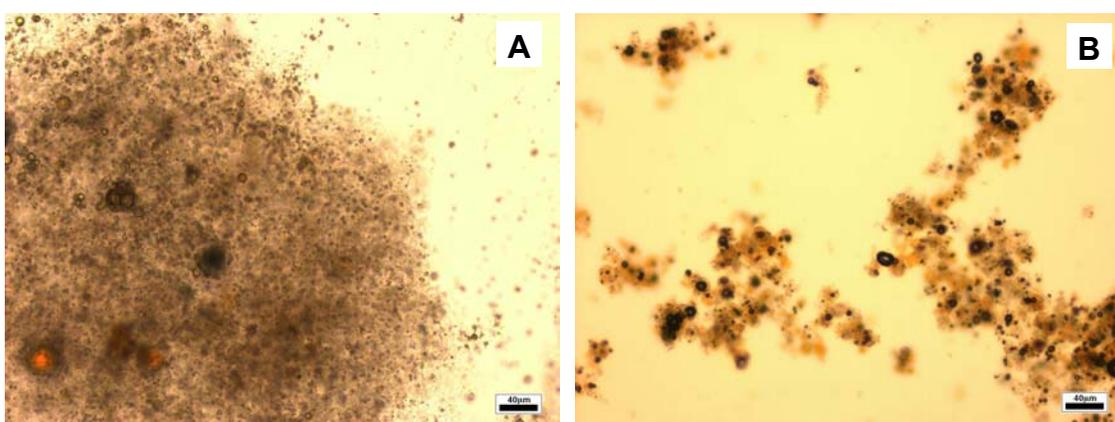
#### 5.3.5.3.3.3. Secagem em *Spray dryer*.

A morfologia das micropartículas coacervadas sem reticulação, reticuladas com glutaraldeído nas concentrações de 0,1mM/g.ptn, 0,25mM/g.ptn e 1,0mM/g.ptn ou com transglutaminase na concentração de 10U/g.ptn desidratadas por *spray dryer* e re-hidratadas em água são apresentadas a seguir. Os tempos de reação testados para as condições de reticulação com glutaraldeído nas concentrações de 0,25mM/g.ptn e 1,0mM/g.ptn foram de três horas e de 18 horas. Para reticulação com glutaraldeído na concentração de 0,1mM/g.ptn e transglutaminase o tempo de reticulação foi de 18 horas.

A Figura 51 apresenta a microscopia eletrônica de varredura das micropartículas coacervadas sem reticulação desidratadas em *spray dryer*. Na seqüência, a Figura 52 apresenta o aspecto da mesma amostra observada por microscopia ótica com captação em água (Figura 52 – A) e em glicerina (Figura 52 – B).



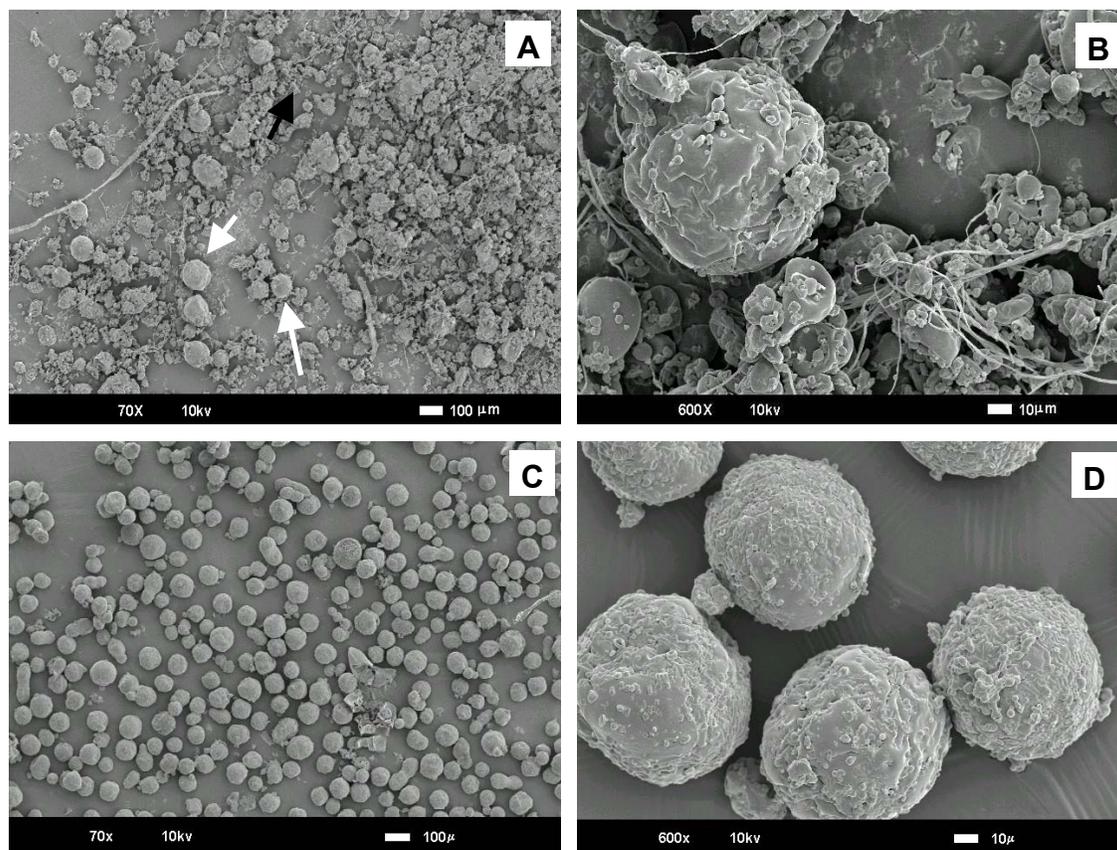
**Figura 51:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas coacervadas sem reticulação secas em *spray dryer*. A – aumento de 70 vezes; B – aumento de 250 vezes. Barras = 100 µm.



**Figura 52:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas sem reticulação secas em *spray dryer* (A – captação em água, B – captação em glicerina). Barras = 40 µm.

As microscopias eletrônicas de varredura e as microscopias óticas das Figuras 51 e 52 mostram o efeito da secagem em *spray dryer* em micropartículas coacervadas sem reticulação. O processamento desfez a estrutura das partículas que apresentam inicialmente o aspecto mostrado na Figura 41 – A. **Burgess & Ponsart [1998]** citam a exposição à alta temperatura e estresse mecânico, produzido pela atomização sob pressão (duplofluido), como responsáveis pela destruição da estrutura de partículas coacervadas úmidas secas por *spray dryer*.

A reação de reticulação permitiu a manutenção da integridade das micropartículas, embora sendo observado que o nível de integridade apresentou relação direta com o grau de reticulação das amostras.



**Figura 53:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído com tempo de reação de três horas secas em *spray dryer*. A e B = 0,25mM/g.ptn; C e D: 1,0mM/g.ptn. Barras: A e C = 100 μm, B e D = 10 μm. Setas brancas – partículas coacervadas desidratadas íntegras. Setas pretas – partículas destruídas.

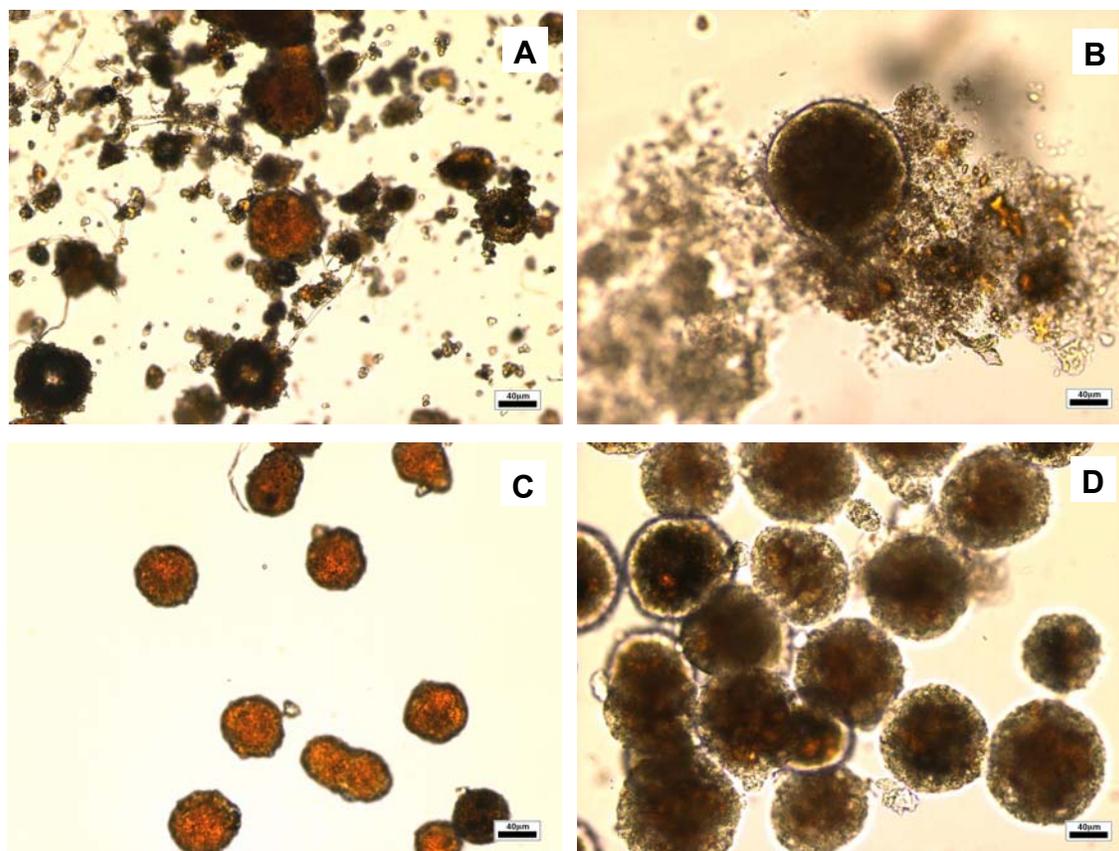
Para o tempo de reação com glutaraldeído de três horas (Figura 53), observou-se que o aumento da concentração desse reticulante de 0,25mM/g.ptn para 1,0mM/g.ptn, resultou em uma melhora significativa da integridade das micropartículas. A Figura 53 (A) apresenta tipos de estruturas variadas, podendo se observar algumas micropartículas íntegras (setas brancas) e uma grande quantidade de partículas menores (setas pretas) correspondendo a pedaços de

partículas rompidas que, após a secagem, formaram pequenas partículas. Por outro lado, a Figura 53 (C) apresenta um grande número de micropartículas íntegras e com alta esfericidade.

A microscopia ótica das micropartículas reticuladas com glutaraldeído com tempo de reação de três horas nas concentrações de 0,25mM/g.ptn e 1,0mM/g.ptn desidratadas em spray dryer com observação em glicerina e re-hidratadas em água é apresentada na Figura 54.

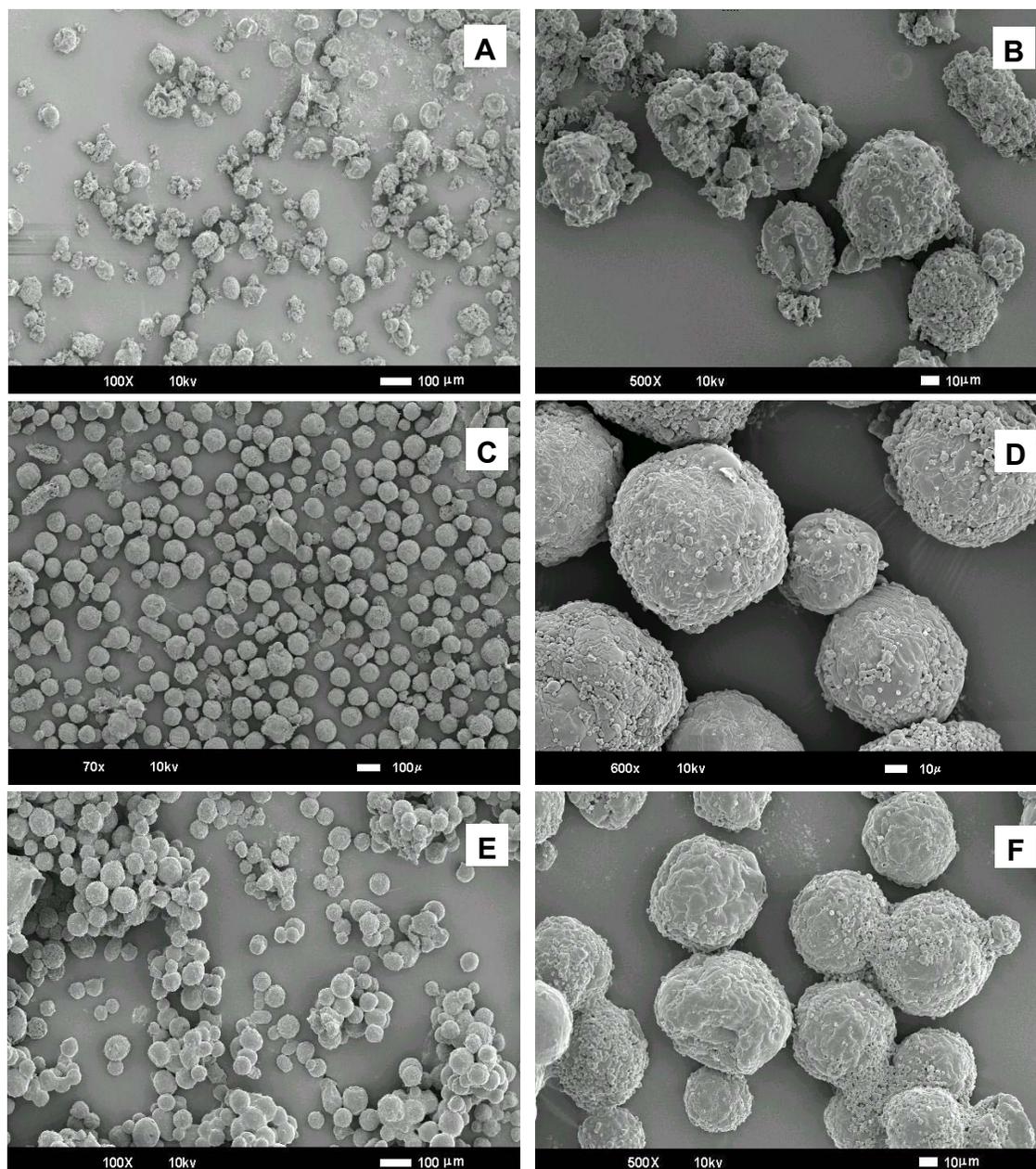
A captação das amostras em glicerina permite observar novamente o grau de integridade das micropartículas com a amostra reticulada com 0,25mM/g.ptn (Figura 54 A), apresentando algumas partículas íntegras e diversos pedaços de parede desidratados. A amostra reticulada com 1,0mM/g.ptn (Figura 54 C) apresenta diversas partículas íntegras, como já constatado nas microscopias eletrônicas de varredura.

A re-hidratação das micropartículas ocorreu com pouca alteração do aspecto das mesmas, comparado às obtidas com os materiais úmidos originais. As micropartículas desidratadas que permaneceram íntegras readquiriam a forma esférica com a absorção de água. O material remanescente da destruição de parte das micropartículas durante a secagem por spray dryer foi observado como aglomerados amorfos (Figura 54 – B) aparecendo em maior quantidade na amostra menos íntegra, reticulada com 0,25mM/g.ptn, do que na amostra que manteve maior integridade, reticulada com 1,0mM/g.ptn de glutaraldeído.



**Figura 54:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído com tempo de reação de três horas secas em *spray dryer*: A (captação em glicerina) e B (captação em água) = 0,25mM/g.ptn; C (captação em glicerina) e D (captação em água): 1,0mM/g.ptn. Barras: = 40 m $\mu$ .

As microscopias eletrônicas de varredura das micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído para um período de reação de 18 horas são apresentadas na Figura 55. As concentrações utilizadas foram de 0,1mM/g.ptn, 0,25mM/g.ptn e 1,0mM/g.ptn.

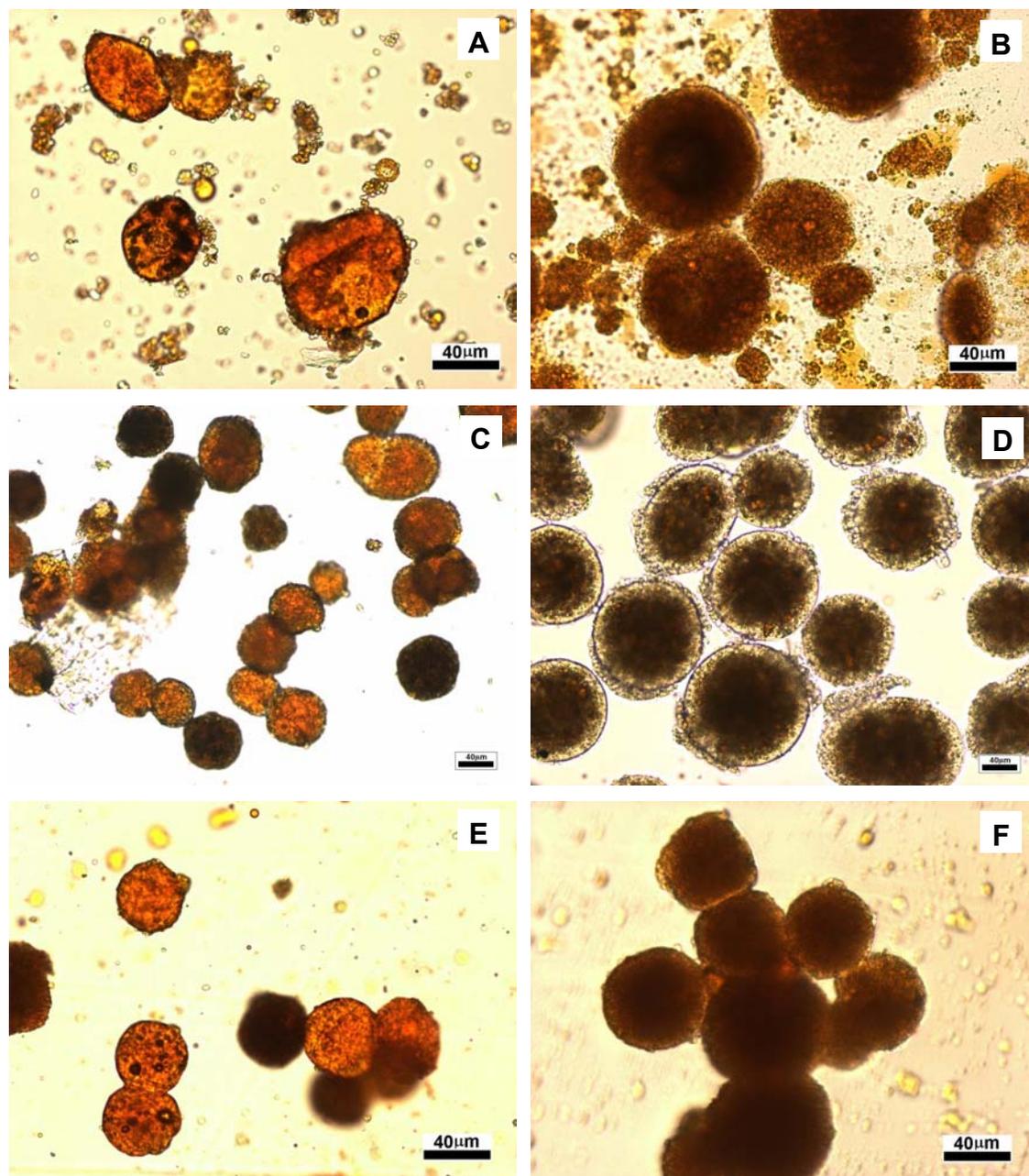


**Figura 55:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído com tempo de reação de 18 horas secas em *spray dryer*. A e B = 0,1mM/g.ptn; C e D: 0,25mM/g.ptn; E e F = 1,0mM/g.ptn. Barras: A, C e E = 100 µm, B, D e F = 10 µm.

A reticulação com glutaraldeído pelo tempo de reação de 18 horas apresentou eficiência na manutenção da estrutura das partículas durante a secagem em *spray dryer* proporcional à concentração utilizada desse reticulante, em todos os tratamentos.

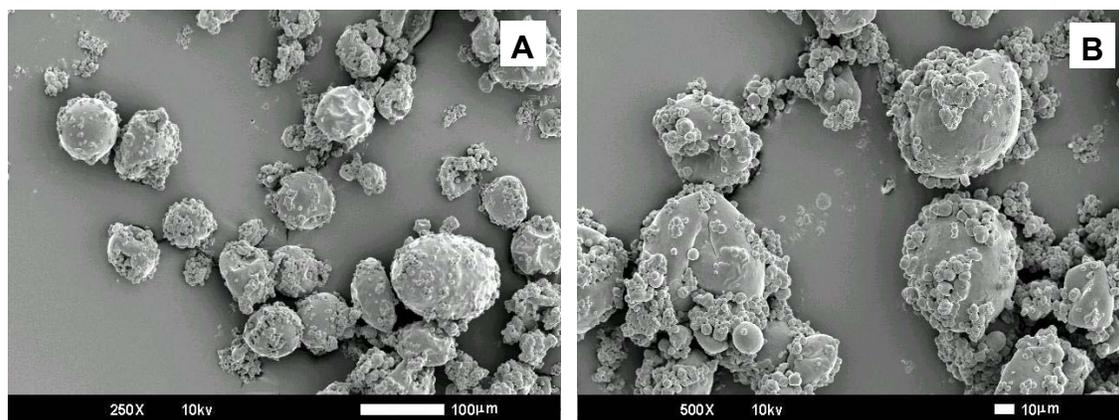
Com a menor concentração (0,1mM/g.ptn) poucas partículas se mantiveram integras, observando-se a presença de partículas menores, que são provavelmente pedaços de material rompido durante a secagem (Figura 55 A e B). Nos demais tratamentos, a forma esférica das micropartículas foi mantida com a amostra em maior concentração (1,0mM/g.ptn) apresentando início de aglomeração entre as micropartículas.

A re-hidratação das micropartículas reticuladas com glutaraldeído com tempo de reação de 18 horas desidratadas em *spray dryer* ocorreu com sucesso como mostrado nas Figuras 56 (B, D e F). O aspecto das mesmas foi restituído para próximo dos materiais originais. A re-hidratação também confirmou a manutenção ou destruição da integridade das micropartículas com o aumento crescente da concentração de glutaraldeído pela presença de grande quantidade de recheio em suspensão na menor concentração do reticulante (0,1mM/g.ptn) e diminuição gradativa de óleo não encapsulado com o aumento do grau de reticulação.



**Figura 56:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas reticuladas com glutaraldeído com tempo de reação de 18 horas secas em *spray dryer*: 0,1mM/g.ptn: A (captação em glicerina) e B (captação em água); 0,25mM/g.ptn: C (captação em glicerina) e D (captação em água) e 1,0mM/g.ptn: E (captação em glicerina) e F (captação em água). Barras: = 40 µm.

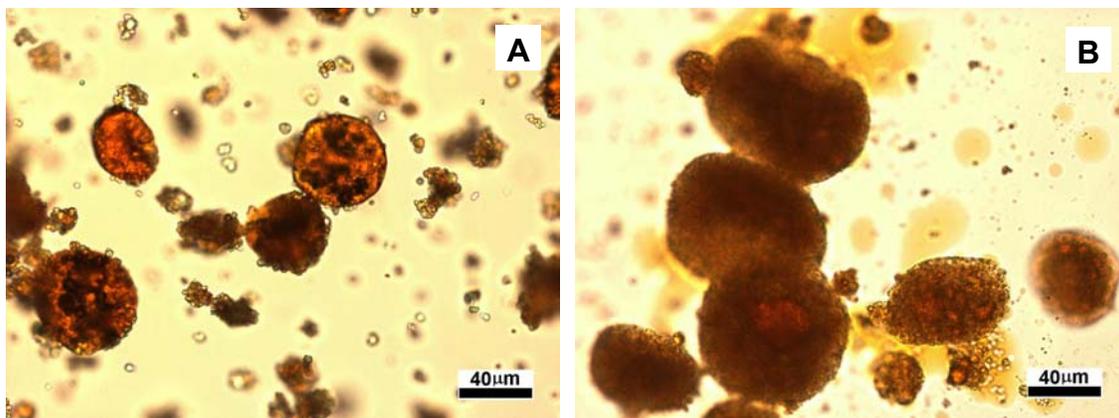
As microscopias eletrônicas de varredura de micropartículas coacervadas reticuladas com transglutaminase, na concentração de 10U/g.ptn, com tempo de reação de 18 horas, desidratadas por spray dryer são apresentadas na Figura 57.



**Figura 57:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de partículas reticuladas com transglutaminase (10U) desidratadas em *spray dryer*. A – 250X (barra = 100µm); B – 500X (barra = 10µm).

A reticulação com transglutaminase não foi muito eficiente na manutenção da estrutura das micropartículas coacervadas, podendo se observar algumas partículas visivelmente íntegras, cercadas de partículas menores, referentes ao material provavelmente destruído durante a secagem, com aspecto semelhante ao da amostra de micropartículas desidratadas, reticulada com glutaraldeído, na concentração de 0,1mM/g.ptn (Figura 55 A e B).

A microscopia ótica de micropartículas coacervadas reticuladas com transglutaminase (10u/g.ptn, 18 horas) desidratadas em spray dryer apresentou boa esfericidade para as micropartículas que permaneceram íntegras durante a secagem (Figura 58 – A). Essas micropartículas íntegras re-hidrataram adequadamente, adquirindo aparência similar à da amostra úmida original (Figura 41 – B). No entanto, a desestruturação e destruição de parte das micropartículas dessa amostra ficam evidentes pela grande quantidade de recheio não encapsulado observado em suspensão na Figura 58 (B).

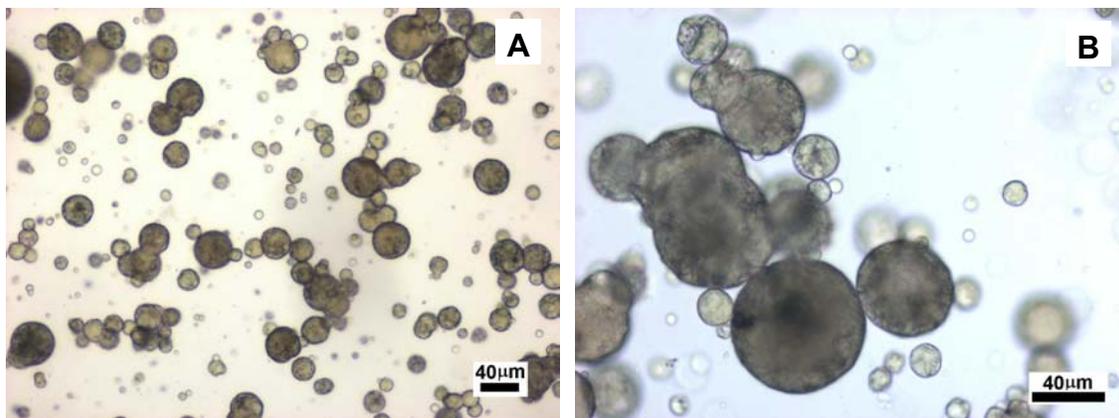


**Figura 58:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas reticuladas com transglutaminase (10u/g.ptn, 18 horas) desidratadas em spray dryer: A (captação em glicerina) e B (captação em água). Barras = 40 µm.

**Carvalho [2002]** avaliou a resistência mecânica de filmes de gelatina reticulados com glutaraldeído e transglutaminase, observando para um mesmo grau de reticulação que essa resistência era mais forte nas ligações promovidas pelo reticulante químico que pela enzima. Essa força de reticulação, associada a estequiometria, justifica a maior integridade apresentada pelas partículas reticuladas com o glutaraldeído na concentração de 1,0 mM/g ptn.

*5.3.5.3.4. Obtenção de micropartículas coacervadas contendo compostos hidrofílicos (recheio: glicose e isolado protéico de soro de leite) – micropartículas lipídicas e seus coacervados.*

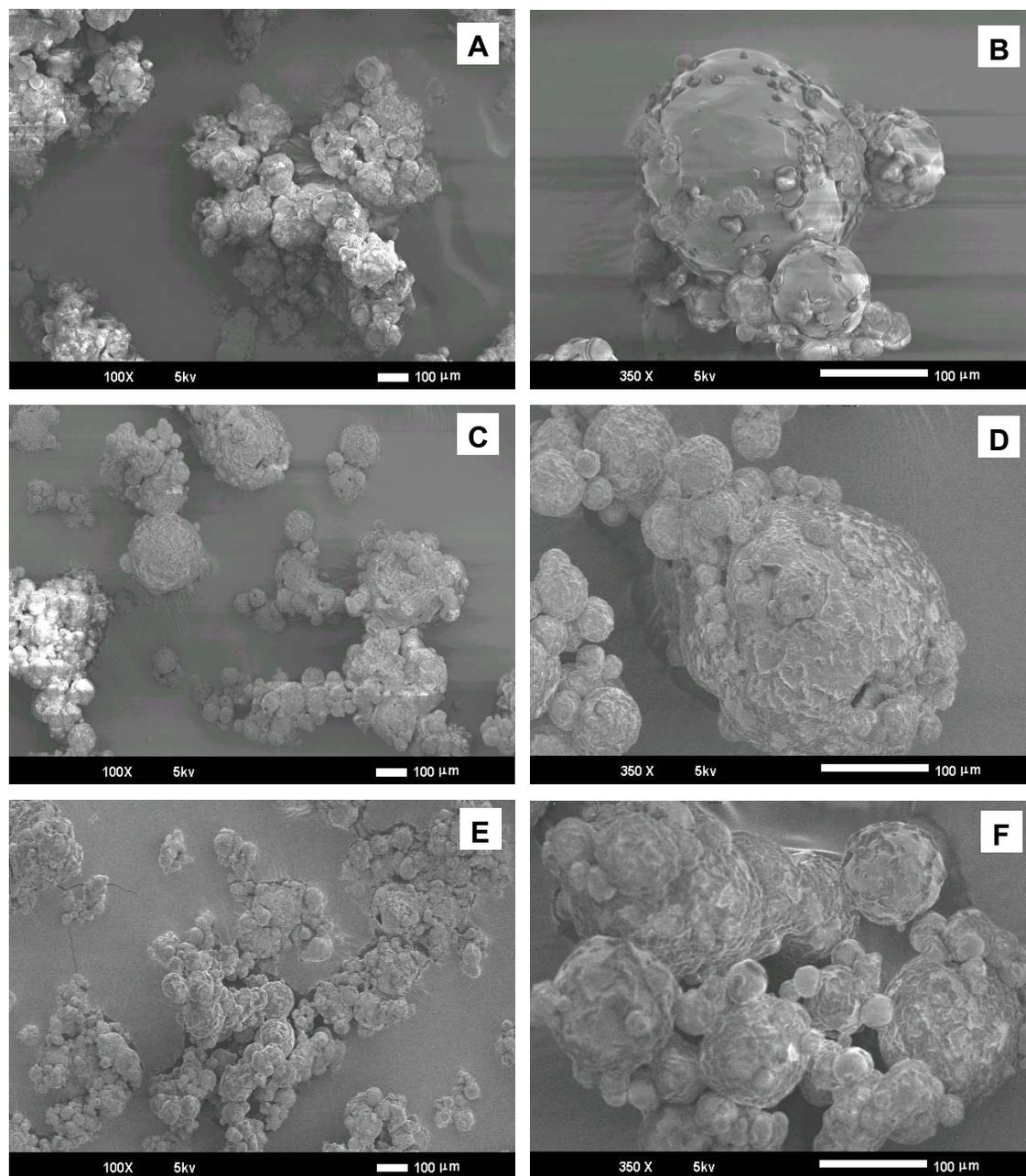
A microscopia ótica da Figura 64 apresenta micropartículas lipídicas contendo glicose produzidas no atomizador do *spray dryer* dispersas em glicerina para captação das imagens. Essas micropartículas apresentaram forma esférica e aspecto muito parecido com partículas desidratadas obtidas no uso convencional do equipamento (capítulo 4 – Figura 17).



**Figura 59:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas lipídicas contendo glicose. A – Aumento de 10x (barra = 40 µm); B: Aumento de 20x (barra = 40 µm).

As micropartículas produzidas se apresentaram aglomeradas e compactadas em alguns tratamentos. Não foi observada diferença morfológica entre as MPLs contendo proteína ou glicose.

A Figura 60 apresenta a microscopia eletrônica de varredura das micropartículas lipídicas sem recheio e contendo glicose ou proteína.



**Figura 60:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas lipídicas. Sem recheio (A e B ); Contendo glicose (C e D); Contendo proteína (E e F). Barras = 100 µm.

As micropartículas lipídicas aparecem aglomeradas em decorrência do manuseio e da permanência em temperatura ambiente no preparo dos stubs. Entretanto, apresentam ainda forma esférica, como visto na microscopia ótica.

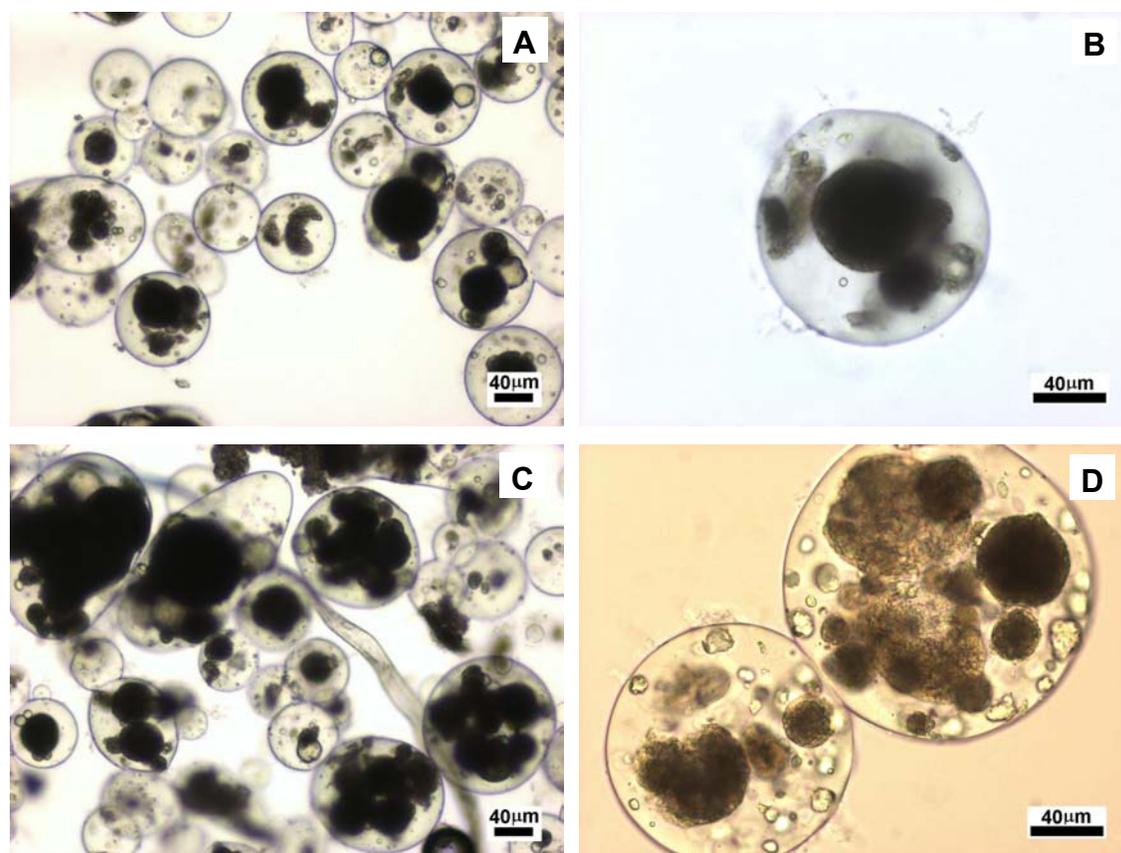
A microscopia eletrônica de varredura foi relativamente difícil de ser realizada nessas micropartículas lipídicas pois a parede hidrofóbica prejudica a aderência da camada de ouro sobre a superfície das mesmas, que também sofrem fortes deformações com a incidência do laser, mesmo em curto período de tempo. A diminuição da intensidade do laser de 10kv para 5kv e a captação das imagens com menor definição em velocidade mais rápida, permitiu a obtenção das imagens mostradas na Figura 60.

Como observado para microscopia ótica, não houve diferenças significativas no aspecto das micropartículas para todas as amostras.

**Barbosa et al. [2004]** apresentaram em seu trabalho microscopia eletrônica de varredura de lipoesferas contendo caseína com aspecto parecido com as obtidas nesse trabalho.

A microscopia ótica dos coacervados contendo micropartículas lipídicas confirmou a formação de partículas esféricas contendo as partículas sólidas de gordura. A Figura 61 mostra micropartículas coacervadas recobrimo micropartículas lipídicas contendo glicose (A e B) e proteína (C e D).

A distribuição heterogênea das micropartículas lipídicas dentro dos coacervados pode ser observada na Figura 61 (A e C) com coacervados carregados de micropartículas lipídicas e outros praticamente vazios. Essa distribuição heterogênea de recheio indica condições não otimizadas de produção dos coacervados para esse tipo de recheio, principalmente na etapa de dispersão das micropartículas lipídicas na solução de gelatina. A adição da solução de SDS melhorou a dispersão, mas não o suficiente para uniformizar a distribuição das micropartículas lipídicas nos coacervados.

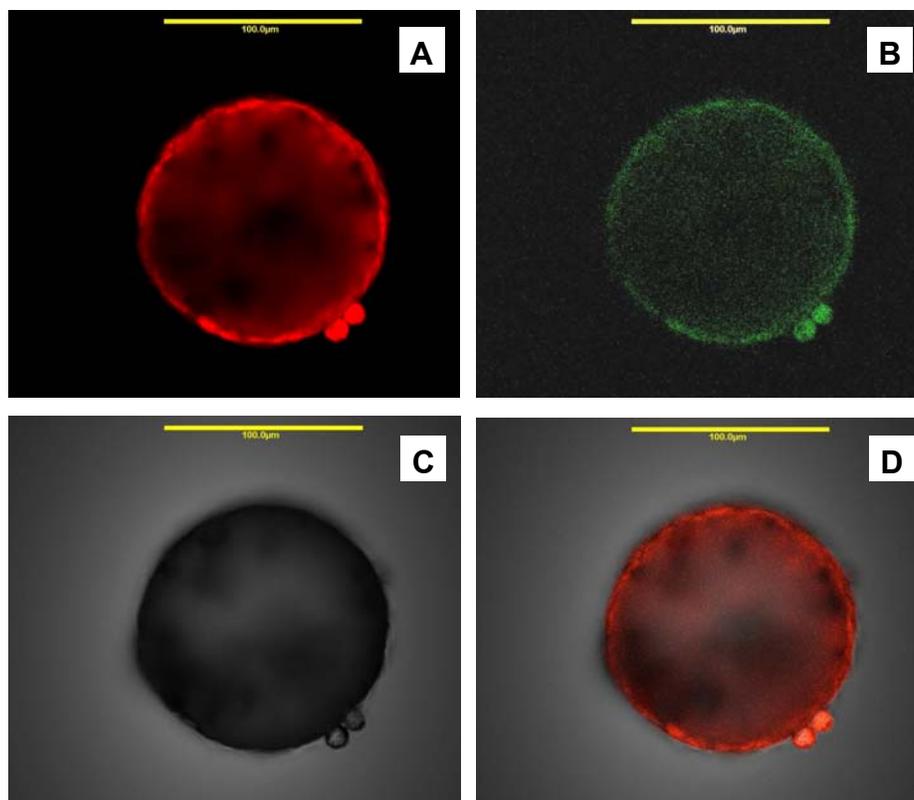


**Figura 61:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas contendo micropartículas lipídicas. A e B: Coacervados contendo MPL-GLI; C e D: Coacervados contendo MPL-PTN (C: 10X, D: 20X). As barras correspondem a 40  $\mu\text{m}$ .

A encapsulação de partículas sólidas de fármacos por **Remunán-Lopez & Bodmeier [1996]** em micropartículas coacervadas de gelatina-quitosana produziram amostras muito semelhantes às obtidas nesse trabalho.

A morfologia interna das micropartículas lipídicas não pôde ser observada por microscopia ótica nem por microscopia eletrônica de varredura, pois as micropartículas de gordura não suportaram cortes. Como já descrito anteriormente, a microscopia confocal é uma técnica não destrutiva de observação, baseada na fluorescência em diversos comprimentos de onda de marcadores capazes de se associarem com os compostos de interesse. Para as micropartículas lipídicas contendo proteína e seus coacervados essa técnica se

mostrou muito adequada para avaliação das morfologias internas dessas estruturas apresentadas nas Figuras 62 e 63.



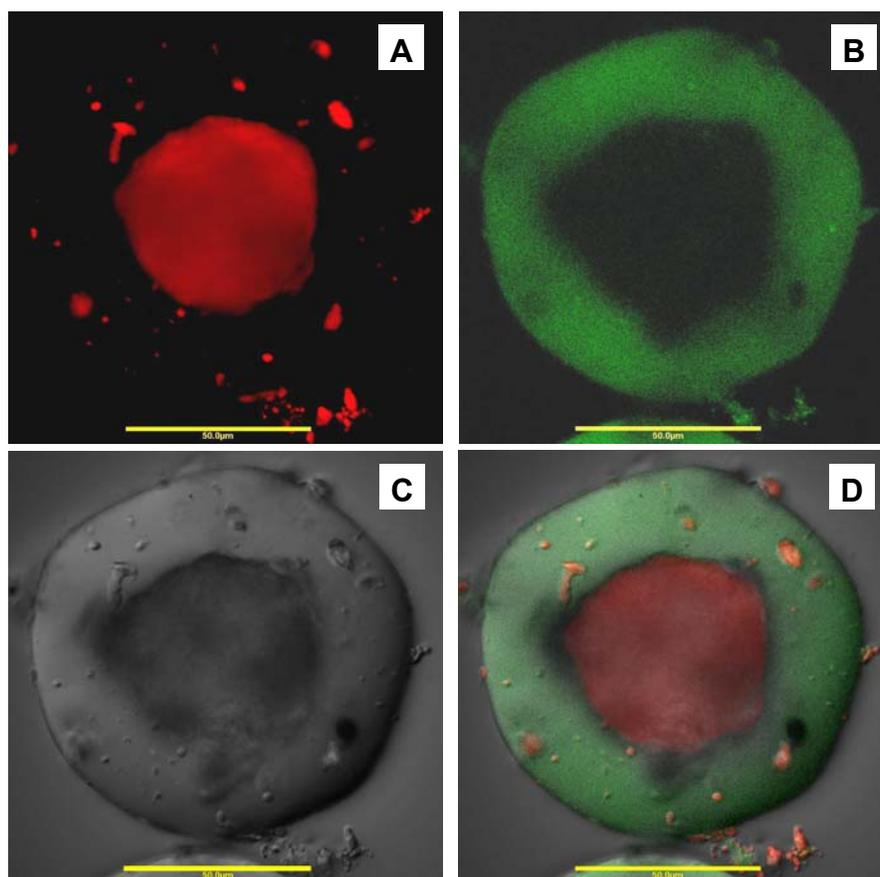
**Figura 62:** Imagens obtidas por Microscopia confocal de micropartículas lipídicas contendo proteínas: A - Mistura lipídica marcada com *Nile Red*; B – proteína marcada com FITC; C – imagem DIC, D – composição de A e C com imagem DIC. Barras = 50  $\mu\text{m}$ . Observação e captação das imagens em aproximadamente metade da altura da micropartícula.

Para as micropartículas lipídicas (Figura 62) pode se observar que a mistura lipídica é a parte contínua do sistema. A proteína apresenta-se dispersa por toda matriz, desde o centro até a borda. Essa distribuição pode explicar comportamentos dos perfis de liberação, já que o material localizado na parte mais externa fica mais exposto ao solvente, enquanto que o material localizado mais internamente fica mais protegido pela barreira hidrofóbica da matriz.

As microscopias óticas e microscopias eletrônicas de varredura apresentaram as micropartículas lipídicas com aparências externas similares às

partículas convencionais produzidas por secagem no atomizador. A microscopia confocal permitiu observar que, na verdade, elas são diferentes pois partículas produzidas na secagem por *spray dryer*, em geral, apresentam uma parte central vazia devido a um movimento de contração e dilatação da gota atomizada durante a evaporação do solvente durante a secagem. As micropartículas lipídicas não apresentaram essa característica, se mostrando densas em toda sua extensão.

Os coacervados contendo as micropartículas lipídicas observados pela microscopia confocal (Figura 63), apresentaram as partículas lipídicas distribuídas pela estrutura da partícula e circundadas por uma densa matriz protéica, evidência de estrutura tipo matriz (esponja) dos coacervados produzidos.



**Figura 63:** Imagens obtidas por Microscopia confocal de coacervados contendo micropartículas lipídicas contendo proteínas: A – Mistura lipídica marcada com *Nile Red*; B – Gelatina da parede do coacervada marcada com FITC; C – imagem DIC; D – composição de A e B com imagem DIC. Barras = 50 µm. Observação e captação das imagens em aproximadamente metade da altura da micropartícula.

### **5.3.6. Perfis de liberação de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos de micropartículas coacervadas.**

#### **5.3.6.1. Liberação de composto hidrofóbico (oleoresina de páprica)**

##### *5.3.6.1.1. Liberação de oleoresina de micropartículas coacervadas úmidas e liofilizadas.*

A quantificação da oleoresina livre foi feita com sucesso por leitura direta da fração liberada em espectrofotômetro a 452nm. A absorbância para leitura das amostras foi determinada após a varredura das soluções da curva padrão na faixa de 700 a 290nm. Os espectros obtidos nessas varreduras foram característicos para oleoresina com o valor de 452nm, constando de todas as concentrações. **Gregory et al. [1987]** apresentaram picos máximos de absorbância em 452 e 470nm, associando-os ao *beta*-caroteno e a capsaxantina, respectivamente, contidos em extratos de pimentas vermelhas. Absorbâncias entre 410 e 510nm são associadas aos carotenóides contidos em páprica em pó e suas oleoresinas, dependendo da intensidade da cor do produto e do tipo de solvente utilizado [**Gregory et al. 1987; Baranyai & Szabolcs, 1976; Hornero-Mendez & Minguez-Mosquera, 2001; Biacs et al., 1989; Rodriguez-Huezo et al., 2004**]. A curva padrão utilizada na quantificação da oleoresina e um exemplo dos espectros obtidos são apresentados nos anexos 5 e 6.

Os perfis de liberação ao longo do tempo de oleoresina de páprica contida em micropartículas coacervadas sem reticulação, reticuladas com glutaraldeído (0,1mM/g ptn e 1,0mM/g ptn) ou com transglutaminase (10U/g ptn) úmidas ou desidratadas por liofilização, em etanol absoluto, são apresentadas na Tabela 37 e Figuras 64 e 65.

**Tabela 37:** Quantidades liberadas (%) ao longo do tempo de oleoresina de páprica contida nas microprticulas coacervadas sem reticulação, reticuladas com glutaraldeído (0,1mM/g ptn e 1,0mM/g.ptn) ou com transglutaminase (10U/g.ptn) midas ou desidratadas por liofilização, em etanol absoluto.

Tempo (min)	Sem reticulação		Transglutaminase 10U/g de proteína		Glutaraldeído 0,1mM/g de proteína		Glutaraldeído 1,0mM/g de proteína	
	SRL liofilizado	SR mido	TGL liofilizado	TG mido	G01L liofilizado	G01 mido	G1L liofilizado	G1L mido
15	29,64*	94,55	25,65	89,21	25,40	55,35	26,19	39,42
	0,31**	2,24	1,90	2,08	4,28	2,48	0,71	1,10
	1,04***	2,37	7,39	2,33	16,85	4,47	2,71	2,80
30	31,52	97,54	26,19	90,07	25,74	70,73	28,13	49,60
	0,47	1,83	1,62	0,12	4,67	4,31	1,13	0,23
	1,49	1,88	6,19	0,14	18,16	6,10	4,02	0,46
60	33,45	98,53	27,52	91,59	26,32	92,51	30,38	60,01
	0,38	2,99	2,44	0,81	5,18	1,62	2,61	0,78
	1,13	3,04	8,86	0,88	19,70	1,75	8,58	1,30
90	34,56	99,30	28,31	93,01	26,53	94,93	31,02	64,62
	0,15	0,66	2,53	2,03	5,50	2,30	3,08	0,34
	0,44	0,66	8,92	2,18	20,73	2,43	9,94	0,53
120	35,44	99,34	28,74	97,60	27,26	96,94	32,01	67,86
	0,27	1,83	2,74	2,13	5,36	4,47	3,21	2,91
	0,76	1,84	9,55	2,18	19,68	4,62	10,03	4,29

Os resultados apresentados são mdias de uma triplicata de liberação para os sistemas úmidos. As microprticulas liofilizadas foram produzidas a partir dos mesmo sistemas úmidos submetidos a liofilização. \* média, \*\* desvio padrão, \*\*\* coeficiente de variação (média/desvio padrão x 100). Cálculo: % oleoresina liberada = oleoresina liberada (detrminada a 452nm)/oleoresina total (oleoresina pesada – oleoresina perdida) X 100.

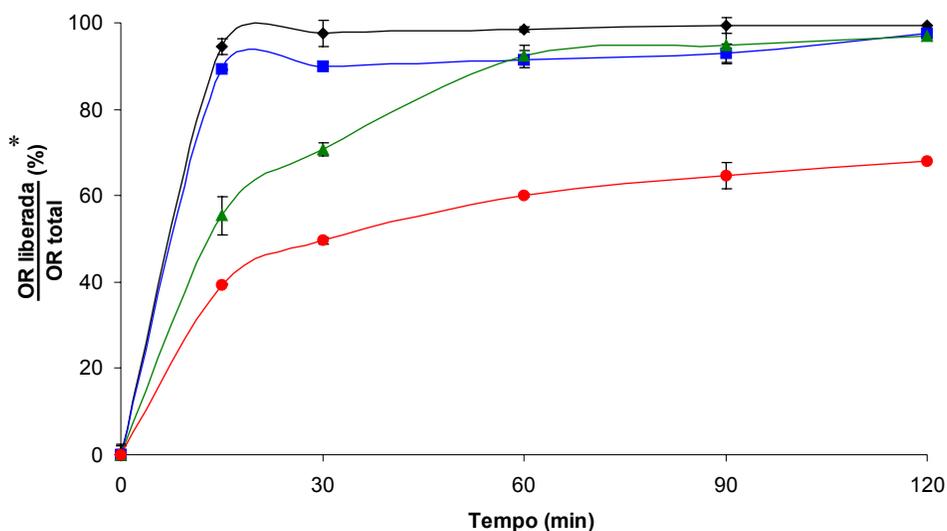
Praticamente toda a oleoresina contida nas microprticulas úmidas sem reticulação, reticuladas com glutaraldeído na menor concentração (0,1mM/g.ptn) e reticuladas com transglutaminase (10U/g.ptn) foi liberada no tempo máximo de 120 minutos. A partir de 60 minutos esses sistemas já apresentaram mais de 90% de seu conteúdo liberado (Figura 64).

O aumento da reticulação com glutaraldeído reteve parte da oleoresina nos primeiros 30 minutos de experimento. Na concentração menor (0,1mM), a partir de 60 minutos de exposição ao etanol, a liberação se intensificou, chegando a quase liberação total (96,9%), uma hora depois. O sistema reticulado com glutaraldeído na concentração de 1,0mM/g.ptn, apresentou baixa liberação quando, comparado aos demais, tendo 67,9% do conteúdo de oleoresina liberado após 120 minutos de

agitação em etanol. Esse aumento na retenção do recheio, proporcional ao aumento da reticulação com glutaraldeído, foi observado por outros autores para microesferas de gelatina [Iwanaga et al., 2003; Vandelli et al., 2001]

A liberação do conteúdo de oleoresina das micropartículas reticuladas com transglutaminase foi muito parecida com a apresentada pelas partículas sem reticulação, indicando que, apesar das ligações entre as moléculas de polímero da matriz, a reação promovida pela enzima não interferiu significativamente na porosidade das micropartículas, diferente do observado para o glutaraldeído na sua concentração mais alta testada.

Cho et al. [2003] avaliaram a liberação de óleo de peixe em micropartículas com parede composta de isolado protéico de soja reticulada com transglutaminase. O perfil de liberação para o óleo foi lento nos primeiros 60 minutos, aumentando significativamente a partir daí, até atingir a total liberação com 240 minutos.

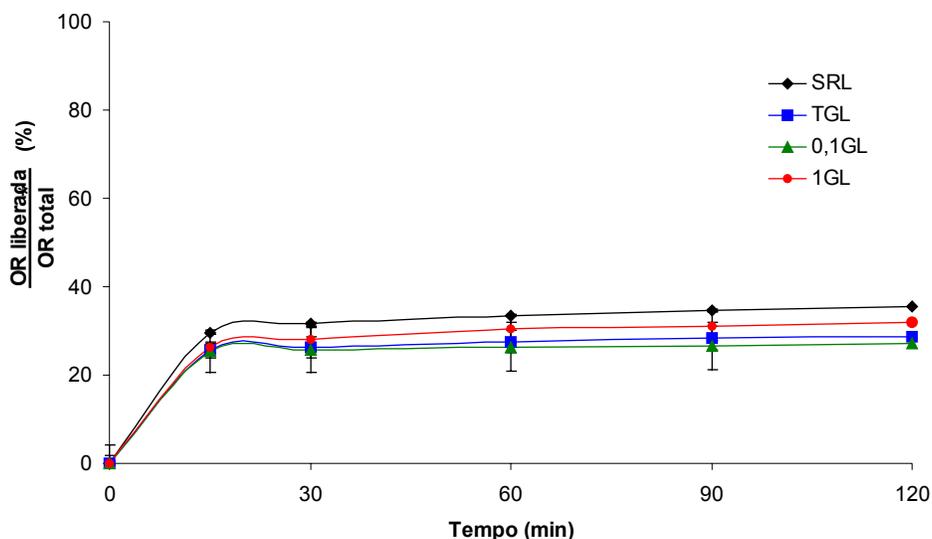


**Figura 64:** Perfis de liberacao ao longo do tempo de oleoresina de paprica contida em micropartuculas coacervadas sem reticulacao (SR – ◆), reticuladas com glutaraldeído (0,1mM/g ptn – 0,1G ▲ e 1,0mM/g.ptn – 1G ●) ou com transglutaminase (10U/g.ptn – TG ■) midas, em etanol absoluto. \* Oleoresina total = Oleoresina contida efetivamente na micropartucula (Oleoresina pesada inicialmente – oleoresina perdida).

A secagem por liofilização interferiu fortemente nas liberações da oleoresina das micropartículas coacervadas (Figura 65). Todos os valores foram menores que os apresentados pelo tratamento úmido de maior retenção (G1).

Considerando que uma parte de cada sistema úmido (com e sem reticulação) foi liofilizada, e que não ocorrem perdas nesse processo, a quantidade de oleoresina inicial nos sistemas é semelhante, no entanto no máximo 35,4% do total foi liberado após 120 minutos de agitação em etanol para o sistema sem reticulação liofilizado, indicando uma retenção de 64,3% em relação ao valor do sistema úmido (99,3%). Essa diferença parece ser devido à secagem, podendo ter provocado alteração da porosidade da parede das micropartículas, e a impossibilidade de inchamento, devido ao meio utilizado para liberação.

Os outros sistemas reticulados secos tiveram comportamento semelhante, apresentando liberações ligeiramente menores para todos os tempos em relação ao sistema sem reticulação.



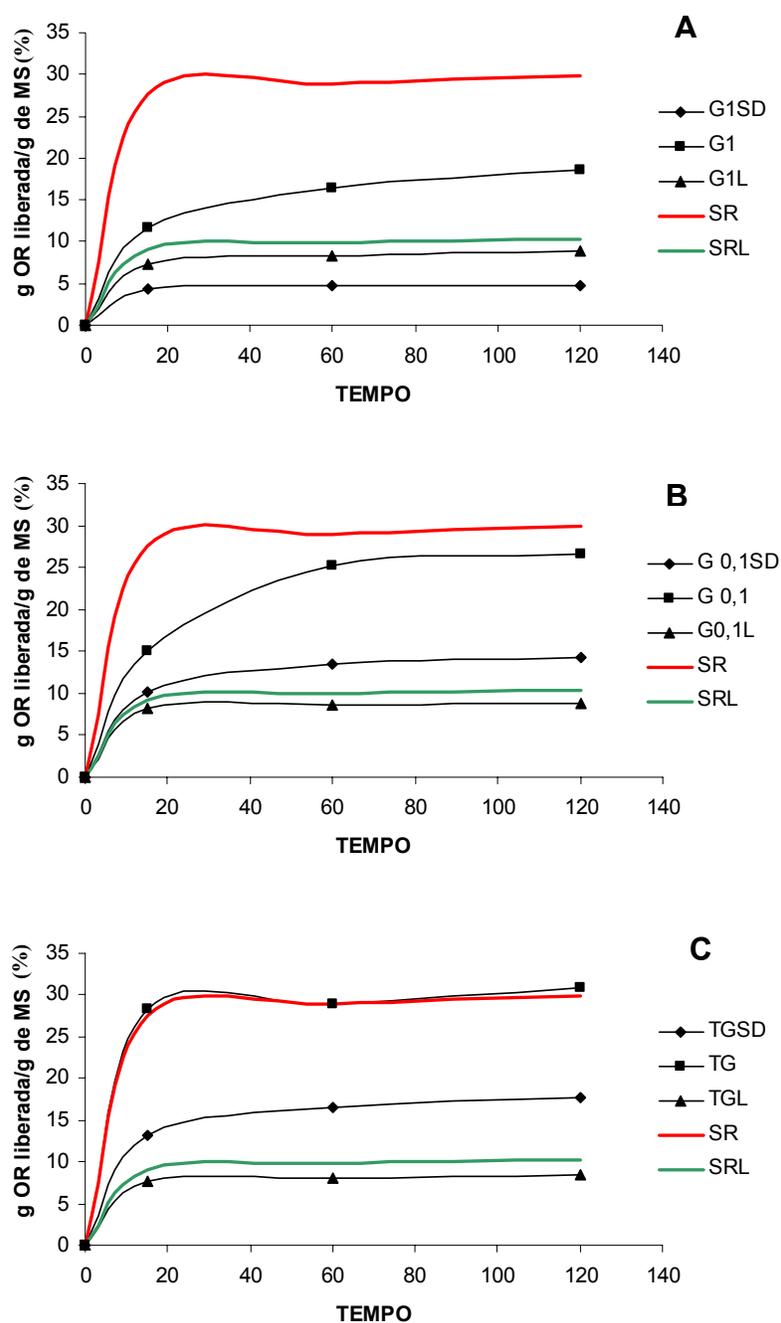
**Figura 65:** Perfis de liberação ao longo do tempo de oleoresina de pimenta (%) contida em micropartículas coacervadas desidratadas por liofilização, em etanol absoluto: Sem reticulação (SRL  $\blacklozenge$ ), reticuladas com glutaraldeído (0,1mM/g ptn – 0,1GL  $\blacktriangle$  e 1,0mM/g.ptn – 1GL  $\bullet$ ) ou com transglutaminase (10U/g.ptn – TGL  $\blacksquare$ ) \* Oleoresina total = Oleoresina contida efetivamente na micropartícula (Oleoresina pesada inicialmente – oleoresina perdida).

Todos os sistemas úmidos e secos apresentaram uma liberação acentuada nos primeiros 15 minutos de experimento (Figuras 64 e 65), embora as ordens de grandeza tenham sido diferenciadas. O efeito *burst* parece devido à parcela de recheio não encapsulado, aderido na face externa das micropartículas, que foi observado na microscopia ótica apresentada para as amostras úmidas (Figura 41).

#### 5.3.6.1.2. Liberação de oleoresina de micropartículas coacervadas secas por *spray dryer*.

A quantificação da oleoresina contida nas micropartículas coacervadas úmidas através do monitoramento da oleoresina perdida durante a produção dos coacervados, descontando-a do valor inicialmente pesado de recheio, apresentou-se reprodutível. Para as amostras liofilizadas foi considerado que não houve perdas de recheio durante o processo de secagem e a quantidade de oleoresina considerada para cada amostra desidratada foi a mesma obtida para os sistemas úmidos com valores convertidos para base seca.

No caso das micropartículas coacervadas desidratadas por *spray dryer* esse procedimento para quantificação ficou comprometido em decorrência da necessidade de vários processamentos para obtenção de uma quantidade suficiente de amostra seca para a realização das análises de caracterização e liberação e pela grande perda de micropartículas na câmara de secagem do *spray dryer*. Em decorrência disso, o cálculo das liberações para esses sistemas foi feito relacionando-se a massa de oleoresina liberada em relação à massa de micropartículas secas utilizada na liberação, calculada em base seca. Para possibilitar alguma comparação entre os sistemas secos por *spray dryer* e os demais, os dados de liberação foram recalculados nessa nova base para todos os sistemas avaliados e são apresentados na Figura 66 - A, B, C.



**Figura 66:** Liberação de oleoresina de micropartículas coacervadas úmidas, secas por liofilização ou secas por *spray dryer*. A: reticulação com glutaraldeído 1,0mM (úmido – G1, liofilizado - G1L, spray dryer – G1SD); B: reticulação com glutaraldeído 0,1mM (úmido – G0,1, liofilizado - G0,1L, spray dryer – G0,1SD); C: reticulação com transglutaminase (úmido – TG, liofilizado - TGL, spray dryer – TGSD). As curvas coloridas representam os sistemas sem reticulação: vermelha: sem reticulação úmido (SR), verde: sem reticulação liofilizado (SRL).

Para o glutaraldeído na concentração maior de 1,0mM/g.ptn (Figura 66 – A) a amostra seca em *spray dryer* apresentou menor liberação que as amostras liofilizada e úmida, para essa condição de reticulação. Na microscopia eletrônica de varredura (Figura 55) foi possível observar a integridade das micropartículas obtidas pelo secagem no *spray dryer*, o que contribui para eficiência na retenção do recheio. Essa menor liberação poderia ser atribuída a eventuais degradações de compostos da oleoresina, devido a efeitos de degradação da temperatura do processo de secagem por *spray dryer*.

As amostras reticuladas com glutaraldeído na concentração menor de 0,1mM/g.ptn ou com transglutaminase (Figura 66 B e C) desidratadas por *spray dryer* liberaram mais oleoresina que as respectivas amostras liofilizadas. Essa liberação maior pode ter sido decorrência do rompimento de parte das partículas reticuladas durante a secagem, expondo o recheio à solubilização ao etanol (Figura 55 – A e Figura 57).

### **5.3.6.2. Perfil de liberação de compostos hidrofílicos (glicose e proteína): micropartículas lipídicas e seus coacervados**

#### **5.3.6.2.1. Liberação de glicose ou proteína de micropartículas lipídicas**

Os resultados dos planejamentos experimentais (Tabelas 32 e 33) conduziram a escolha de alguns tratamentos contendo os recheios hidrofílicos (glicose ou proteína) para serem avaliados quanto à liberação após 30, 120 e 240 minutos.

A escolha para o sistema contendo glicose foi baseada na menor perda em trinta minutos referente ao ensaio 7 (proporção LIP/GLI: 90/10; Sol de glicose de 80% p/p e blenda-1 para os tensoativos trioleato de sorbitana/monoestearato de sorbitana). Apesar da baixa quantidade de glicose desse tratamento (Tabela 32) em relação aos ensaios 5 e 6 (Tabela 32) a alta retenção apresentada para 30

minutos (Tabela 32) mostrou-se mais interessante para produção dos coacervados. Foram realizados quatro processamentos, de acordo com a formulação do ensaio 7, que foram, após produzidos, misturados e tiveram a quantidade total de glicose medida em triplicata.

Para a proteína optou-se por estudar três concentrações diferentes de recheio utilizando-se as amostras dos ensaios 3, 5 e 11 obtidas durante o planejamento experimental (Tabela 33).

A quantificação do total de composto hidrofílico contido em cada amostra de micropartículas lipídicas no início das liberações é apresentada na Tabela 41.

**Tabela 38:** Quantidade total de composto hidrofílico contido em cada tratamento de micropartículas lipídicas usados para determinação dos perfis de liberação.

Micropartícula lipídica	<u>g de composto hidrofílico</u> 100 g de micropartículas
Glicose*	5,09 (ensaio 7)
Proteína**	0,61 (ensaio 3)
	4,03 (ensaio 11)
	10,08 (ensaio 5)

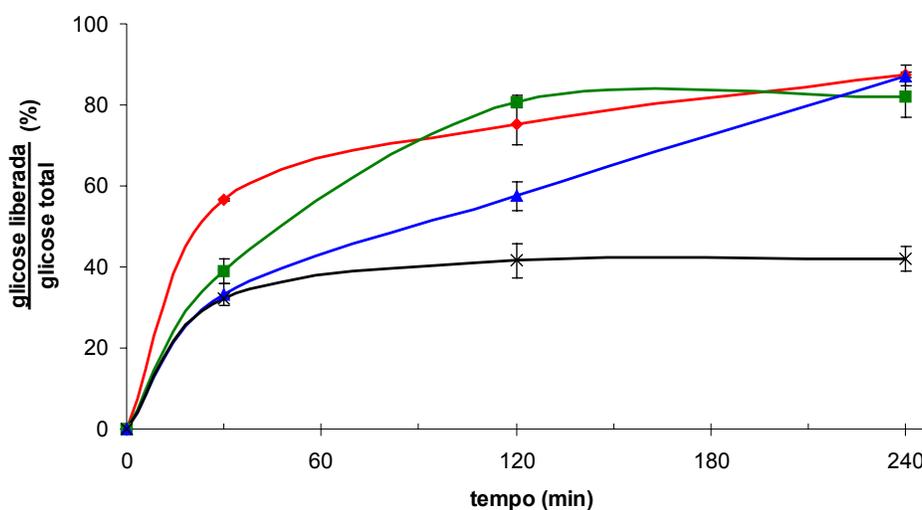
\* valor referente a mistura de 4 lotes de micropartículas lipídicas produzidas segundo as condições do ensaio sete (Tabela 35). \*\* valores determinados por Kjeldhal nas micropartículas produzidas segundo seus respectivos ensaios do planejamento da Tabela 33.

Os perfis de liberação da glicose encapsulada em micropartículas lipídicas, obtidos com ou sem agitação e em diferentes temperaturas ao longo do tempo, são apresentados na Tabela 39 e na Figura 67.

**Tabela 39:** Glicose liberada (em porcentagem) de micropartículas lipídicas sob diferentes condições ao longo do tempo.

Tempo (minutos)	Liberação (%)			
	Sem agitação		Com agitação	
	22° C	40° C	22° C	40° C
30	32.26*	38,95	33.13	56,63
	0.22**	3,01	2.64	0,24
	0.68***	7,72	7.96	0,43
120	41.53	80.80	57.53	75.27
	4.09	1.57	3.49	5.07
	9.84	1.94	6.07	0.73
240	41.99	81.90	86.96	87.38
	3.10	5.03	1.26	2.60
	7.39	6.14	1.45	2.98

\* Média (med); \*\* Desvio Padrão (dp); \*\*\* Coeficiente de variação (dp/med x 100)



**Figura 67:** Perfis de liberação da glicose contida em micropartículas lipídicas obtidos com ou sem agitação e em diferentes temperaturas ao longo do tempo: **◆** – com agitação (40° C); **▲** – com agitação (22° C); **■** – sem agitação (40° C); **X** – sem agitação (22° C)

A liberação da glicose das micropartículas lipídicas apresentou influência da temperatura. Micropartículas lipídicas, mantidas em repouso sob temperaturas de 22 e 40°C (Figura 67 – “sem agitação” (22°C) e (40°C)), apresentaram valores de liberação próximos para trinta minutos (32,3 e 39%). Após esse período, as

micropartículas lipídicas, mantidas em temperatura de 22°C, praticamente estabilizaram sua liberação, com um máximo de 42% após 240 minutos de permanência em água, enquanto que as micropartículas lipídicas mantidas em 40°C, perderam rapidamente boa parte de seu conteúdo de glicose, com liberação de 82% após 240 minutos. A retenção dos compostos na matriz lipídica está associada à integridade desta. Quando a temperatura do sistema atinge valores próximos ao ponto de fusão, pode ocorrer um amolecimento e conseqüente enfraquecimento da matriz lipídica, que se torna mais frágil, tendendo a se desestruturar e favorecer a liberação de glicose. O baixo peso molecular da glicose (180Da) e sua alta solubilidade em água, dificultam a sua retenção em sistemas de encapsulação, mesmo naqueles com caráter hidrofóbico, como emulsões e matrizes lipídicas sólidas.

O efeito da agitação sob a liberação da glicose também pode ser observado na Figura 67, comparando as amostras “sem agitação (22°C)” e “com agitação (22°C)”. Esses dois tratamentos têm liberações de seus conteúdos de glicose praticamente iguais, após 30 minutos (32,3 e 33,1), com liberação lenta para o tratamento não agitado, chegando a 42% após 240 minutos e liberação acentuada para o tratamento com agitação, atingindo 87% após o mesmo período. A agitação tende a acentuar a transferência de massa do recheio de dentro para fora das micropartículas, pois mantém baixa a concentração do mesmo, na camada de solvente próxima às partículas, acelerando a difusão.

Nos primeiros trinta minutos de liberação, foi observada uma perda de glicose na faixa de 32 a 39% para os tratamentos sem agitação e agitado em temperatura de 22°C e de 56,6% para o tratamento sob agitação em 40°C. Essa perda acentuada de recheio em um período relativamente curto, comparado ao tempo total de liberação, é denominado por muitos autores como efeito “burst”, sendo observado para vários tipos de recheios e em diversos tipos de microcápsulas, estando associado ao tipo de microcápsula, à distribuição do recheio pela matriz, solubilidade do mesmo, condições do meio de liberação, etc

[Mukai-Corrêa, 2003; Zhou et al., 1996; Shi et al., 2003; Lee & Rosenberg, 2001; Ré & Biscans, 1999; Youan et al., 2001; Ribeiro dos Santos et al., 2002].

No final do experimento, com 240 minutos de liberação, todos os sistemas, com exceção do sistema não agitado em 22°C, liberaram acima de 80% do seu conteúdo total inicial de glicose.

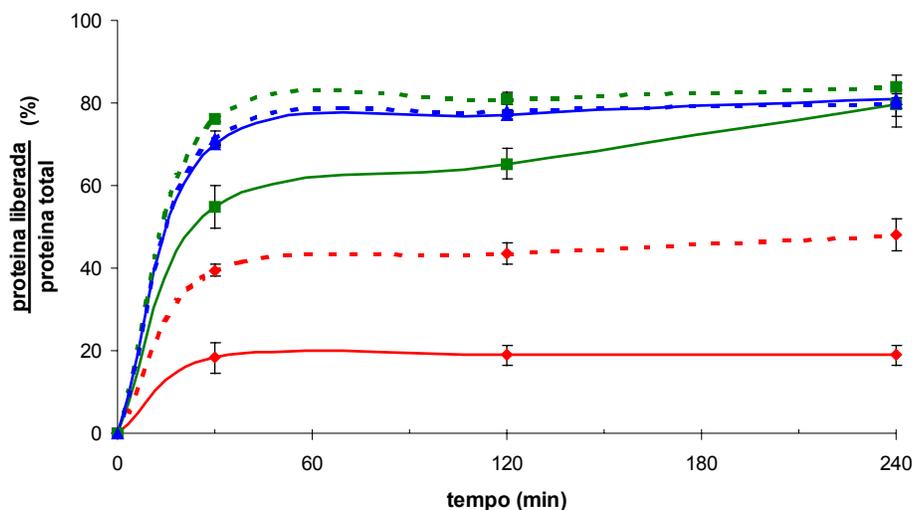
O perfil de liberação da proteína de micropartículas lipídicas apresentou acentuada influência da temperatura. O aumento na concentração de recheio também implicou em maior liberação do conteúdo protéico ao longo do tempo para qualquer temperatura estudada. A Tabela 40 e a Figura 68 apresentam os valores e perfis de liberação da proteína contida nas micropartículas lipídicas.

**Tabela 40:** Proteína liberada (%) de micropartículas lipídicas sob diferentes condições ao longo do tempo.

	Concentração de proteína (%) <sup>1</sup>					
	0,61		4,03		10,08	
	22°C	40°C	22°C	40°C	22°C	40°C
30 min	18,27*	39,46	54,75	76,11	69,89	71,37
	3,73**	1,48	5,21	0,55	0,50	1,85
	20,39***	3,74	9,51	0,72	0,72	2,59
120 min	18,95	43,58	65,30	81,09	77,23	77,58
	2,43	2,46	3,76	1,44	1,07	1,70
	12,84	5,64	5,76	1,78	1,39	2,18
240 min	18,90	48,11	79,52	83,99	81,08	80,07
	2,48	3,88	5,21	2,65	1,31	3,21
	13,13	8,07	6,55	3,16	1,62	4,01

\* Média (med); \*\* Desvio Padrão (dp); \*\*\* Coeficiente de variação (dp/med x 100)

<sup>1</sup> Massa de proteína/ massa de micropartícula lipídica.



**Figura 68:** Perfis de liberação da proteína contida em micropartículas lipídicas (%), em três diferentes concentrações, obtidas em diferentes temperaturas ao longo do tempo: —◆— 0,61% (22° C); - -◆- - 0,61% (40° C); —■— 4,03% (22° C); ·-■-· 4,03% (22° C); —▲— 10,08% (22° C); ·-▲-· 10,08% (22° C).

A temperatura apresentou acentuada influência na liberação da proteína contida nas micropartículas lipídicas para as concentrações mais baixa e intermediária desse composto (Figura 68: 0,61% em vermelho e 4,03% em verde) com aumento da liberação proporcional ao aumento de temperatura. Para a concentração mais alta de proteína (Figura 68: 10,08% em azul) a variação da temperatura não interferiu nos perfis de liberação, que foram praticamente os mesmos.

O efeito do aumento na concentração de proteína nas micropartículas lipídicas, sob a liberação da mesma, pode ser observado para as amostras mantidas a 22° C com trinta minutos de permanência em água (Figura 68), onde o aumento da concentração implicou em maior liberação. **Langdon & Buchal [1998]** também observaram um aumento da liberação com o aumento da concentração de sais contidos em micropartículas lipídicas.

Para as proteínas também foi observada a rápida liberação de parte do conteúdo protéico (efeito burst) nos primeiros 30 minutos para todos os tratamentos, exceto aquele contendo baixa concentração (0,61%) em temperatura

de 22°C. O tratamento com concentração intermediária de proteína (4,03%) e temperatura 22°C, mostrou uma liberação progressiva de seu conteúdo, após 30 minutos, diferente dos outros tratamentos, que mantiveram valores relativamente constantes de liberação, no período de 30 a 240 minutos de experimento.

Devido às diferenças entre os pesos moleculares dos dois compostos hidrofílicos utilizados na produção das micropartículas lipídicas, eram esperados valores de retenções relativamente maiores para a proteína que para glicose, o que foi observado apenas para concentrações mais baixas de proteína. **Nokhodchi et al. [2002]** determinaram o efeito do tipo de tensoativo, sua concentração e proporção na liberação de um composto de alta solubilidade concluindo que, o tipo de interação entre o tensoativo e o recheio pode influir diretamente no perfil de liberação de compostos. Pode-se supor que a interação da proteína com os tensoativos e com a matriz lipídica pode ser um fator responsável pelo comportamento observado na Figura 68.

#### *5.3.6.2.2. Liberação de glicose ou proteína contidas em micropartículas lipídicas encapsuladas por coacervação.*

Para a produção dos coacervados contendo micropartículas lipídicas carreadoras de glicose foram utilizadas as mesmas micropartículas lipídicas dos testes de liberação produzidas, segundo o ensaio sete do planejamento experimental (Tabela 32). Para produção dos coacervados contendo micropartículas lipídicas carreadoras de proteína, foi produzido um novo lote de micropartículas, baseado nos resultados de liberação destas. Para a aplicação dos coacervados como um alimento para larvas de peixe seria mais interessante uma quantidade maior de proteínas sem perdas acentuadas para a água. Baseando-se nesta premissa, foi produzida uma amostra de micropartículas com concentração intermediária aos ensaios 5 e 11 para inclusão nos coacervados. Para produção dessas micropartículas foram utilizadas mistura lipídica e solução de proteína (24% p/p) na proporção de 70/30 e adição de 5% da blenda 1 de tensoativos. A

Tabela 41 apresenta o total de composto hidrofílico (glicose ou proteína) contido nas duas amostras de micropartículas lipídicas utilizadas como recheio na encapsulação por coacervação complexa.

**Tabela 41:** Total de composto hidrofílico (glicose ou proteína) contido nas duas amostras de micropartículas lipídicas (MPLs) utilizadas como recheio na encapsulação por coacervação.

	Micropartículas lipídicas contendo glicose	Micropartículas lipídicas contendo glicose
<u>g de recheio</u>	5,09* ± 0,03**	6,44 ± 0,10
<u>100 g de MPLs</u>	0,68***	1,48

\*Média; \*\* Desvio Padrão; \*\*\* Coeficiente de variação (DP/MED x 100)

A liberação da glicose dos coacervados foi determinada diretamente na água, onde as micropartículas permaneceram suspensas, com reposição de solvente equivalente à alíquota retirada.

A Tabela 42 apresenta as quantidades iniciais de glicose ou proteína nos coacervados e as quantidades liberadas desses compostos após 1 hora e 20 horas de permanência em água.

**Tabela 42:** Concentrações iniciais de glicose ou proteína nos coacervados e quantidades liberadas (%) após 1 hora e 20 horas de permanência em água.

	Concentração Inicial g composto /100g de coacervado (base seca)	% de Liberação g composto liberado/100g de iniciais de composto (base seca)	
		1 hora	20 horas
Glicose	1,21* ± 0,03** 2,82***	56,81±4,34 7,63	71,42±3,12 4,37
Proteína <sup>1,2</sup>	3,37	23,16	39,86

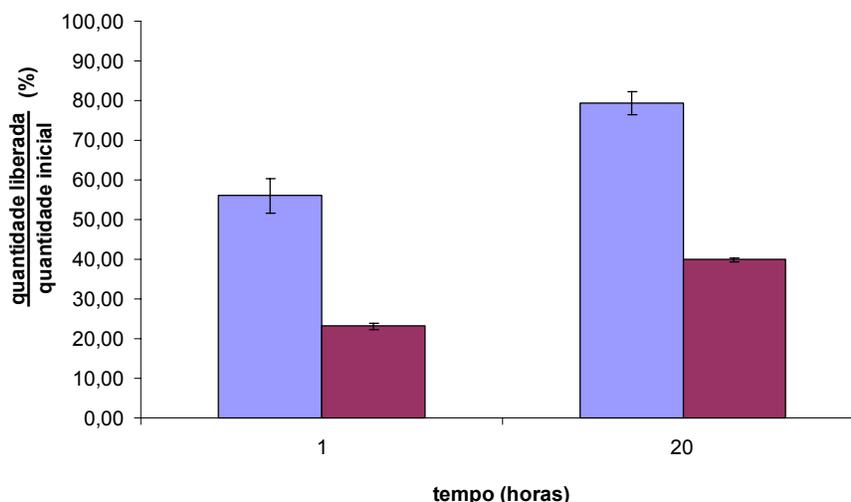
\*Média; \*\* Desvio Padrão; \*\*\* Coeficiente de variação (dp/med x 100).

<sup>1</sup> – Concentração inicial determinada pela diferença entre a proteína total contida no coacervado contendo micropartículas lipídicas sem proteína e a proteína total contida no coacervado contendo micropartículas lipídicas com proteína; <sup>2</sup> - valores determinados pela diferença entre a proteína total do coacervado contendo micropartículas lipídicas com proteína, no tempo inicial, e a proteína total do mesmo após a liberação para cada tempo.

Na produção de micropartículas coacervadas, utilizando como recheio micropartículas lipídicas contendo glicose, ocorreu uma perda deste composto na

água de resfriamento de 61% em relação à quantidade inicial. No caso da proteína não foi constatada perda significativa deste composto na produção dos coacervados.

A Figura 69 apresenta a liberação da glicose e da proteína de seus respectivos coacervados para os tempos de 1 hora e 20 horas.



**Figura 69:** Liberação total (%) de compostos hidrofílicos contidos em micropartículas lipídicas encapsuladas por coacervação complexa: glicose (■); proteína (■)

A liberação da proteína dos coacervados foi relativamente baixa, se comparada às liberações desse mesmo composto das micropartículas lipídicas (Figura 68). Após uma liberação rápida na primeira uma hora (23,16%) o total de proteína disponível liberada para um tempo de 20 horas foi de apenas 40%.

A liberação da glicose foi maior que a da proteína. Vários fatores como tamanho molecular, interações com a matriz, dentre outros, podem ser citados para explicar os perfis obtidos. **Buchal & Langdon [1998]** avaliando a liberação de dois compostos hidrossolúveis com massas moleculares muito distintos (50 a 100KDa *versus* 497Da) observaram menores liberações num período de 24 horas para o composto maior. Sob essa consideração, a glicose apresenta massa

molecular pequena (180Da), enquanto que o isolado protéico de soro de leite apresenta massa molecular média muito maior, indicando uma menor liberação da proteína através da matriz do coacervado, possivelmente devido à sua dificuldade em difundir pela mesma. Interações da proteína com a matriz coacervada poderiam também contribuir para uma menor liberação desse material.

Segundo **Langdon & Buchal [1998]** a perda de nutrientes hidrossolúveis é uma das principais limitações das microdietas. Os autores sugerem o uso de carreadores hidrofóbicos para minimizar a perda desses compostos solúveis. Como sistemas-modelo para veiculação de compostos hidrofílicos para alimentação de larvas de peixe os coacervados contendo micropartículas lipídicas estudados mostram-se potenciais. No entanto mais estudos são necessários para melhorar a incorporação e retenção de proteínas nutricionalmente importantes e de compostos menores como peptídios, aminoácidos, vitaminas e minerais para obtenção de uma microdieta com perfil nutritivo próximo dos alimentos vivos como as artêmias, que contém alto teor de água (80% ou mais) e um total de compostos em base seca de aproximadamente 55% de proteína, 16% de lipídios e o restante em micronutrientes diversos [**Gracia-Ortega et al., 1998**].

## **CAPITULO 6.**

### **ENSAIO BIOLÓGICO *IN VIVO*: ACEITAÇÃO DOS AGLOMERADOS E COACERVADOS COMO DIETAS**

#### **RESUMO**

O uso de alimentos inertes na alimentação de larvas de peixe em substituição aos alimentos vivos (artêmias, rotíferos, etc) encontra limitações de ordem tecnológica como ajuste de tamanho, fluatibilidade, textura, solubilidade, e de ordem biológica (associada a tecnológica) como hábitos alimentares das larvas, requerimento nutricional, digestibilidade das dietas, morfologia e composição enzimática do trato gastrointestinal e aceitabilidade. Esse capítulo apresenta dados relativos a aceitabilidade das partículas produzidas nos capítulos anteriores por larvas de pacu. Os aglomerados são desidratados, nutricionalmente adequados mas apresentaram alta solubilidade. Os coacervados ainda são nutricionalmente incompletos mas devido ao alto teor de umidade, assemelham-se mais aos organismos vivos. São apresentados dados de aceitabilidade de cinco amostras (um aglomerado e quatro coacervados) além de tamanhos de partículas e morfologia do trato gastrointestinal das larvas que ingeriram as dietas. Diversas observações do comportamento alimentar das larvas também são descritas, indicando o potencial de veiculação de nutrientes de cada tipo de partícula produzida nesse trabalho. Os coacervados tiveram alta aceitação pelas larvas, nos experimentos realizados, apresentando-se potenciais para serem utilizados como veiculadores de nutrientes, hormônios, vacinas, vitaminas, dentre outros compostos. A utilização de matrizes lipídicas pode potencializar a composição em nutrientes possíveis de serem carreados pelas micropartículas coacervadas, tornando-as muito adequadas à substituição dos alimentos vivos.

## 6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.2.1. Materiais

Larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), fornecidas pelo Centro de Aqüicultura da Unesp (Caunesp-Jaboticabal), copos plásticos descartáveis transparentes de 500 mL (Unidades Experimentais – UE), copos descartáveis de 50 mL, peneiras (10 cm de diâmetro aprox.), pinças, seringas descartáveis com agulha, microscópio estereoscópico Olympus, lâminas de vidro, formol 10%, cronômetro, ependorfs, pincéis, pipetas Pasteur, pipetas, beckers, provetas, cistos de artêmia, caixas de PVC para 100 litros, aeradores, termostatos, gelatina de peixe Phytomare/SC, adquirina no comércio local (lote 034, fabricação: 07/04, validade: 05/06). Outros materiais e equipamentos necessários à produção das dietas testadas foram citados nos capítulos 4 e 5.

### 6.2.2. Dietas testadas

Para realização do ensaio biológico, cinco dietas foram produzidas, sendo uma desidratada e aglomerada e quatro coacervados. Os materiais e metodologias de produção para cada dieta (aglomerada ou coacervada) estão citados e discutidos no capítulo 4 (sessão 4.3.2.3.) e no capítulo 5 (fluxograma de produção de coacervados da Figura 26).

A escolha da dieta desidratada e aglomerada foi baseada na sua solubilidade total e de proteínas apresentadas no capítulo 4 (Figura 12 e 13). A dieta desidratada utilizada como base para produção dos aglomerados foi a mesma usada nos estudos de aglomeração (capítulo 4 – Tabela 7).

Para produção das dietas coacervadas foram necessários alguns ajustes quanto a formulação apresentada no capítulo 5, na Figura 26. O conteúdo total de recheio foi reduzido passando a ser de 20% do total de sólidos de parede em base seca. A oleoresina de páprica não foi utilizada pois seu sabor poderia influir

negativamente na aceitação das dietas pelas larvas. Em substituição, na tentativa de agregar cor as partículas, foi adicionado ao recheio 5% (p/p em relação ao óleo) de astaxantina extraída de cascas de camarão segundo **Chen & Meyers [1982]** com algumas adaptações. Quanto ao material de parede, foi utilizada, além da gelatina bovina, uma gelatina de peixe, obtida comercialmente, na produção de coacervados.

Testes preliminares foram feitos para determinar a proporção entre gelatina de peixe e goma arábica e pH de coacervação para esse sistema.

Dois tipos de recheio foram utilizados na fabricação das dietas coacervadas: óleo de soja e gordura de peixe extraída de pacu congelado obtida pela filetagem do peixe e imersão dos pedaços em água aquecida a 80°C para liquefação da gordura. Com o resfriamento a gordura solidificou na superfície da água sendo removida e armazenada em freezer.

Após a produção, as dietas prontas foram armazenadas em frascos e mantidas em refrigeração durante todo o experimento. As dietas e as descrições de suas formulações são apresentadas na Tabela 43.

**Tabela 43:** Dietas produzidas para serem avaliadas em ensaio *in vivo*.

Dieta	Tipo	Descrição
D1	Desidratada e Aglomerada*	Dieta fornecida pelo Caunesp, desidratada em spray dryer, adicionada de óleo de soja e aglomerada com pectina/cálcio.
D2	Coacervado**	Parede: Gelatina/goma arábica. Recheio: óleo de soja (20% do material de parede, bs) e astaxantina (5% do total de óleo).
D3	Coacervado	Parede: Gelatina/goma arábica. Recheio: gordura de peixe (20% do mat.de parede, bs) e astaxantina (5% do total de óleo).
D4	Coacervado	Parede: Gelatina de peixe /goma arábica. Recheio: óleo de soja (20% do material de parede, bs) e astaxantina (5% do total de óleo).
D5	Coacervado	Parede: Gelatina de peixe/goma arábica. Recheio: gordura de peixe (20% do material de parede, bs) e astaxantina (5% do total de óleo).

\* produção segundo descrição no Capítulo 4 – sessão:4.3.2.3. \*\* produção segundo descrição no Capítulo 5 – Figura 26.

### **6.2.3. Morfologia e microestrutura**

Para observação da morfologia e microestrutura externa e interna das microcápsulas coacervadas, utilizou-se um microscópio ótico (NIKON – eclipse E800 - Japan) munido do software Image Pro Plus 4.0, para obtenção das imagens.

### **6.2.4. Determinação do diâmetro médio de partículas**

Para determinação do diâmetro médio de partículas das dietas coacervadas produzidas para o ensaio biológico, utilizou-se a microscopia ótica com captação de imagens através de uma câmera digital controlada pelo programa Global Lab Image seguida de processamento e avaliação do tamanho das partículas pelo programa Scion Image ([www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com)). O aumento total de captação foi de 15,6x (objetiva de 12.5x de aumento e optivar com 1.25x de aumento). Entre 100 e 150 partículas foram medidas para cada dieta. Para a dieta desidratada, o diâmetro médio foi considerado o mesmo determinado por espalhamento de luz, para a mesma dieta produzida no capítulo 4 (sessão 4.3.4. – Tabela 13).

### **6.2.5. Experimento in vivo com larvas de pacu: Testes de aceitação**

O experimento biológico foi conduzido no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos e Larvicultura do Centro de Aqüicultura da Unesp, campus de Jaboticabal, durante o mês de dezembro de 2004,. O protocolo experimental foi definido baseado nos procedimentos descritos em **Fernandez-Diaz et al. [1994]**, **Kolkovski et al. [1997]** e **Dou et al. [2000]** com adaptações. O procedimento descrito a seguir vem sendo utilizado por esse laboratório do Caunesp em trabalhos de avaliação de estímulos químicos na alimentação de larvas.

Larvas de pacu, recém eclodidas, provenientes de desova induzida, foram mantidas desde a eclosão, em tanques contendo aproximadamente 100 litros de água com aeração e filtração constantes, à uma temperatura média de  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (tanque de manutenção).

A partir do quinto dia de vida, após a abertura da boca, as larvas passaram a receber alimentação exógena (náuplios de artêmia), quatro vezes ao dia (a cada 4 horas). No décimo segundo dia de vida, as larvas passaram a receber, além das artêmias, uma mistura de todas as dietas a serem avaliadas. Esse procedimento foi mantido até o início do experimento para que as larvas tomassem contato com as dietas e passassem a identificá-las também como alimento.

No décimo sétimo dia de vida, iniciou-se o experimento, preparando trinta unidades experimentais, contendo 200 mL de água filtrada. Dez larvas, coletadas aleatoriamente no tanque de manutenção, foram colocadas em cada unidade experimental, sendo mantidas sem alimentação, à  $30^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 18h.

No momento do experimento, 6 unidades experimentais foram escolhidas aleatoriamente para cada uma das cinco dietas. Três delas, receberam 10 mL de água utilizada para eclosão de náplios de artêmia (estímulo químico), contendo diversas substâncias naturais, potencialmente estimulantes. As outras três unidades experimentais não receberam o estímulo químico, sendo usadas como controle.

Com a exposição do estímulo químico, o comportamento das larvas em todas as 6 unidades experimentais, foi observado durante 15 minutos. Após esse período, uma quantidade de dieta foi adicionada em todas as unidades experimentais (0,20g de dieta desidratada ou 0,5mL de dieta coacervada). Novamente, o comportamento das larvas foi observado por 15 minutos. Após esse período, outra quantidade de dieta foi adicionada (0,20g da dieta desidratada ou 0,5mL das dietas coacervadas) com mais 15 minutos de observação do comportamento das larvas.

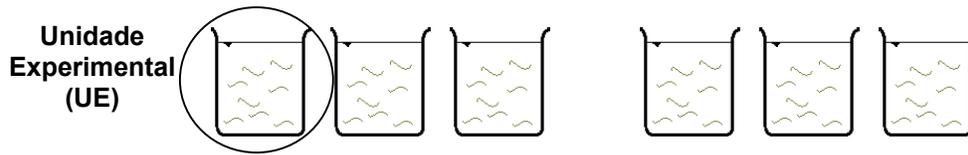
Ao final do experimento, as larvas foram sacrificadas pela adição de gelo, para prevenir que as mesmas regurgitassem o alimento ingerido, e fixadas em formol 10% tamponado, para posterior observação do conteúdo do trato digestivo, em microscópio estereoscópico.

Esse procedimento experimental foi realizado nos décimo oitavo, vigésimo terceiro, vigésimo oitavo e trigésimo terceiro dias de vida, correspondendo ao décimo quinto, décimo oitavo, vigésimo terceiro e vigésimo terceiro dia de alimentação exógena.

O fluxograma apresentado na Figura 70 ilustra o procedimento para realização dos experimentos com as larvas de pacu.

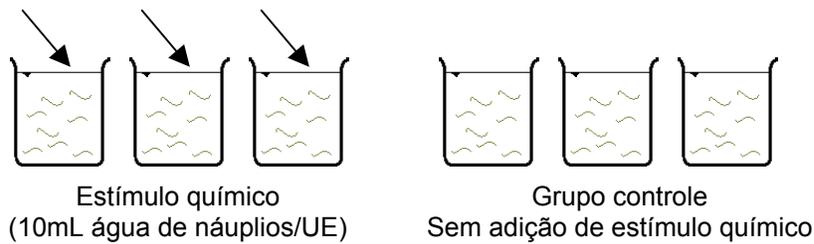
**PREPARAÇÃO DAS UNIDADES EXPERIMENTAIS**

Larvas em jejum de 18h (10 larvas/200mL/UE)



**ADIÇÃO DO ESTÍMULO QUÍMICO**

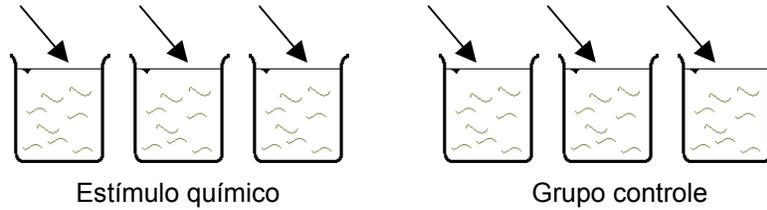
Tempo de exposição: 15 minutos



**ADIÇÃO DA DIETA**

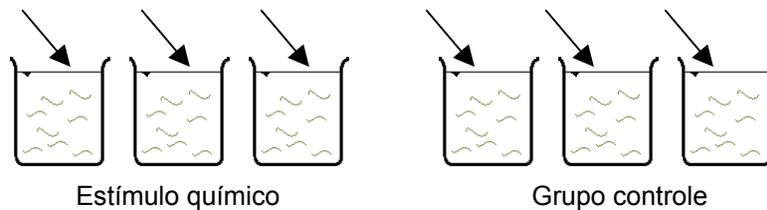
1<sup>a</sup> – 0,2g (p/ dieta desidratada) ou 0,5 mL (p/ coacervados)/EU

Tempo de exposição: 15 minutos



2<sup>a</sup> – 0,2g (p/ dieta desidratada) ou 0,5 mL (p/ coacervados)/EU

Tempo de exposição: 15 minutos



(Tempo total de alimentação de 30 minutos)

**Figura 70:** Esquema de execução do experimento *in vivo* com larvas de pacu.

### **6.2.6. Biometria**

Em cada dia experimental, 10 larvas foram removidas do tanque de manutenção, realizando uma biometria para caracterização morfométrica das mesmas. As larvas foram individualmente pesadas em balança analítica e o comprimento total avaliado com um paquímetro digital.

### **6.2.7. Avaliação da ingestão**

Utilizando um microscópio estereoscópico, para permitir a observação, e seringas hipodérmicas como bisturis, cada grupo de 10 larvas foi dissecado para remoção do trato gastrintestinal. Após a remoção do estômago, este foi observado, e em seguida aberto para detecção da presença ou ausência das dietas. A aceitação da dieta foi expressa pela porcentagem de larvas que ingeriram a dieta no período de 30 minutos.

### **6.2.8. Análise estatística**

As diferenças significativas entre os valores médios das taxas de ingestão e do efeito do estímulo químico sobre a taxa de ingestão de cada dieta (comparação entre grupo controle e grupo do estímulo) foram avaliadas por análise de diferença entre médias a 5%, de acordo com a ANOVA e o teste de Tukey, utilizando-se o software *Statística 5.0 for Windows* [Statsoft, INC., 1995].

### 6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

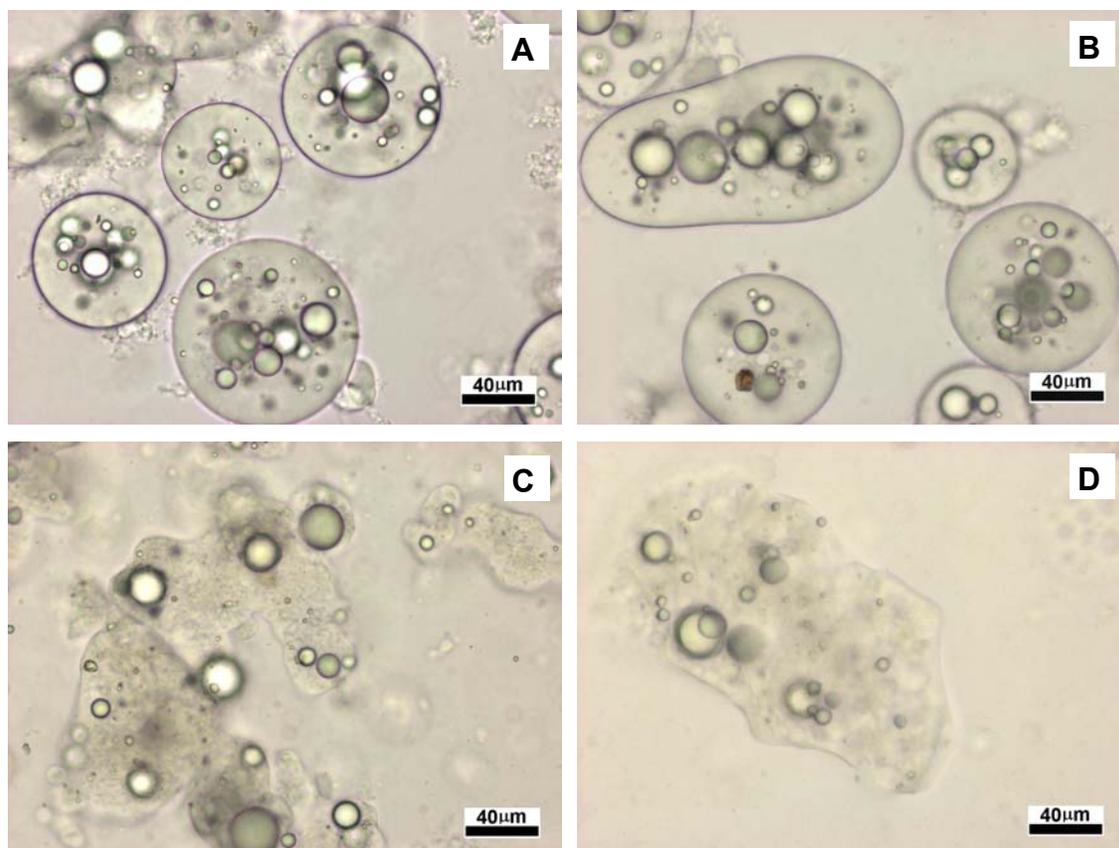
#### 6.3.1. Seleção e produção das dietas

Entre as três formulações aglomeradas produzidas no laboratório (DO – dieta adicionada de óleo; DOPC - dieta adicionada de óleo e recoberta com pectina e cálcio a 1%p/p e DOGPC – dieta adicionada de óleo, recoberta com gelatina a 2% p/p e pectina e cálcio a 1% p/p), as dietas DOPC e DOGPC apresentaram solubilidades em sólidos solúveis/sólidos totais menores que a dieta DO. Para solubilidade em proteínas, a dieta DOPC apresentou o menor valor, sendo escolhida para a avaliação *in vivo* (Figuras 12 e 13).

O pH para formação do complexo coacervado entre a gelatina de peixe e a goma arábica continuou a ser 4,0. A proporção entre os materiais de parede mudou de 1:1 (gelatina bovina:goma arábica) para 1,5:1 (gelatina de peixe:goma arábica), indicando que a gelatina de peixe provavelmente possui um total de cargas, disponíveis para coacervação, menor que a gelatina usada convencionalmente. A ocorrência da coacervação foi evidenciada pela precipitação do material e pela observação em microscópio ótico. Não foi observado óleo na superfície do sistema. Esse coacervado foi monitorado visualmente e ao microscópio por 48h e, como aparentemente não liberou seu conteúdo, mantendo sua estabilidade física, foi selecionado para ser testado nos ensaios *in vivo*.

Sem a inclusão da oleoresina de páprica na formulação, as micropartículas coacervadas apresentaram-se muito transparentes. A quantidade de astaxantina adicionada, em substituição a oleoresina, foi insuficiente para colorir os coacervados, e seu conteúdo não foi aumentado para não saturar as dietas com compostos, que em grandes quantidades, poderiam prejudicar a aceitação das mesmas pelas larvas. A astaxantina é um composto considerado potencialmente atrativo por fornecer cor a diversos microorganismos utilizados como alimentos pelas larvas.

A figura 71 apresenta algumas imagens de micropartículas coacervadas usadas nos experimentos *in vivo*.



**Figura 71:** Imagens obtidas por microscopia ótica de dietas coacervadas produzidas para experimento com larvas de pacu. A: D2 – Parede: gelatina convencional/goma arábica – recheio: óleo de soja e astaxantina; B: D3 – Parede: gelatina convencional/goma arábica – recheio: gordura de peixe e astaxantina; C: D4 – Parede: gelatina de peixe/goma arábica – recheio: óleo de soja e astaxantina; D: D2 – Parede: gelatina de peixe/goma arábica – recheio: gordura de peixe e astaxantina. Barras = 40 µm.

As partículas produzidas com gelatina de peixe apresentam uma estrutura frágil (Figura 76 C e D), não mostrando limites bem definidos, como os coacervados convencionais (Figura 76 A e B). Apesar da aparente fragilidade, os coacervados de gelatina de peixe foram capazes de reter o recheio dentro de sua estrutura, permitindo seu uso nos experimentos.

### 6.3.2. Diâmetro médio das dietas

Os diâmetros médios das dietas utilizadas no ensaio biológico com larvas de pacu são apresentados na Tabela 44.

**Tabela 44:** Diâmetro médio das partículas de dietas coacervadas.

Dieta	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )
D1	361,76 * $\pm$ 4,06** <sup>1</sup>
D2	104,58 $\pm$ 20,12
D3	85,66 $\pm$ 26,64
D4	92,43 $\pm$ 26,55
D5	102,27 $\pm$ 28,04

\* Média; \*\* Desvio Padrão. <sup>1</sup> O desvio padrão apresentado é referente a três leituras do equipamento.

Os diâmetros médios dos coacervados produzidos para o ensaio biológico apresentaram valores muito próximos aos dos outros obtidos no capítulo 5. Como já discutido nos capítulos 4 e 5, o diâmetro médio apresentado pelas micropartículas aglomeradas e coacervadas produzidas nesse trabalho, foram adequados para alimentação de larvas de peixe. [Yúfera et al., 1999; Cahu & Zambonino Infante, 2001; Genodepa et al., 2004; Carvalho et al. 2004; Kvale et al. 2005].

### 6.3.3. Comportamento das larvas durante o oferecimento das dietas inertes

Para esse experimento, a avaliação do comportamento das larvas foi feita subjetivamente, sendo dividida em três partes: adição de estímulo, adição da primeira dose de dieta, adição da segunda dose de dieta. Técnicas nas quais o período de alimentação das larvas é filmado permitem uma avaliação mais objetiva do comportamento. Com o filme, dados como número de botes e ângulo médio de inclinação das larvas, rejeições após o bote, dentre outros, podem ser

estimados e correlacionados com o percentual de ingestão e conseqüente aceitação das dietas.

#### **6.3.3.1. Adição de estímulo químico**

A adição do estímulo químico provocou ligeira agitação em todas as unidades experimentais nos dois primeiros dias de experimentos. Essa ligeira agitação variou desde movimentação no fundo das unidades experimentais, como se as larvas “procurassem” algo, até curto período de mudança de inclinação (pouco tempo após a adição). No terceiro e quarto dias de experimento, essa agitação quase não foi observada. As larvas do grupo controle, que não receberam estímulo, permaneceram calmas, apresentando baixa movimentação.

#### **6.3.3.2. Adição das dietas**

A adição das dietas às unidades experimentais, no geral, provocou agitação acentuada. As larvas movimentaram-se ao longo da coluna de água e tenderam a mudar sua posição de horizontal para ligeiramente inclinadas. Essa atitude pode estar relacionada com o tamanho das partículas (estímulo visual), e também com a sensibilidade das larvas para detectar movimentos ao longo da coluna de água. Para todas as dietas, foi possível observar atitudes predatórias e movimentos bucais por parte das larvas.

Todas as dietas precipitaram rapidamente, sendo que parte delas, permaneceu em suspensão, ao longo do tempo, pela própria movimentação das larvas e pareceram preferidas às partículas depositadas. No entanto, as larvas procuraram e “atacaram” estas também.

Após sete minutos da adição da dieta, foi observada uma diminuição da movimentação nas unidades experimentais para dietas D4 e D5. Para as dietas D1,

D2 e D3, a agitação foi mais intensa e mais demorada, com redução da atividade predatória após 10 minutos, aproximadamente.

Na adição da segunda parte de dieta, o mesmo comportamento foi observado em menor intensidade e por tempo mais curto (5 minutos aproximadamente). Isso pode ser em decorrência da saciedade das larvas ou da rejeição ao alimento.

Foi possível observar, nitidamente, a ação predatória das larvas sobre as partículas de todas as dietas. Para a dieta D1, foi possível observar a rejeição desse alimento, pois várias larvas regurgitaram as partículas. Devido ao tamanho e transparência dos coacervados, foi difícil observar a ingestão e rejeição das partículas.

As larvas que receberam o estímulo químico pareceram ligeiramente mais agitadas que as do controle. Essa diferença é atribuída a estímulos sensoriais que as larvas passam a ter quando expostas à água de eclosão de nauplios de artêmia.

Os comportamentos descritos acima se repetiram em todos os quatro dias de experimento.

#### **6.3.4. *Biometria***

As larvas em seus primeiros estágios de vida, tendem a crescer rapidamente, ganhando peso e aumentando suas dimensões. O peso e o comprimento médios das larvas de pacu, ao longo do tempo de experimento, são apresentados na Tabela 45.

**Tabela 45:** Peso e comprimento médios de larvas de pacu no período de experimentos.

	Dias de vida (dia do experimento)			
	18 (1º dia)	23 (2º dia)	28 (3º dia)	33 (4º dia)
PESO (mg)	8,3* ± 2,0**	13,1 ± 5,3	26,5 ± 1,6	52,7 ± 29,9
TAMANHO (mm)	10,0 ± 1,63	11,2 ± 1,05	13,5 ± 1,9	14,6 ± 2,2

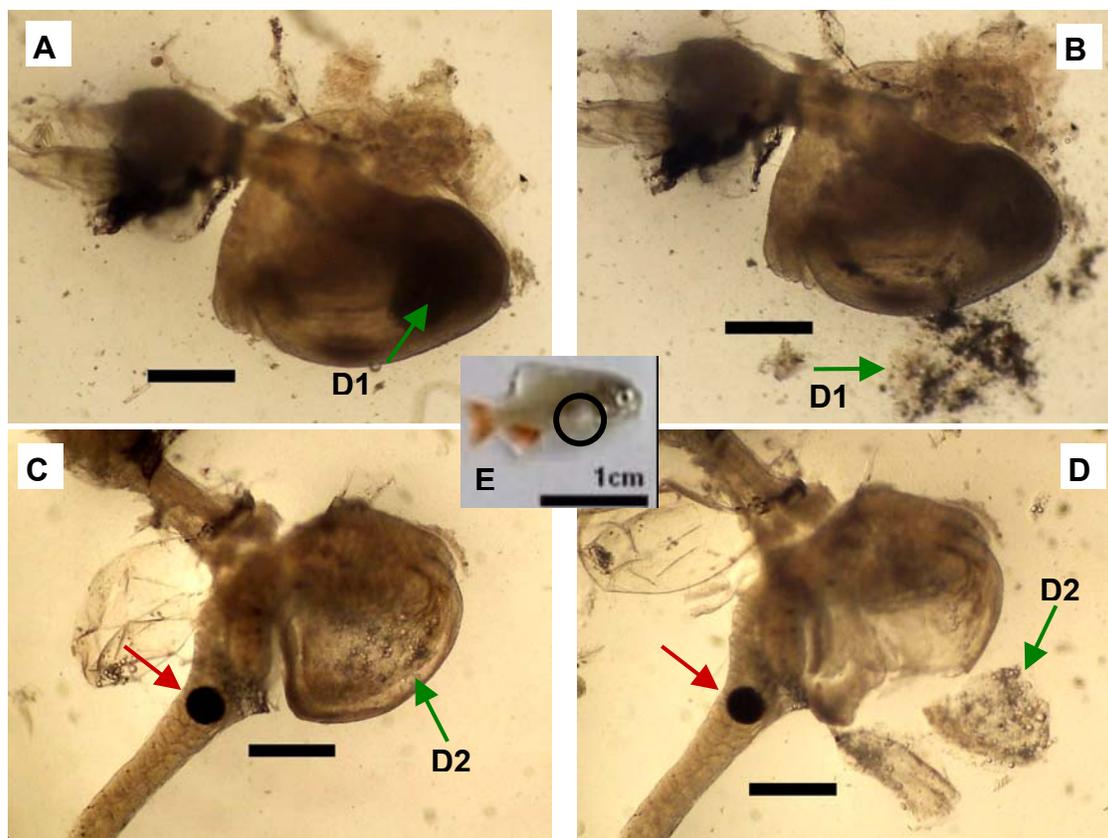
\* Média. \*\* Desvio Padrão.

As larvas praticamente dobraram de peso a cada cinco dias. Além dos valores numéricos, outros aspectos puderam ser observados ao longo do tempo no crescimento das larvas: o desenvolvimento de pequenas nadadeiras ímpares (caudal, anal e dorsal), que eram praticamente inexistentes no início do experimento, o aumento nítido do intestino, que era apenas um “tubo” reto e passou a apresentar dobras depois do segundo dia de experimento, o aumento na complexidade da parede do estômago, que se apresentava praticamente lisa no início e foi tornando-se rugosa com o tempo.

### 6.3.5. Ingestão das dietas

#### 6.3.5.1. Observações visuais em microscópio estereoscópico

A primeira avaliação da ingestão das dietas foi a observação pelo microscópio estereoscópico dos estômagos das larvas. Por serem bem transparentes, eles permitiram a visualização das partículas de dieta em seu interior. Com um pequeno corte as partículas puderam ser removidas de dentro do estômago. A Figura 72 apresenta os estômagos de larvas de pacu contendo algumas das dietas estudadas.



**Figura 72:** Imagens obtidas por aumento em microscópio estereoscópico de estômagos de larvas de pacu contendo algumas das dietas estudadas. A – Dieta desidratada (D1): Estômago fechado; B – Dieta desidratada (D1): Estômago perfurado. C – Dieta coacervada (D2): Estômago fechado; D – Dieta coacervada (D2): Estômago perfurado. E - Imagem reduzida da larva com escala de tamanho (barra = 1 cm). Setas verdes – dietas. Seta vermelha – cisto de Artêmia. Barras = 500 microns.

A dieta desidratada, ao ser removida do estômago, apresentou-se muito fragmentada (Figura 72 - B). No caso dos coacervados, as partículas removidas do estômago das larvas, apresentaram-se agregadas em uma massa única (Figura 72 - D). A alteração do aspecto das dietas no tempo de alimentação (30 minutos), pode ser decorrência de uma possível ação das enzimas digestivas das larvas sobre as dietas.

Apesar das larvas terem sido submetidas a um período de jejum, alguns pedaços de náplios, parcialmente digeridos, puderam ser encontrados. Várias larvas apresentaram cistos de artêmia no seu trato gastrointestinal. Esses cistos representam pequeno percentual não eclodido, e são fornecidos junto com as artêmias nos tanques, sendo ingeridos pelas larvas. Por terem uma espécie de carapaça resistente, os cistos passam pelo trato digestivo das larvas praticamente sem sofrer digestão. A Figura 72 – C e D (seta vermelha) mostra um cisto praticamente intacto no intestino da larva.

**Yufera et al. [1999]** avaliaram micropartículas produzidas por polimerização interfacial, obtendo excelente aceitação pelas larvas, com conseqüentes taxas de crescimento e sobrevivência elevadas. O aspecto das micropartículas em água apresentado pelos autores foi muito semelhante ao observado para as dietas em estudo produzidas por coacervação. Os autores também relatam a pronta digestão das micropartículas, que também formaram uma massa única no estômago das larvas de *gilthead seabream* estudadas.

### 6.3.5.2. Percentual de ingestão

As 10 larvas de cada copo foram examinadas e o número delas que ingeriu a dieta foi determinado e relacionado ao número total. Os percentuais de larvas que ingeriram as dietas testadas são apresentados na Tabela 46.

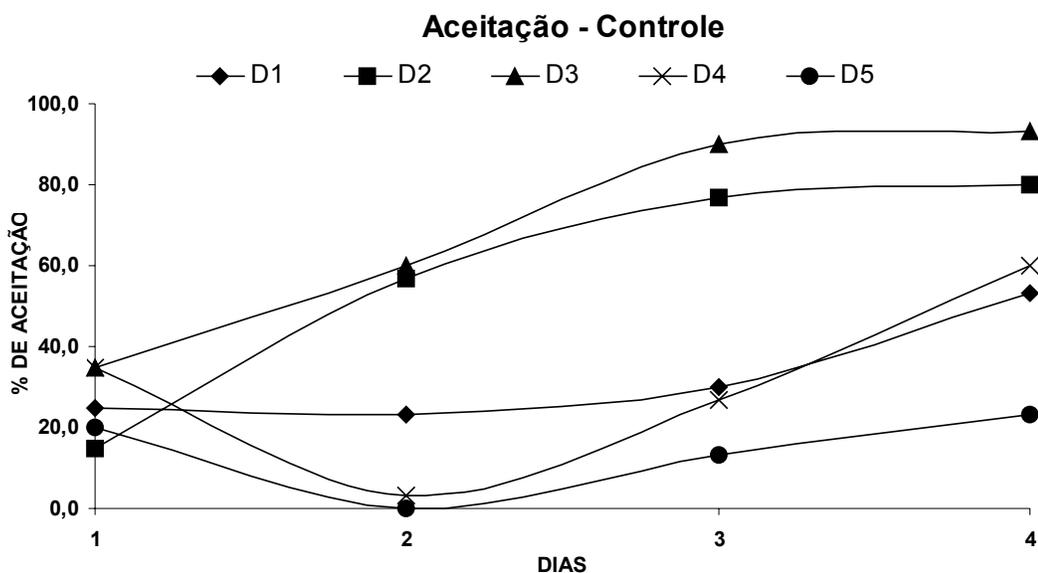
**Tabela 46:** Percentual de aceitação das dietas pelas larvas de pacu ao longo do tempo.

Dietas	Numero de larvas que ingeriram dieta/10 larvas X 100							
	1º dia		2º dia		3º dia		4º dia	
	EQ	C	EQ	C	EQ	C	EQ	C
D1	*40,0 <sup>a/AB</sup>	25,0 <sup>a/A</sup>	23,3 <sup>a/B</sup>	23,3 <sup>a/B</sup>	20,0 <sup>a/B</sup>	30,0 <sup>a/B</sup>	56,7 <sup>a/BC</sup>	53,3 <sup>a/C</sup>
D2	20,0 <sup>a/BC</sup>	15,0 <sup>a/A</sup>	73,3 <sup>a/A</sup>	56,7 <sup>a/A</sup>	73,3 <sup>a/A</sup>	76,7 <sup>a/A</sup>	90 <sup>a/A</sup>	80 <sup>a/AB</sup>
D3	60,0 <sup>a/A</sup>	35,0 <sup>a/A</sup>	63,3 <sup>a/A</sup>	60,0 <sup>a/A</sup>	93,3 <sup>a/A</sup>	90,0 <sup>a/A</sup>	73,3 <sup>a/AB</sup>	93,3 <sup>a/A</sup>
D4	5,0 <sup>a/C</sup>	35,0 <sup>a/A</sup>	36,7 <sup>aAB</sup>	3,0 <sup>a/B</sup>	13,3 <sup>a/B</sup>	26,7 <sup>a/B</sup>	40,0 <sup>a/C</sup>	60,0 <sup>a/BC</sup>
D5	5,0 <sup>a/C</sup>	20,0 <sup>a/A</sup>	0,0 <sup>a/C</sup>	0,0 <sup>a/C</sup>	10,0 <sup>a/B</sup>	13,3 <sup>a/B</sup>	20,0 <sup>a/D</sup>	23,3 <sup>a/D</sup>

\* Valores médios da triplicata. EQ- Estímulo químico (água de náplios de artêmia); C – grupo controle (não recebeu estímulo químico). Letras minúsculas representam a avaliação estatística

entre EQ e C para cada dieta, em cada dia de experimento. As letras maiúsculas representam a avaliação estatística entre as dietas, para cada tratamento (EQ ou C), em cada dia de experimento.

Os gráficos das figuras 73 e 74 apresentaram um resumo do comportamento de ingestão das larvas, ao longo do tempo.



**Figura 73:** Perfil de aceitação das dietas pelas larvas ao longo do tempo (sem adição de estímulo químico – controle).

Inicialmente, todas as dietas do grupo controle tiveram baixa aceitação, apresentando valores entre 15 e 35%, sem diferença estatística entre eles ( $p < 0,05$ ; Tabela 46).

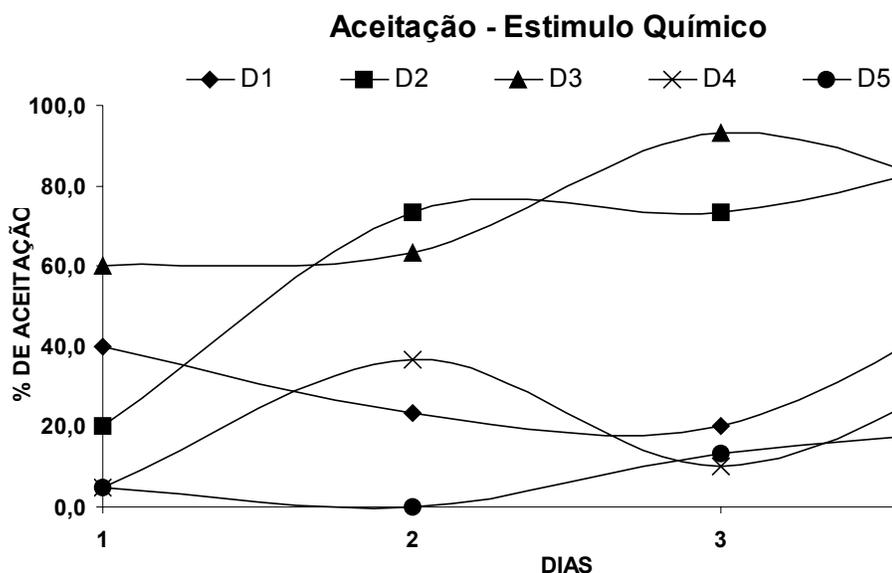
A partir do segundo dia, as dietas D2 e D3 apresentaram as maiores aceitações, diferentes estatisticamente das demais dietas ( $p < 0,05$ ), sendo que D3 atinge 93,3% no quarto dia de experimento.

A dieta D5 apresentou a menor aceitação, a partir do segundo dia, sendo que no quarto dia, essa baixa aceitação foi significativamente diferente das demais dietas ( $p < 0,05$ ). Esperava-se que essa dieta fosse bem aceita, por ter sido produzida com gelatina e gordura de peixe em sua composição. A dieta D3 também continha gordura de peixe e obteve muito boa aceitação. A dieta D4 feita com gelatina de peixe, contendo óleo de soja, não mostrou muita boa aceitação. A

associação dessas observações indica que a gelatina de peixe foi a principal responsável pela baixa ingestão de D5 pelas larvas.

A gelatina de peixe utilizada foi obtida comercialmente como cápsulas para suplementação alimentar. Provavelmente, além da proteína, alguns compostos, como conservantes, poderiam estar presentes na formulação e isso pode ter influenciado negativamente na aceitação dessa gelatina pelas larvas.

A dieta desidratada D2 apresentou aceitação baixa, relativamente estável nos primeiros 3 dias de experimento, aumentando de um valor médio de 26,1 para 53,3% no último dia de ensaio.



**Figura 74:** Perfil de aceitação das dietas pelas larvas ao longo do tempo (com adição de estímulo químico).

Pela avaliação estatística ( $p < 0,05$ , Tabela 46), a adição do estímulo químico não influenciou nas taxas de ingestão de cada dieta, quando comparada a seu respectivo controle, para nenhum dia de experimento.

Os perfis de aceitação das dietas pelas larvas que receberam estímulo químico apresentam-se muito irregulares, com inversões na aceitação ao longo do

tempo. Mesmo com essa irregularidade, excetuando o primeiro dia, as dietas D2 e D3 tiveram as aceitações mais altas e a dieta D5 a mais baixa, como já observado para o controle.

O grupo controle pode mostrar mais claramente quais dietas tiveram melhor aceitação pelas larvas. A adição do estímulo químico tende a influenciar a aceitação das dietas pelas larvas e não aumenta, necessariamente, essa aceitação, podendo algumas vezes, ter efeito negativo e reduzi-la.

Esse experimento permitiu mostrar que as dietas coacervadas produzidas com gelatina convencional apresentaram muito boa aceitação pelas larvas, sendo potencialmente bons suportes para veiculação de nutrientes. Apesar do tamanho reduzido, quando comparado às artêmias, os coacervados mimetizam mais esses organismos do que as dietas desidratadas. Provavelmente a textura dos coacervados seja mais atrativa para as larvas do que dietas mais rígidas. Além disso, aparentemente os coacervados sofrem ação das enzimas digestivas das larvas, o que é uma vantagem quanto ao rompimento da matriz das partículas e liberação do conteúdo de nutrientes que elas podem veicular.

## 7. CONCLUSÕES

O uso da aglomeração para a dieta desidratada em *spray dryer*, promoveu um aumento substancial do diâmetro médio das partículas, produzindo material com tamanho adequado para alimentação de larvas de peixes. A adição de óleo e cobertura polimérica na aglomeração da dieta desidratada reduziu a solubilidade em sólidos solúveis e proteína solúvel desse material. No entanto, em comparação às dietas comerciais, as solubilidades das dietas aglomeradas ainda permaneceram altas. A morfologia dos aglomerados detectou falhas no recobrimento, responsável pela baixa eficiência na retenção dos nutrientes da dieta. O aumento do diâmetro das partículas aglomeradas levou a uma rápida sedimentação destas. A atividade de água para dieta sem recobrimento foi típica de produtos desidratados. Com a aglomeração os valores de  $A_w$  aumentaram em virtude da pulverização de água das soluções de pectina e cálcio.

A coacervação complexa entre gelatina e goma arábica foi otimizada para um pH de coacervação de 4,0 e 2,5% de sólidos totais de parede.

Pela secagem em estufa, não foi possível a obtenção de micropartículas individualizadas. A secagem em *spray dryer* provocou a destruição das micropartículas sem reticulação. Para as amostras reticuladas, a secagem foi possível, com manutenção da forma esférica das partículas após o processamento. O rendimento do processo de secagem por *spray dryer* foi muito baixo, dentro das condições estudadas. A liofilização permitiu a secagem, com manutenção da forma esférica, para todas as amostras, incluindo aquela sem reticulação.

Os diâmetros médios das várias amostras coacervadas úmidas e desidratadas apresentaram-se na faixa de 39,1 a 164  $\mu\text{m}$ . As amostras desidratadas por liofilização e *spray dryer* reabsorveram água com sucesso, apresentando integridade da parede e forma esférica característica. A morfologia apresentou os coacervados como micropartículas esféricas e multinucleadas. A

sedimentação das micropartículas coacervadas foi rápida, associada à densidade alta da matriz.

As liberações de oleoresina de páprica, para as amostras úmidas de micropartículas coacervadas, foram altas, não apresentando muita influência da reticulação sobre seus valores (faixa de 67,9 e 99,3% para 120 minutos de permanência no etanol). Todas as amostras desidratadas apresentaram liberações inferiores a 37% após 120 minutos de permanência no etanol. A liberação dos compostos solúveis, retidos nas micropartículas lipídicas (glicose ou isolado protéico de soro de leite), encapsuladas nos coacervados, foi alta para glicose e relativamente baixa para a proteína.

No ensaio biológico *in vivo*, feito para avaliar a aceitação das micropartículas, os coacervados utilizando gelatina bovina na parede e contendo gordura de peixe ou óleo de soja apresentaram as maiores taxas de ingestão, seguidos pela dieta aglomerada. A adição de estímulo químico, não causou efeito significativo na ingestão das dietas pelas larvas. Os resultados obtidos indicaram as micropartículas coacervadas como potenciais na utilização como dieta inerte. No entanto, as micropartículas ainda precisam de otimização em seu balanço nutricional para atenderem as necessidades de crescimento das larvas de pacu.

## 8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados experimentais obtidos indicaram algumas linhas potenciais para continuidade do presente trabalho:

1. Investir na otimização da insolubilização por revestimento de aglomerados obtidos por leito fluidizado. As formulações utilizadas também necessitam de ajustes.
2. Testar novos agentes reticulantes ao glutaraldeído e avaliar o efeito reticulante na porosidade das partículas produzidas. Aprofundar o estudo da utilização de transglutaminase.
3. Estudar a secagem, por *spray dryer*, da suspensão das partículas reticuladas em soluções contendo agentes espessantes e seu efeito na integridade das partículas submetidas à essa secagem. A utilização de aparelhos de secagem de maior porte e com atomizadores centrífugos deve ser investigada.
4. Estudar diferentes formulações, especialmente tensoativos, na produção de micropartículas de gordura contendo compostos hidrofílicos de baixo peso molecular e seus efeitos na liberação desses compostos. Estudar alternativas para melhorar a distribuição das partículas de gordura no interior das partículas coacervadas.
5. Desenvolver formulações nutricionalmente capazes de sustentar o crescimento das larvas, utilizando extratos protéicos de peixe na formulação.
6. Produzir gelatina de peixe e caracterizá-la comparativamente à gelatina convencional, estudando possíveis modificações no sentido de aumentar a força desta proteína. A partir dessas informações básicas, otimizar a produção de coacervados, usando gelatina de peixe ao invés da gelatina convencional.
7. A partir dos experimentos de liberação tentar ajustar modelos preditivos aos dados experimentais.

## 9. BIBLIOGRAFIA

ALLARCÓN F.J.; MOYANO, F.J.; DÍAS, M. FERNÁNDEZ-DÍAS, C.; YÚFERA, M. Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feeding of marine fish larvae using in vitro digestibility techniques. *Aquaculture Nutrition* v. 5, p. 107- 113, 1999.

AL-MAAIEH, A.; FLANAGAN, D.R. Salt and cosolvent effects on ionic drug loading into microspheres using an O/W method. *Journal of Controlled Release*, v. 70, p. 169–181, 2001.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), Official methods of analysis, 16th ed., Arlington, 1998, v. 1-2.

APOSTILA DE PISCICULTURA, <http://www.pescar.com.br/piscicultor/apostila.htm#item6>. Acesso em junho de 2003.

ARIMOTO, M.; ICHIKAWA, H.; FUKUMORI, Y. Microencapsulation of water-soluble macromolecules with acrylic terpolymers by the Wurster coating process for colon-specific drug delivery. *Powder Technology*, v. 141, p. 177– 186, 2004.

ARTEMIA INTERNATIONAL LLC Technical Information Golden Pearls Larval Diets. [http://artemia-international.com/tech\\_larval\\_diets.html#gp](http://artemia-international.com/tech_larval_diets.html#gp). Acesso em junho de 2003.

BACHTSI A.R.; KIPARISSIDES, C. Synthesis and release studies of, oil, containing poly(vinyl alcohol) microcapsules prepared by coacervation. *Journal of Controlled Release*, v.38; p.49,58, 1996.

BAKAN, J.A. Microencapsulation of foods and related products. *Food Technology*, Chicago, 34-44, 1973.

BARANIAY M.; SZABOLCS J. Determination, by reduction, of the red and total pigment content in paprika products. *Acta Alimentaria*, v.5, p.87-105, 1976.

BARBOSA, C.M.S.; MORAIS H.A.; DELVIVO F.M.; MANSUR H.S. OLIVEIRA M.C. SILVESTRE M.P.C. Papain hydrolysate of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, v. 84, p. 1891-1900, 2004

BASKERVILLE-BRIDGES, B.; KLING, L.J. Development and evaluation microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. *Aquaculture Nutrition*, v. 6, p. 171-182, 2000.

BEPPU, M. M.; ARRUDA E. J. E SANTANA C. C. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. *Polímeros* vol. 9 São Carlos, 1999.

BERRILLA, I.K.; PORTER, M.J.R.; BROMAGE, N.R. The influence of dietary lipid inclusion and daily ration on growth and smoltification in 1+ Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquaculture*, v. 242, p. 513–528, 2004

BERTAN, L. C. Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2003, 157p.

BERTOLINI, A. C. Estabilidade de óleo essencial de laranja, linalol e citral microencapsulados em goma arábica por atomização. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 1999, 82p.

BIACS P.A.; DAOOD H.G.; PAVISA A.; HAJDU F. Studies on the carotenoid pigments of paprika (*capsicum annuum* L. var sz-20) *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 37, p.350-353, 1989.

BITANCOURT. E [.http://www.sbz.org.br/scripts/noticiasler.asp?Cod\\_Not=269](http://www.sbz.org.br/scripts/noticiasler.asp?Cod_Not=269). Acesso em junho de 2003.

BLIGH, E. G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry Physiology*. v. 46, n.1, p. 31 – 37, 1959.

BORGES, P.; PINO, J.A.; FERNÁNDEZ, N. Obtención de oleoresina de pimentón Dulce. Evaluación de solventes de extracción. *Alimentaria*, Octubre, p. 59-60, 1997.

BOUILLOT, P.; UBRICH, N.; SOMMER, F.; DUC, T.M.; LOEFFLER, J-P.; DELLACHERIE, E. Protein encapsulation in biodegradable amphiphilic microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 181, p. 159–172, 1999.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* n. 72, p. 248-254, 1976.

BRAZEL C S.; PEPPAS N A. Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers. *Polymer*, v. 40, p. 3383–3398, 1999.

BUCHAL, M.A.; LANGDON, C.J. Evaluation of lipid spray beads for the delivery of water-soluble materials to a marine suspension-feeder, the Manila clam *Tapes philippinarum* (Deshayes 1853). *Aquaculture Nutrition*, v.4, p. 263-274, 1998.

BUFFO, R. A.; PROBST, K.; ZEHENTBAUER, G.; REINECCIUS, G. A. Effects of agglomeration on the properties of spray-dried encapsulated flavours. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 17, p. 292-299, 2002.

BUFFO, R.A.; REINECCIUS, G.A.; OEHLERT, G.W. Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acácia in beverage emulsions. *Food Hydrocolloids*, v. 15, p. 53-66, 2001.

BURGESS DJ, PONSART S beta-Glucuronidase activity following complex coacervation and spray drying microencapsulation *Journal of Microencapsulation* v.15, n. 5, p. 569-579, 1998.

CAHU, C.; ZAMBONINO INFANTE, J. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, v. 200, n. 1-2, p. 161 – 180, 2001.

CARDOSO, F. S. N. Produção de microencapsulados de amido com recobrimento em leite fluidizado. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000, 65p.

CARVALHO, A.P.; SÁ, R.; OLIVA-TELESA, A.; BERGOT, P. Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cyprinus carpio*) during early larval stages. *Aquaculture*, v. 234, p. 319–333, 2004.

CARVALHO, R. A. Elaboração e caracterização de filmes à base de gelatina modificada enzimática e quimicamente. Tese. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002, 227p.

CASTELL, J.D.; KENNEDY, E.J.; ROBINSON, S.M.C.; PARSONS, G. J.; BLAIR, T.J.; GONZALEZ-DURAN, E. Effect of dietary lipids on fatty acid composition and metabolism in juvenile green sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*, v. 242, p. 417–435, 2004.

CHAMBI, H.N.M. Desenvolvimento de filmes a partir de caseína e gelatina modificadas enzimaticamente com tripsina e transglutaminase. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004, 99p.

CHEN, H.M.; MEYERS, S.P. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. *Journal of Food Science*, v. 47, p.892-896, 1982.

CHO, Y.H.; SHIM, H.K.; PARK J. Encapsulation of fish oil by an enzymatic gelation process using transglutaminase cross-linked proteins. *Journal of Food Science*, v.68, n.9, p.2717-2723.

CHU F.L.E.; OZKIZILCIK S. Acceptability of complex microencapsulated diet by striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 237, p. 1-9, 1999.

DEWETTINCK, K.; DEROO, L.; MESSENS, W. HUYGHEBAERT, A. Agglomeration tendency during top-spray fluidized bed coating with gums. *Lebensm-Wiss. U. Technology*, v.31, p. 576-584, 1998.

DEWETTINCK, K.; HUYGHEBAERT, A. Fluidized bed coating in food technology. *Trends in Food Science & Technology*, n. 10, p. 163 – 168, 1999.

DEWETTINCK, K.; VISSCHER, A.D.; DEROO, L.; HUYGHEBAERT, A. Modeling the steady-state thermodynamic operation point of top-spray fluidized bed processing. *Journal of Food Engineering*, v39, p. 131-143. 1999.

DIAS, N.L. Estudo do perfil de textura instrumental e sensorial em géis de pectina de baixo teor de esterificação, alginato e gelatina. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999. p. 148.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influences on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, v.17, p. 25-39, 2003.

DOU, S.; SEIKAI, T.; TSUKAMOTO, K. Feeding behaviour of japanese flounder larvae under laboratory condition. *Journal of Fish Biology*, v.56, p. 654-666, 2000.

DUCEL V, RICHARD J, SAULNIER P, POPINEAU Y, BOURY F Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets *Colloids And Surfaces Aphysicochemical And Engineering Aspects*. v. 232, n. 2-3, p. 239-247, 2004.

ESPINOLA FILHO, A. Utilização do resíduo sólido de peixes, camarões e bivalves como ingrediente de ração para aquicultura. Tese – Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo – SP, 1999, 225p.

FANGER, G.O. Microcapsulation: A brief history and introduction in: *Microencapsulation: Processes and applications*. VANDEGAER, J.E. ed Plenum Press, New York, 1974. p. 1-20.

FAO - The state of world fisheries and aquaculture – 2000 <http://www.fao.org/DOCREP/003/X8002E/x8002e00.htm#TopOfPage>. Acesso em junho de 2003.

FAO - Trends in global aquaculture production: 1984 – 1996. <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/FISHERY/trends/aqtrend.asp>. Acesso em junho de 2003.

FAO inland Water Resourch and Aquaculture Service. Review of the state of world aquaculture. *FAO Fisheries Circular*. N. 886, Rev 2, Rome, 2003, 95p.

FENNEMA, O. R. Water and Ice in: Food Chemistry. FENNEMA, O. R. ed Marcel Dekker Inc, New York, 1996. p. 17-94.

FERNANDEZ-DIAZ, C.; YÚFERA, M.; Detecting growth in seabream, *Sparus aurata* L., larvae fed microcapsules. *Aquaculture*, v. 153, p. 93-102, 1997.

FERREIRA, L.A.M.; SEILLER, M.; GROSSIORD, J.L.; MARTY, J.P.; WEPIERRE, J. Vehicle influence on in vitro release of glucose: w/o, w/o/w and o/w systems compared. *Journal of Controlled Release*, v. 33, p. 349-356, 1995.

GARCIA-ORTEGA, A.; HUIJSMAN E.A. Evaluation of protein quality in microbound starter diets made with decapsulated cysts of *Artémia* and fishmeal for fish larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, v.32, n.3, p. 317-329, 2001.

GARCIA-ORTEGA, A.; VERRETH, J. A. J.; COUTTEAU, P.; SEGNER H.; HUIJSMAN E.A.; SORGELOOS P. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artémia* at different developmental stages. *Aquaculture*, v. 161, p. 501-514, 1998.

GENODEPA J., SOUTHGATE P. C., ZENG C. Diet particle size preference and optimal ration for mud crab, *Scylla serrata*, larvae fed microbound diets *Aquaculture* v. 230, n. 1-4, p. 493-505, 2004.

GERRARD, J. A. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in Food Science & Technology*, v. 13, p. 391-399, 2002.

GERRARD, J.A.; BROWN, P.K.; FAYLE, S.E. Maillard crosslinking of food proteins I: the reaction of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehyde with ribonuclease. *Food Chemistry*, v. 79, p. 343-349, 2002.

GOLDSZAL, A.; BOUSQUET, J. Wet agglomeration of powders: from physics toward process optimization. *Powder Technology*. n. 117, p. 221 - 231. 2001.

GONZÁLEZ, J. E.; MATEO, M.M.; CASTELLANOS, R. V.; AMO SAUS, M.; GÓMEZ LADRÓN de GUEVRA, R. Evaluación de la calidad de pimentones procedentes de variedades seleccionadas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Alimentaria*, Octubre, p. 81-84, 1997.

GOODWIN J.T.; SOMEVILLE G.R. Physical methods for preparing microcapsules in: *Microencapsulation: Processes and applications*. VANDEGAER, J.E. ed Plenum Press, New York, p. 1-20, 1974..

GREGORY G.K.; CHEN T.S.; PHILLIP T. Quantitative analysis of carotenoids and carotenoid esters in fruits by HPLC: red bell peppers. *Journal of food Science*, v.52, p. 1071-1073, 1987.

GUIGNON, B.; DUQUENOY, A.; DUMOULIN, E.D. Fluid bed encapsulation of particles: Principles and practice. *Drying Technology*, n. 20, v. 2, p. 419 – 447, 2002.

GUIGNON, B.; REGALADO, E.; DUQUENOY, A.; DUMOULIN, E.D. Helping to choose operating parameters for a coating fluid bed process. *Powder Technology* n. 130, p. 193 – 198, 2003.

GUTHRIE, K.M.; RUST, M.B.; LANGDON, C.J.; BARROWS, F.T. Acceptability of various microparticulate diets to first-feeding walleye *Stizostedion vitreum* larvae. *Aquaculture Nutrition*, v. 6, p. 153-158, 2000.

HASHIDZUME, A.; OHARA, T.; MORISHIMA, Y. Coacervation of Hydrophobically Modified Polyanions by Association with Nonionic Surfactants in Water, *Langmuir*, v. 18, p. 9211-9218, 2002.

HEGER, R. Release kinetics/mechanism in: *Microencapsulation of Food Ingredients*, VILSTRUP, P. Heatherhead publishing, p. 55 – 75, 2001, 255p.

HEMATI, M.; CHERIF, R.; SALEH, K.; PONT, V. Fluidized bed coating and granulation: influence of process-related variables and physicochemical properties on the growth kinetics. *Powder Technology*, v. 130, p. 18– 34, 2003.

HORNERO-MENDEZ D. MINGUEZ-MOSQUERA M.I. Rapid spectrophotometric determination of red and yellow isochromic carotenoid fractions in paprika and red pepper oleoresins. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p.3584-3588, 2001.

IVESON, S.M.; LITSTER, D.J.; HAPGOOD, K.; ENNIS, B. Nucleation, growth and breakage phenomena in agitated wet granulation process: a review. *Powder Technology*, v.117, p. 3-29, 2001.

IWANAGA. K.; YABUTA, T.;KAKEMI, M.; MORIMOTO, K.;TABATA, Y.;IKADA, Y. Usefulness of microspheres composed of gelatin with various cross-linking density. *Journal of microencapsulation*, v. 20, n. 6, p.767–776, 2003.

JACKSON, L.S.; LEE, K.. *Microencapsulation and the food industry*. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie Food Science & Technology*. v.24, p. 289-297, 1991.

JAYAKRISHNAN A.; JARMEELA R.S. Glutaraldehyde as a fixative in bioprotheses and drug delivery matrices, *Biomaterials*, v.17, p. 471-481, 1996.

JÉGAT, C.; TAVERDET, J. L. Stirring speed influence study on the microencapsulation process and on the drug release from microcapsules. *Polymer Bulletin*, n. 44, p. 345 – 351, 2000.

JENNING V.; SCHAFER-KORTING M.; GOHLA S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *Journal of Controlled Release*, v.66, p.115-126, 2000.

JONES, D.M. Controlling particle size and release properties. Chapter 17. American Chemical Society, 1988.

JONO, K.; ICHIKAWA, H.; MIYAMOTO, M.; FUKUMORI, Y. A review of particulate design for pharmaceutical powders and their production by spouted bed coating. *Powder Technology*, v. 113, p. 269–277, 2000.

JOSEPH, I.; VENKATARAM, S. Indomethacin sustained release from alginate-gelatin or pectin-gelatin coacervates. *International Journal of Pharmaceutics*, v.126, p. 161-168, 1995.

KAREL, M. Encapsulation and controlled release of food components in: *Biotechnology and Food Processes Engineering*. SCHWARTEZBERG, H.G.; RAO, M. A. Eds IFT Basic Symposium Series. Marcel Dekker, 1990, p. 277-293.

KERSTENS S.; MURRAY B.S.; DICKINSON E. Confocal microscopy of heat-induced aggregation and gelation of b-lactoglobulin in presence of non-ionic surfactant. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 625–633, 2005.

KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, v. 200, p. 181–201, 2001.

KOLKOVSKI, S.; KOVEN, W.; TANDLER, A. The mode of action of Artemia in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*, v. 155, p. 193-205, 1997.

KRUIF C.G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, v.15, p.555-563, 2001.

KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; VRIES R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 9, p. 340–349, 2004.

KVALE A.; YÚFERA M.; NYGARD E.; AUSLAND, K.; HARBOE, T; HAMRE K. Leaching properties of three different microparticulate diet and preference o the diets in cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture*, on line in 1 July, 2005.

LAMPRECHT A., SCHAEFER U. and LEHR C.-M. Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for  $\omega$ 3 unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition *Journal of Microencapsulation*, v. 18, n. 3, p. 347-357, 2001.

LAMPRECHT, A.; SHÄFER, U.F.; LEHR, C.-M. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 49, p. 1 – 9, 2000.

LANGDON, C. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae . *Aquaculture*, v. 227, p. 259–275, 2003.

LANGDON, C.J. Preparation and evaluation of protein microcapsules for a marine suspension-feeder, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, v.102, p. 217-224, 1989.

LANGDON, C.J.; BUCHAL, M.A. Comparison of lipid-walled microcapsules and lipid spray beads for the delivery of water-soluble, low-molecular-weight materials to aquatic animals. *Aquaculture Nutrition*, v.4, p. 275-284, 1998.

LATHA, M.S.; JAYAKRISHNAN A. Glutaraldehyde cross-linked bovine casein microspheres as a matrix for the controlled release of theophylline: In-vitro studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 46, p. 8-13, 1994.

LEE, S. J.; ROSENBERG, M. Microencapsulation of theophylline in composite wall system consisting of whey proteins and lipids. *Journal of Microencapsulation*, v. 18, p. 309-321, 2001.

LEE, S.J.; ROSENBERG, M. Whey protein-based microcapsules prepared by double emulsification and heat gelation. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v. 33, p. 80-88, 2000.

LINK, K.C.; SCHLUNDER, E.U. Fluidized bed spray granulation and film coating a new method for the investigation of the coating process on a single sphere. *Drying Technology*, v.15, n.6-8, p. 1827-1843, 1997.

LULEVICH, V.L.; RADTCHENKO, I.L.; SUKHORUKOV, G.B.; VINOGRADOVA, O.I. Mechanical properties of polyelectrolyte microcapsules filled with a neutral polymer. *Macromolecules*, v. 36, p. 2832-2837, 2003.

MAGGE, E.L. JR., OLSON, N.F. Microencapsulation of cheese ripening systems: Formation of microcapsules. *Journal of Dairy Science*, v. 64, p. 600-610, 1981.

MAGGE, E.L. JR., OLSON, N.F. Microencapsulation of cheese ripening systems: Stability of microcapsules. *Journal of Dairy Science*, v. 64, p. 611-615, 1981.

MARCHETTI, M.; TOSSANI, N.; MARCHETTI, S.; BAUCE G. Leaching of crystalline and coated vitamins in pelleted and extruded feeds. *Aquaculture*, v. 171, n. 1-2, p. 83-92, 1999.

MARTINS, F. Estudo do processo de encapsulação do bioaroma de gorgonzola em b-ciclodextrina e em lipossomas. Tese. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003, 145p.

MENGER, F. M.; PERESYPKIN, A. V.; CARAN, K. L.; APKARIAN, R. P. A Sponge Morphology in an Elementary Coacervate. *Langmuir*, v. 16, p. 9113-9116, 2000.

MENGER, F.M.; SYKES, B.M. Anatomy of a coacervate. *Langmuir*, n. 14, p. 4131-4137, 1998.

MILLAMENA, O.M.; TERUEL, M.B.; KANAZAWA, A., TESHIMA, S. Quantitative dietary requirements of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and tryptophan. *Aquaculture*, v. 179, p. 169–179, 1999.

MORAIS, S.; CONCEIÇÃO, L.E.C.; DINIS, M.T.; RØNNESTAD, I. A method for radiolabeling *Artemia* with applications in studies of food intake, digestibility, protein and amino acid metabolism in larval fish. *Aquaculture*, v. 231, p. 469–487, 2004.

MORT, P.R.; CAPECI, S.W.; HOLDER, J. W. Control of agglomerate attributes in a continuous binder-agglomeration process. *Powder Technology*, v. 117, p. 173–176, 2001.

MUKAI-CORRÊA R.; PRATA, A.S.; ALVIM I. D.; GROSSO, C. R. F. Caracterização de Microcápsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por geleificação iônica. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.8, n.1, p. 73-80, 2005.

MUKAI-CORRÊA, R.; PRATA, A.S.; ALVIM I.D; GROSSO C.R.F. Controlled release of Protein from hydrocolloid gel microbeads before and after drying. *Current Drug Delivery*, v 1, n. 3, p265-273, 2004

MUKAI-CORRÊA. R. Preparo e caracterização de microcapsulas obtidas por polimerização ionica para alimentação de larvas de peixe. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2003, 173p.

MWANGI, J. W.; OFNER, C. M. Crosslinked gelatin matrices: release of a random coil macromolecular solute. *International Journal of Pharmaceutics* xxx, xxx–xxx, 2004.

NAKAGAWA K.; IWAMOTO S.; NAKAJIMA, M.; SHONO A.; SATOB K. Microchannel emulsification using gelatin and surfactant-free coacervate microencapsulation. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.278, p.198-205, 2004.

NOKHODCHI, A.; NOROUZI-SANI S.; SIAHI-SHADBAD, M.R.; LOTFIPOOR F.; SAEEDI M. The effect of various surfactants on the release rate of propranolol hydrochloride from hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)-Eudragit matrices. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.54, p. 349-356, 2002

NORI, M. A. Ingredientes e aditivos microencapsulados na indústria de alimentos. *Engenharia de Alimentos*. São Paulo, v. 1, p. 33-34, 1996.

NUSSINOVITCH A. Pectins. In: *Hydrocolloid applications – Gum technology in the food and other industries*. First edition. London, UK: Ed. Chapman & Hall, 1997, 354p.

OBALDO, L.G.; DIVAKARAN, S.; TACON A. G. Method for determining the physical stability of shrimp feeds in water. *Aquaculture Research*, v. 33, 369-377, 2002.

OFNER III C. M.; BUBNIS W.A. Chemical and swelling evaluation of amino groups cross-linking in gelatin and modified gelatin matrices. *Pharmaceutical Research*, v.13, p. 1821-1827, 1996.

ONAL U, LANGDON C. Characterization of lipid spray beads for delivery of glycine and tyrosine to early marine fish larvae. *Aquaculture*, v. 233, n. 1-4. p. 495-511, 2004.

ONAL U, LANGDON C. Lipid spray beads for delivery of riboflavin to first-feeding fish larvae. *AQUACULTURE*, v. 233, n.1-4, p. 477-493, 2004.

ONAL U.; LANGDON, C.J. Development and characterization of complex particles for delivery of amino acids to early marine fish larvae. *Marine Biology*, v.146, p. 1031-1038, 2005.

ONEDA, F.; RÉ, M.I. The effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dried microspheres containing organic salts. *Powder Technology*, v. 130, p. 377– 384, 2003.

OSUNA-GARCIA, J. A.; WALE, M. M.; WADDELL, C. A. Natural antioxidants for preventing color loss in stored paprika. *Journal of Food Science*, v. 62, n. 5, p. 1017-1021, 1997.

PAPATRYPHON, E.; SOARES, J.H. JR. Identification of feeding stimulants for striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture*, v. 185, p. 339–352, 2000.

PAPO CIÊNCIA, Universidade Federal de Santa Catarina, <http://www.papociencia.ufsc.br/peixes.html>. Acesso em junho de 2003.

PEARNCLOB, N.; BODMEIER, R. Coating of pellets with micronized ethylcellulose particles by a dry powder coating technique. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 268, p. 1–11, 2003.

PEDROZA-ISLAS R.; ALVAREZ-RAMIREZ, J.; VERNON-CARTER E.J. Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation – II: Dissolution and floatability kinetics as selection criteria. *Food Research International*, v.33, p.119-124, 2000.

PEDROZA-ISLAS, R.; GALLARDO, P.; VERNON-CARTER, E.J.; GARCÍA-GALANO, T.; ROSAS, C.; PASCUAL C.; GAXIOLA, G. Growth, survival, quality and digestive enzyme activities of larval shrimp fed microencapsulated, mixed and live diets. *Aquaculture Nutrition*, v. 10, p. 167-173, 2000.

PESQUISA AGROPECUÁRIA – PECUÁRIA – PISCICULTURA  
<http://www.agridata.mg.gov.br/alipeixe.htm> ACESSO EM JULHO/2004.

PEZZATO L.E.; MOURA M.A.M; BARROS M.M.; PEZZATO A.C.; CANTELMO A.O. Physical stability of pellets protected by different waterproofed products. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v.32 , n. 7, p. 731-737, 1997.

PISCICULTURA, <http://www.pantanal-ms.com.br/Piscicultura.html>.

POLK A.; AMSDEN B.; YAO K.; PENG, T.; GOOSEN, M.F.A. Controlled released of albumin from chitosan-alginate microcapsules. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 83, p. 178-185, 1994.

POPPE, J. Gelatin, in *Thickening and gelling agents for food*, NY, Ed. Alan Imeson, Blackie Academic & Professional, ch.7, p. 144-168, 1997.

POTHAKAMURY, U.R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science & Technology*, v. 6, p. 397-406, 1995.

RAHMAN, N.A.; MATHIOWITZ, E. Localization of bovine serum albumin in double-walled microspheres. *Journal of Controlled Release*, v. 94, p. 163–175, 2004.

RÉ, M. I.; BISCANS, B. Preparation of microspheres of ketoprofen with acrylic polymers by a quasi-emulsion solvent diffusion method. *Powder Technology*, v. 101, p. 120-133, 1999.

RÉ, M.I. Microncapsulation by spray drying. *Drying Techology*, v. 16, p. 1195-1236, 1998.

REINECCIUS, G.A. Spray drying of food flavors. In: *Flavor Encapsulation*, RISCH, S.J., REINECCIUS, G.A., Eds, ACS Symposium Series 370, American Chemical Society: Washington DC, 1988, pp 55-64.

REMUNAN-LÓPEZ, C.; BODMEIER, R. Effect of formulation and process variables on the formation of chitosan-gelatin coacervates. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 135, p. 63-72, 1996.

RIBEIRO DOS SANTOS, I.; RICHARD J.; PECH, B.; THIES, C.; BENOIT, J.P. Microencapsulation of protein particles within lipids using a novel supercritical fluid process. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 242, p. 69-78, 2002.

RIGO, N. Páprica na cozinha de Caras. *Caras*, Ed. Histórica n. 322, ano 07, n. 01, 2001.

RODRIGUES, A.F.R. Preparo, caracterização e avaliação funcional de microcapsulas obtidas por spray drying, contendo extrato de café, crioconcentrado. Tese, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2004, 240p.

RODRIGUES-HUEZO M.E.; PREDROZA-ISLAS R.; PRADO-BARRAGAN L.A.; BERISTAIN C.I. VERNON-CARTER E.J. Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science*, v. 69, E351-E359, 2004.

ROSSETTI, D.; SIMONS, S.J.R. A microscale investigation of liquid bridges in the spherical agglomeration process. *Powder Technology* v.130, p. 49 – 55, 2003.

SALEH, K.; STEINMETZ, D.; HEMATI, M. Experimental study and modeling of fluidized bed coating and agglomeration. *Powder Technology*, n. 130, p. 116 – 123, 2003.

SALES, J.; JANSSENS, G.P.J. Nutrient requirements of ornamental fish. *Aquatic Living Resources*, v.16, p. 533–540, 2003.

SANTINHO A. J.P., PEREIRA, N. L.; FREITAS O.; COLLETT, J.H. Influence of formulation on the physicochemical properties of casein microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 186 p. 191-198, 1999.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 38, p. 689 – 753, 1998.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; THOMAS, F.; HARDY, J. Complex coacervation between b-lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, v. 13, p. 483 – 496, 1999.

SCHOLIK, A.R.; LEE, U-S; CHOW, C.K.; YAN, H.Y. Dietary vitamin E protects the fathead minnow, *Pimephales promelas*, against noise exposure. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, v. 137, p. 313–323, 2004.

SECRETARIA DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO [http://www.sa.df.gov.br/prorural\\_projeto\\_piscicultura.html](http://www.sa.df.gov.br/prorural_projeto_piscicultura.html). Acesso em 08/06/03.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SHI, M.; YANG, Y-Y; CHAW, C-S; GOH, S-H; MOOCHHALA, S. M.; NG, S.; HELLER, J. Double walled POE/PLGA microspheres: encapsulation of water-soluble and water-insoluble proteins and their release properties. Journal of Controlled Release, v. 89, p. 167–177, 2003.

SINCHAIPANID, N.; JUNYAPRASERT, V.; MITREVEJ, A. Application of hot-melt coating for controlled release of propranolol hydrochloride pellets. Powder Technology, v. 141, p. 203-209, 2004.

SMITH, D.M.; HUNTER, B.J.; ALLAN, G.L.; ROBERTS, D.C.K.; BOOTH, M.A.; GLENCROSS, B.D. Essential fatty acids in the diet of silver perch (*Bidyanus bidyanus*): effect of linolenic and linoleic acid on growth and survival. Aquaculture, v. 236, p. 377–390, 2004.

SOEDA, T.; MASAYUK, M.; INOUE, T. Edible microcapsules and food containing the same. European Patent Application n. EP0782883 A2, 1997.

SOPER, J.C.; THOMAS, M. T. Protein encapsulated oil particles European Patent Application n. EP 0856355 A2, 1998.

STATSOFT, INC. Statistica for Windows, Computer Program Manual, Tulsa, 1995. Catalogue.

STOTT, P. W.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B.W. Characterization of complex coacervates of some tricyclic antidepressants and evaluation of their potential for enhancing transdermal flux. Journal of Controlled Release, v. 41, p. 215-227, 1996.

STRAUSS, G.; GIBSON S.M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. Food Hydrocolloids, v.18, p. 81–89, 2004.

TANAKA, H.; MATSUMURA, M.; VELIKY, I. A. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. Biotechnology and Bioengineering, v. 26, p. 53-58, 1994.

TAYLOR, N.M; MARMER, W.M.; BROWN, E.M.Characterisation of biopolymers prepared from gelatin and sodium caseinate for potencial use in leather processing. *Journal of American Leather Chemists Association*, 100, 149 – 159, 2005.

TEUNOU, E.; PONCELET, D. Batch and continuous fluid bed coating – review and state of art. *Journal of Food Engineering*. v.53, p. 325-340, 2002.

THEVENET, F. Acacia Gums. Stabilizers for flavor encapsulation. Chapter 5 in *Flavor encapsulation*, ACS Symposium Series 370, Risch S.J.; Reineccius, G.A. eds, American Chemical Society, DC, USA, p. 37-44, 1988.

THIES, C. Chapter 5: Complex Coacervation. How to make Microcapsules - *Lecture and Laboratory Manual*. 1995.

TIAGO, G.G. Meio ambiente e legislação. [http://aquicultura.br/aquicultura\\_sustentavel.htm](http://aquicultura.br/aquicultura_sustentavel.htm). Acesso em junho de 2003.

TOLSTOGUSOV V.B. Functional properties of food proteins and roles of proteins-polysaccharides, *Food Hydrocolloids*, v.4, p. 429-468., 1991.

TURCHINI, G.M.; MENTASTI, T.; FRØYLAND, L.; ORBAN, E.; CAPRINO F.; MORETTI, V. M.; VALFRÉ, F. Effects of alternative dietary lipid sources on performance, tissue chemical composition, mitochondrial fatty acid oxidation capabilities and sensory characteristics in brown trout (*Salmo trutta* L.), *Aquaculture*, v. 225, n. 1-4, p. 251-267, 2003.

TURGEON, S.L.; BEAULIEU, M.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 8, p. 401–414, 2003.

VANDELLI M.A.; RIVASI F.; GUERRA P.; FORNI F.; ARLETTI R. Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterisation, in vitro and in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 215, p. 175–184, 2001.

VANDERGAER, J.E. Encapsulation by coacervation in: *Microencapsulation: Processes and applications*. VANDEGAER, J.E. ed Plenum Press, New York, 1974. p. 1-20.

VASILIU, S.; POPA, M.; RINAUDO, M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. *European Polymer Journal*, v. 41, p. 923–932, 2005

VILLAMAR D.F.; LANGDON, C.J. Delivery of dietary components to larval shrimp (*Penaeus vannamei*) by means of complex microcapsules. *Marine Biology*, v.115, p. 635-642, 1993.

VITALI, A. A.; OKADA, O.; TEIXEIRA NETO, R.O.; CARVALHO, R.; JARDIM, D. C. P. Fundamentos sobre a secagem de sólidos em: Desidratação de frutas e hortaliças – Manual Técnico, Instituto de Alimentos de Campinas, Campinas, 1997, cap. 1, p1-29, 207p.

WANG, Y.; KIMURA, K.; DUBIN, P. L.; JAEGER, W. Polyelectrolyte-Micelle Coacervation: Effects of Micelle Surface Charge Density, Polymer Molecular Weight, and Polymer/Surfactant Ratio *Macromolecules*, v.33, p. 3324-3331, 2000

WANG, Y.; KIMURA, K.; HUANG, Q.; DUBIN, P. L.; JAEGER, W. Effects of Salt on Polyelectrolyte-Micelle Coacervation *Macromolecules*, v. 32,p. 7128-7134, 1999.

WATANO, S.; NAKAMURA, H.; HAMADA, K.; WAKAMATSU, Y.; TANABE, Y.; DAVE, R.N.; PFEFFER, R. Fine particle coating by a novel rotating fluidized bed coater. *Powder Technology*, n.141, p. 172– 176, 2004.

WIELAND-BERGHAUSEN S., SCHOTE U., FREY M., SCHMIDT F Comparison of microencapsulation techniques for the water-soluble drugs nitenpyram and clomipramine HCl *Journal of Controlled Release* v. 85, n. 1-3, p. 35–43, 2002.

WILLMOTT, N.; ANDERSON, J.; FLORENCE, A. T. Comparison of albumin and casein microspheres as a carrier for doxorubicin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 39, p. 978-985, 1987.

YOUAN B. B. C.; JACKSON T. L.; DICKENS L.; HERNANDEZ C.; OWUSU-ABABIO G. Protein release profiles and morphology of biodegradable microcapsules containing an oily core. *Journal of Controlled Release*, v. 76, p. 313–326, 2001.

YOUAN B.B.C.; JACKSON T.L.; DICKENS L.; HERNANDEZ C.; OWUSU-ABABIO G. Protein release profiles and morphology of biodegradable microcapsules containing an oily core. *Journal of Controlled Release* v.76, n. 3, p. 313–326, 2001.

YÚFERA, M.; PASCUAL, E.; FERNÁNDEZ-DIAS, C. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. *Aquaculture*, v. 177, n. 1-4, p. 249-256, 1999.

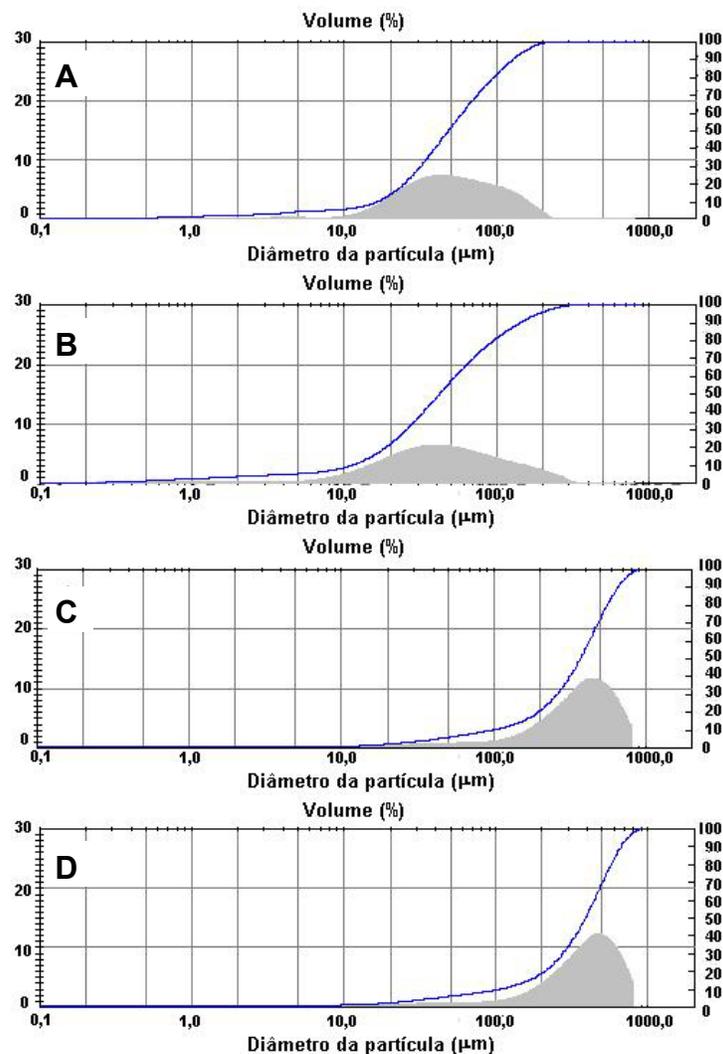
YÚFERA, M.; SARASQUETE, C.; FERNANDEZ-DIAZ, C. Testing protein-walled microcapsules for the rearing of first-feeding Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Marine Freshwater Research*, v. 47, p. 211-216, 1996.

ZHOU, F.; VERVAET, C.; REMON, J. P. Matrix pellets based on the combination of waxes, starches and maltodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 133, p. 155-160, 1996.

ZIMMERMANN, H.; HILLGARTNER, M.; MANZ, B.; FEILEN, P.; BRUNNENMEIER, F.; LEINFELDER, U.; WEBER, M.; CRAMER, H.; SCHNEIDER, S.; HENDRICH, C.; VOLKE, F.; ZIMMERMANN, U. Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR, CLSM and AFM-imaging, *Biomaterials*, v. 24, p. 2083–2096, 2003.

## 10. ANEXOS

## 10.1. Anexo 1: Distribuição de tamanho de D, DO, DOPC e DOGPC.



**Figura 75:** Distribuição do tamanho de partícula da dieta desidratada (D - A), da dieta adicionada de óleo (DO - B) e dos aglomerados finais obtidos DOPC (C) e DOGPC (D).

**10.2. Anexo 2 – Parâmetros utilizados para captação de imagens pelo microscópio de varredura laser confocal.**

Corte de meio  
Channel 1=Fluorescence  
Channel 1 Dye=Nile Red  
Date=12-19-2002  
Time=12:26:44  
PMT Voltage Ch2=552  
Offset Ch2=10  
Gain Ch2=4.240000  
Frame Filter=3 frame Kalman Filter  
Zoom Size=1.500000  
Scan Speed=8000  
Magnification=40X  
Laser-Shutter Ar=Open  
Laser-ND Ar=8% transmittance  
Laser-Shutter HeNe-G=Open  
Laser-ND HeNe-G=23% transmittance  
Laser-Shutter HeNe-R=Closed  
SourceOfData=PMT 2  
Scan Start Mode=Scan started immediately  
Gamma 0=1.208000  
Map Ch0: Range=00331 to 04095  
Resolution X = 0.115089  $\mu\text{m}$   
Resolution Y = 0.115089  $\mu\text{m}$   
FLUOVIEW Version=Version 3.2.5

**10.3. Anexo 3: Testes preliminares: estudo da reticulação com transglutaminase e glutaraldeído associados a secagem de micropartículas em spray dryer. Os experimentos potencialmente interessantes de estudo e as condições fixadas para o trabalho estão marcadas na Tabela com um sombreado.**

**Tabela 47:** Testes com transglutaminase sendo adicionada as micropartículas já formadas após o resfriamento. Partículas destruídas (PD), partículas parcialmente íntegras (PPI), partículas íntegras (PI).  $T_E/T_s$  – temperaturas de entrada e saída no spray dryer. 18 horas (ON). [1/6 H<sub>2</sub>O] - redução do volume de água de suspensão das partículas para 1/6 do volume da água usada na produção do coacervado. R – Referência (recheio emulsionado na gelatina); Inv – Sistema “invertido” (recheio emulsionado na goma arábica)

Teste	pH	Conc. da enzima (U/g de proteína)	Temp (°C)	Tempo de reação	Secagem $T_E/T_s$ (°C)	Resultado
1 – R	5,0	5, 10	50	15, 45, 90 min	180/100	PD
2 – R	5,0	10	25	15, 45, 90 min	180/100	PD
3 – R	4,0	2,5, 5, 10	25	15, 45, 90 min	180/100	PD
4 – R	4,0	10	50	indeterminado	180/100	PD
5 – R	4,0	10	25	indeterminado	180/100	PD
6 – R	4,0	10, 20	25	3h e ON	180/100	PD
7 – R	4,0	10	25	3h [1/6 H <sub>2</sub> O]	180/100	PD
8 – R	4,0	10	10→25	3h	180/100	PD
9 – R	4,0	10	10	3h	180/100	PD
10 – Inv	4,0	10	25	15 min	180/100	PD
11 - Inv	4,0	10	25	ON	180/100	PPI
12 - Inv	4,0	10	25	ON [1/6 H <sub>2</sub> O]	225/125	PPI
13 - R	4,0	10	25	ON [1/6 H <sub>2</sub> O]	225/125	PPI
14 - Inv	4,0	15 e 20	25	3h e 6h [1/6 H <sub>2</sub> O]	225/125	PPI

**Tabela 48:** Testes com transglutaminase sendo adicionada na etapa de emulsificação do recheio com um dos materiais de parede: R – Referência (recheio emulsionado na gelatina); Inv – Sistema “invertido” (recheio emulsionado na goma arábica). O pH foi mantido em 4,0 para todos esses testes.  $T_E/T_s$  – temperaturas de entrada e saída no spray dryer fixadas em 225/125° C. Partículas destruídas (PD), partículas parcialmente íntegras (PPI), partículas íntegras (PI). 18 horas (ON). [1/6 H<sub>2</sub>O] - redução do volume de água de suspensão das partículas para 1/6 do volume da água usada na produção do coacervado.

Teste	Concentração da gelatina*	Conc. da enzima (U/g de proteína)	Temp (°C)	Tempo de reação	Resultado
1 – R	5	10	40	15, 30 e 60 min	PPI
2 – R	5	20	40	30 e 60 min	PD

\* para valores acima de 2,5% (p/p) a solução foi diluída para esse valor na hora da utilização.

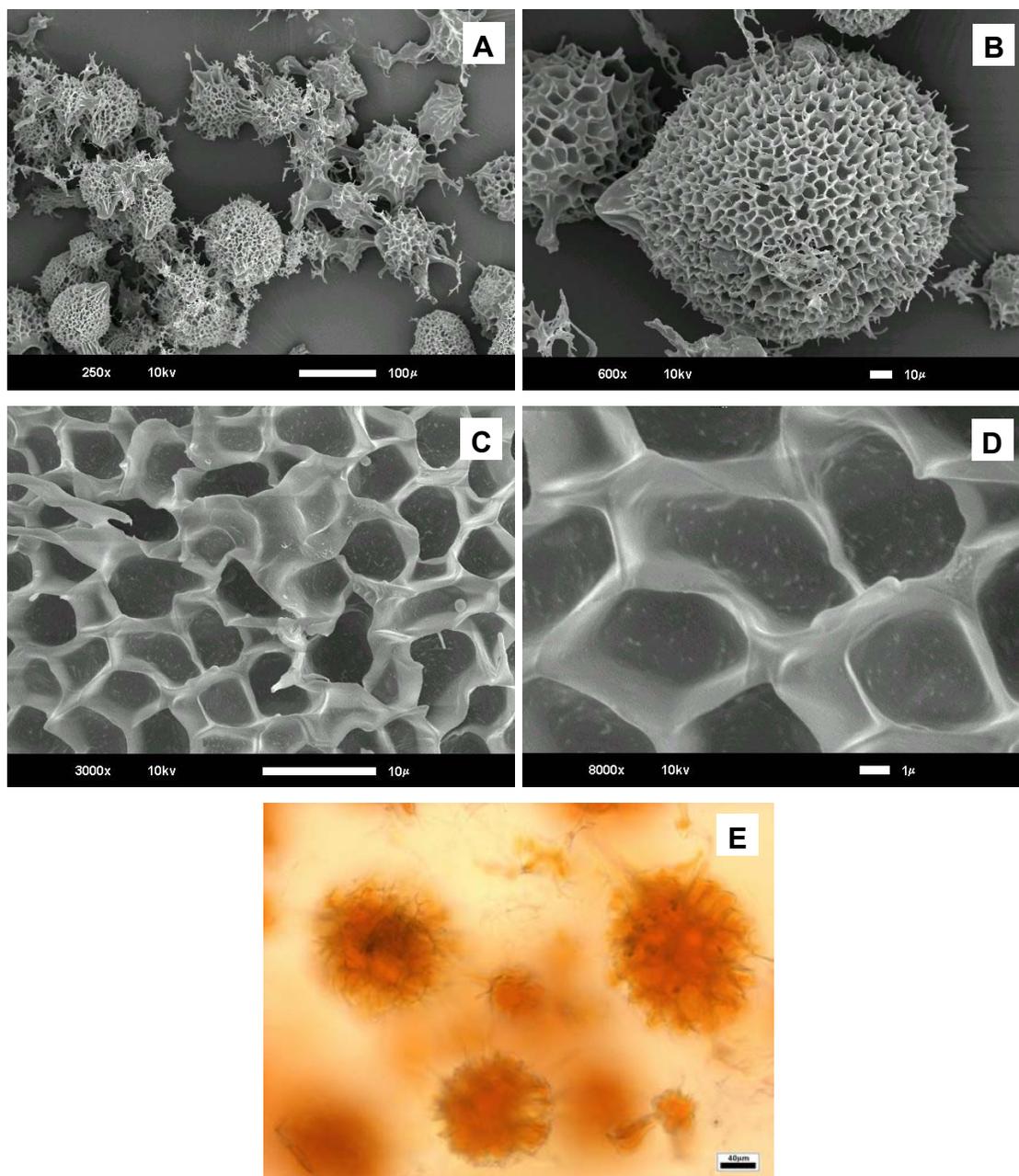
Outros testes:

- *Produção de coacervado com gelatina reticulada:* solução de gelatina 5% (p/p). Reação: 10U/50° C/15 min, inativação: 85° C/15 min – liofilização. Gelatina reticulada usada na produção do coacervado pelo método convencional (Figura 33). Secagem  $T_E/T_s$  (°C): 180/100 Resultado: Partículas destruídas.

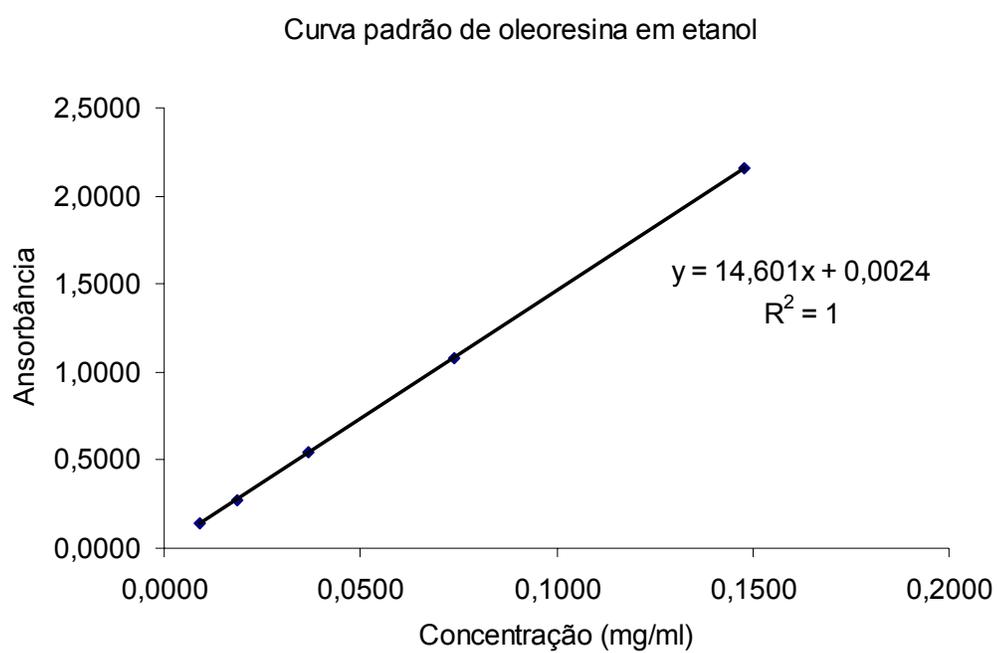
**Tabela 49:** Testes com glutaraldeído sendo adicionado as micropartículas já formadas após o resfriamento. Partículas destruídas (PD), partículas parcialmente íntegras (PPI), partículas íntegras (PI). O pH foi fixado em 4,0 e  $T_E/T_s$  – temperaturas de entrada e saída no spray dryer de 225/125° C.

Teste	Conc. do glutaraldeído (mM/g de proteína)	Temp (°C)	Tempo de reação	Resultado
1 – R	1,0	25	3h, ON	PI
2 – R	0,25	25	3h	PPI
3 – R	0,25	25	ON	PI
4 – R	0,1	25	ON	PPI

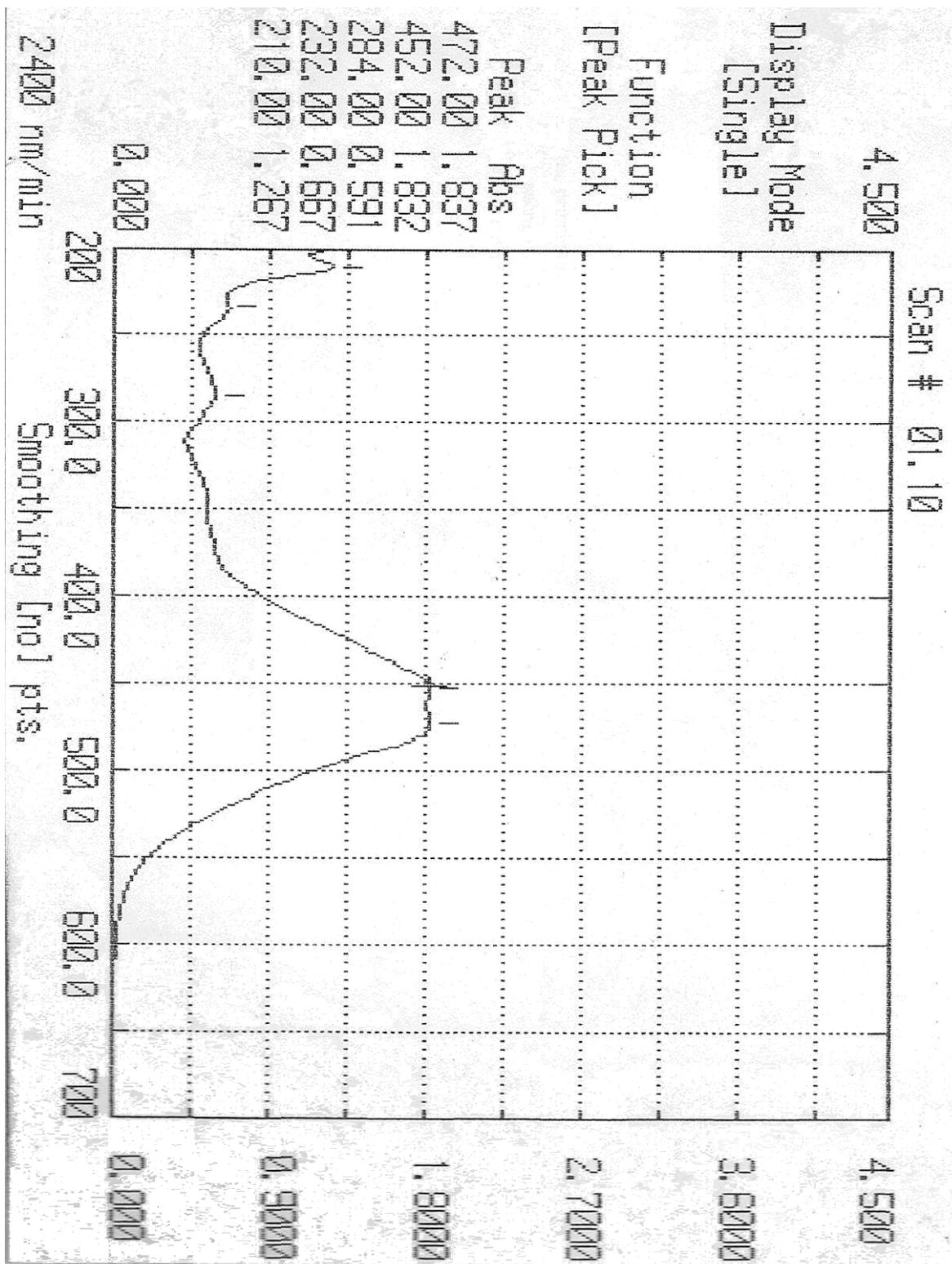
#### 10.4. Anexo 4: Morfologia de micropartículas coacervadas liofilizadas submetidas a congelamento rápido (nitrogênio líquido)



**Figura 76:** Aspecto e detalhes da parede das microcápsulas tratadas com glutaraldeído (1,0mM por g de proteína - 18 horas) secas por liofilização congeladas com nitrogênio líquido (congelamento rápido: Imagens obtidas por Microscopia eletrônica de varredura: A – barra = 100μm; B e C – barras = 10μm; D – barra = 1μm. Imagens obtidas por Microscopia ótica: E – captação em óleo, barra = 40 μm.

**10.5. Anexo 5: Curva padrão de oleoresina em etanol.****Figura 77:** Curva padrão de oleoresina em etanol.

10.6. Anexo 6: Espectro de varredura para oleoresina de páprica solubilizada em etanol (concentração de 0,16mg de oleoresina/mL de etanol).



**10.7. Anexo 7: Produção científica no período de vigência da bolsa**

SANTUCCI, M. C. C., ALVIM, I. D., SCHMIT, F. et al. Enriquecimento de macarrão tipo tubo (massa curta) com derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.): impacto nutricional e sensorial. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Ago 2003, vol.23, no.2, p.290-295.

YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D., SANTUCCI, M. C. C. et al. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. *Rev. Nutr.*, Dez 2003, vol.16, no.4, p.423-432.

SANTUCCI, M. C. C., ALVIM, I. D., FARIA, E. V. de et al. Efeito do enriquecimento de biscoitos tipo água e sal, com extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Dez 2003, vol.23, no.3, p.441-446.

MUKAI-CORREA, R.; PRATA, A.S.; ALVIM I.D. and GROSSO C.R.F. Controlled Release of Protein from hydrocolloid gel microbeads before and after drying. *Current Drug Delivery*, 2004, v 1, n. 3, p265-273.

MUKAI-CORREA, R.; PRATA, A.S.; ALVIM I.D. and GROSSO C.R.F. Caracterização de microcapsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por gelificação iônica. *Brazi. J. Food Technol.* v. 8, n. 1, p. 73-80. 2005.

Posters apresentados em congressos:

SILVA. M.F.; ALVIM, I.D.; GROSSO, C.R.F. Produção de micropartículas por coacervação complexa, XIX CSBCTA 7-10 setembro, 2004, Recife, PE. Premiação Leopoldo Hartmann

SILVA. M.F.; ALVIM, I.D.; GROSSO, C.R.F. Produção de micropartículas por coacervação complexa, XII Congresso Interno de Iniciação Científica 22-23 setembro, 2004, Campinas, SP. Menção Honrosa.

PRATA, A.S. ; ALVIM, I.D.; GROSSO, C.R.F. Use of microscopic techniques to characterization of microparticles produced by complex coacervation. XX CSBMM, 2005.

ALVIM, I.D.; GROSSO, C.R.F. Produção e caracterização de micropartículas lipídicas contendo compostos hidrossolúveis. 6º SLACA, 2005.