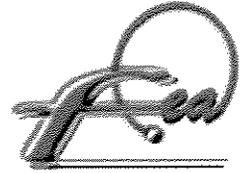




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO



**Preparo e caracterização de microcápsulas obtidas por polimerização
iônica para alimentação de larvas de peixe**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Renata Mukai Corrêa**, aprovada pela Comissão Julgadora em 11 de dezembro de 2003.

Campinas, 11 de dezembro de 2003.

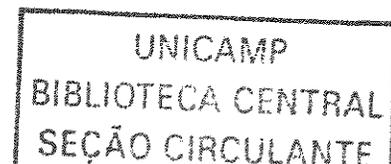
Prof. Dr. Carlos Raimundo F.
Grosso
Presidente da Banca

RENATA MUKAI CORRÊA
Engenheira Agrônoma

CARLOS RAIMUNDO FERREIRA GROSSO
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição

Campinas - 2003



501204902

JNIDADE PC
1ª CHAMADA T/UNICAMP
C817p
EX
OMBO BC/ 57132
ROC 16/11/04
D X
REÇO 11/90
ATA 02/03/04
2ª CPD

M001950BB-3

BID 310965

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

C817p Correa, Renata Mukai
Preparo e caracterização de microcápsulas obtidas por
polimerização iônica para alimentação de larvas de peixe /
Renata Mukai Correa. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

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

1.Polimerização. 2.Liberação controlada. 3.Pectina.
4.Alginatos. I.Grosso, Carlos Raimundo Ferreira.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título.

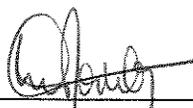
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP
(orientador)

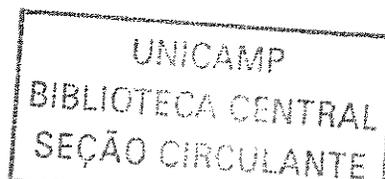


Prof. Dra. Flavia Maria Netto
Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP
(membro)



Profa. Dra. Maria Célia Portella
Instituto de Pesca CAUNESP - UNESP
(membro)

Profa. Dra. Maria Helena A. Santana
Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP
(membro)



Correa, R. M. **Preparo e caracterização de microcápsulas obtidas por polimerização iônica para alimentação de larvas de peixe.** Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.– Campinas, SP, 171p. 2003.

ERRATA

Pág.	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
91	1	12	quantidade de proteínas	umidade, E.E. e pH
116	2	11	Fig.3	Fig. 30 a 32

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.” *Abert Einstein, Físico e Matemático alemão.*

“A – Por que esse azul é diferente desse outro azul?

B- Por que o bzzz é diferente.

A – Como assim?

B – Ah o que é a cor? A cor é um rainho, cada cor diferente, que vem das coisas para os olhos? bzzzz.

A- Você está me testando?

B- Eu sempre estou testando as pessoas.

A – Você é um full-time-people-testing-person.

B - (risos) Sim, um temps-pelin-examine-toutes-les personnes.

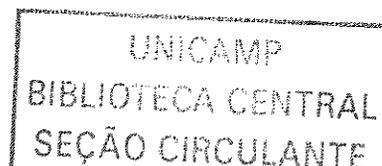
A – Isso é lúdico.

[ironicamente] B – Além de lúdico, é um forma de ensinar e de aprender (gargalhadas).

C- Calem a boca. É necessário tomar as coisas a sério. Assim não se aprende nada. O intelecto deve ser levado a sério.” *Frederic Nietzsche, filósofo alemão.*

“Ora, se o genealogista tem o cuidado de escutar a história em vez de acreditar na metafísica, o que ele aprende? Que atrás das coisas há 'algo inteiramente diferente': não seu segredo essencial e sem data, mas o segredo que elas são sem essência, ou que sua essência foi construída peça por peça a partir de figuras que lhe eram estranhas. A razão? Mas ela nasceu de maneira inteiramente 'desrazoável' - do acaso.” (Foucault)

“Bem, construamos "peça por peça" nossas coisas, nossos 'queremos', nossos textos, projetos, pesquisas, documentários. Desrazoadamente e sem se preocupar com finalidade alguma, apenas o simples fazer algo diferente e com sentido para nós, o que desejamos. Se for científico, educativo, com uma óptica artística. Já que é arte, com a óptica da vida.” *Frederic Nietzsche, filósofo alemão.*



DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Leone Corrêa e Edna Mukai Corrêa, que nunca mediram esforços para que eu sempre conseguisse alcançar meus objetivos. A Admiração que tenho por eles é infinita, seja pela educação que recebi, dignidade, e principalmente por me ensinarem a caminhar com minhas próprias pernas, ou por terem me acompanhando estando sempre presentes nos momentos delicados.

Aos meus irmãos Rodrigo e Roberta e a minha sobrinha Alana que tanto amo.

“ Há quem diga que todas as noites são de sonhos. Mas há também quem garanta que nem todas, só as de verão. No fundo, isso não tem importância. O que interessa mesmo não é a noite em si, são os sonhos. Sonhos que o homem sonha sempre, em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado.”

(William Shakerspeare, escritor teatral inglês)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde e força, para que eu concluísse esta obra, estando presente em todos os dias de minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso, pelo carinho, atenção e dedicação dada a mim e a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Aureo Tatsumi Yamada do Departamento de Histologia do Instituto de Biologia da Unicamp, pelo uso do Microscópio Ótico e pela ajuda prestada, na obtenção das imagens.

Ao pesquisador Carlos Alberto Rodrigues Bizarro do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Far- Manguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, pelo auxílio na obtenção das imagens por Microscopia de Varredura Laser Confocal.

A Mônica Freiman do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Far- Manguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, pela atenção, amizade e recepção.

A banca examinadora, composta pelas professoras: Flavia Maria Netto, Maria Célia Portella e Maria Helena Santana, pelas sugestões propostas para composição final deste trabalho. Em especial, a Profa. Dra. Flávia Maria Netto pelo auxílio e atenção, dado ao meu trabalho e a mim.

Ao Prof. Dr. José Roberto Trigo pelo auxílio e sugestões nas análises estatísticas.

A todos do Laboratório de Controle de Qualidade: Gustavo, Rodney, Patrícia, Juliana, Larissa pela amizade, pela ajuda na parte prática e também por

tornar o ambiente de trabalho um lugar bem agradável. As minhas estagiárias Ana Paula, Aline e Cris, pela compreensão e amizade.

Em especial, ao meu grupo de pesquisa Ana Silvia, Carlos e Izabela, pelo espírito de trabalho em equipe, pela amizade, pela ajuda na parte prática e nas sugestões para o desenvolvimento do trabalho, pela atenção, pelos momentos de descontração.

A todos os funcionários do DEPAN: Cidinha, Graça, André, Fátima, Suzana, Chico, Eliana, Dona Nice e Dona Magna, pela amizade e colaboração.

Ao meus colegas do DEPAN: Sônia, Vera, Adriane, Noemi, Fábio, Helenice, Paulo Sérgio, Cristina, entre outros, pelos momentos de descontração.

As minhas companheiras de república Silvana e Taciana, pela amizade, pelo companherismo.

Ao povo da natação Fabi, Caipira, Vanessa, Dani, Cris, Aroldo, Gustavo, Paulo, Iza, e aos professores Alemão, Guima e Mignon, pelas conquistas e risadas nos campeonatos e nos treinos.

A todos da secretária de Pós-graduação, em especial ao Cosme pela paciência e dedicação.

A minha querida amiga Alessandra pelos conselhos e ótimos momentos de descontração, principalmente no Morrison Bar. Que nossa amizade continue grandiosa e tão valiosa quanto o passar dos anos de um belo vinho...

Ao Beto pelo companherismo, incentivo e ondas surfadas.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos.

Obrigada.

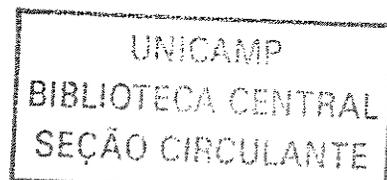
INDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	XVI
ÍNDICE DE FIGURAS	XVII
NOMENCLATURA	XXI
RESUMO	XXII
SUMMARY	XXIV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	3
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 MICROENCAPSULAÇÃO	4
3.2 DIFUSÃO E LIBERAÇÃO CONTROLADA	9
3.3 DIETAS ARTIFICIAIS	17
3.3.1 <i>DIGESTIBILIDADE IN VITRO</i>	22
3.4 BIOPOLÍMEROS	24
3.4.1 <i>GOMA GELANA</i>	24
3.4.2 <i>PECTINA</i>	27
3.4.3 <i>CARRAGENA</i>	28
3.4.4 <i>ALGINATOS</i>	31
3.4.5 <i>MISTURAS DE POLISSACARÍDEOS</i>	33

3.4.5.1	Misturas binárias	33
3.4.6	<i>MISTURAS TERNÁRIAS E QUATERNÁRIAS</i>	34
3.4.7	<i>DIAGRAMA DE FASES</i>	35
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	MATERIAL	36
4.2	MÉTODOS	36
4.2.1	<i>DIAGRAMA DE FASES</i>	38
4.2.2	<i>CARACTERIZAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS</i>	39
4.2.2.1	Viscosidade intrínseca	39
4.2.2.2	Determinação do pH	41
4.2.3	<i>FORMAÇÃO DAS MACROCÁPSULAS</i>	41
4.2.4	<i>CARACTERIZAÇÃO DAS CÁPSULAS</i>	42
4.2.4.1	Solubilidade	42
4.2.4.2	Flutuabilidade	42
4.2.4.3	Microscopia ótica	43
4.2.5	<i>PRODUÇÃO INICIAL DAS MICROCÁPSULAS</i>	43
4.2.5.1	Morfologia e distribuição do tamanho	44
4.2.6	<i>PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS CONTENDO PROTEÍNA</i>	44
4.2.7	<i>PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS CONTENDO PROTEÍNA E GORDURA</i>	45
4.2.8	<i>SECAGEM DAS MICROCÁPSULAS</i>	46
4.2.9	<i>CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROCÁPSULAS</i>	46
4.2.10	<i>ELETROFORESE</i>	47
4.2.11	<i>AVALIAÇÕES DOS MICROENCAPSULADOS</i>	47
4.2.11.1	Flutuabilidade	47
4.2.11.2	Curvas de liberação do recheio protéico	47
4.2.11.2.1	Determinação de proteínas	47
4.2.11.2.2	Desenvolvimento do aparato de “difusão”	48
4.2.11.2.3	Protocolo experimental	49
4.2.12	<i>MORFOLOGIA E MICROESTRUTURA DAS MICROCÁPSULAS.</i>	49
4.2.12.1	Microscopia ótica	49

4.2.12.2	Microscopia de Varredura Laser Confocal (CLSM)	49
4.2.12.2.1	Preparo das amostras para a microscopia confocal	50
4.2.12.2.1.1	Indicador fluorescente de óleo - Nile Red - dimetil sulfóxido	50
4.2.12.2.1.2	Indicador fluorescente da caseína e polissacarídeos – FITC	50
4.2.12.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	50
4.2.12.4	Distribuição do tamanho de partículas	51
4.2.13	<i>DIGESTIBILIDADE IN VITRO</i>	51
4.2.13.1	Método adaptado de AKESON & STAHMANN (1964)	51
4.2.13.1.1	Preparo do extrato enzimático	52
4.2.13.2	Digestibilidade medida pela queda do pH (Lazo et al., 1998)	53
4.2.13.2.1	Preparo da solução de enzima	53
4.2.13.3	Determinação da atividade das proteases	54
4.2.14	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	DIAGRAMA DE FASES	55
5.1.1	<i>MISTURAS BINÁRIAS</i>	59
5.1.2	<i>MISTURAS TERNÁRIAS</i>	60
5.1.3	<i>MISTURA QUATERNÁRIA</i>	65
5.2	VISCOSIDADE INTRÍNSECA	65
5.3	FORMAÇÃO DAS CÁPSULAS	67
5.4	CARACTERIZAÇÃO DAS CÁPSULAS	67
5.4.1	<i>SOLUBILIDADE</i>	67
5.4.2	<i>FLUTUABILIDADE</i>	68
5.4.3	<i>MICROSCOPIA ÓTICA</i>	68
5.5	PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS	68
5.6	MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO	70
5.6.1	<i>MISTURAS BINÁRIAS</i>	75
5.6.2	<i>MISTURAS TERNÁRIAS</i>	76

5.6.3	<i>MISTURA QUATERNÁRIA</i>	76
5.7	MICROCÁPSULAS COM RECHEIO DE PROTEÍNA E GORDURA	81
5.8	SECAGEM POR LIOFILIZAÇÃO	81
5.9	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROCÁPSULAS	82
5.10	ELETROFORESE	92
5.11	FLUTUABILIDADE	93
5.12	CURVAS DE LIBERAÇÃO DO RECHEIO PROTÉICO	95
5.12.1	<i>DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS</i>	95
5.12.2	<i>DESENVOLVIMENTO DO APARATO DE "DIFUSÃO"</i>	99
5.12.3	<i>MICROCÁPSULAS ÚMIDAS CONTENDO PROTEÍNA</i>	100
5.12.4	<i>CÁPSULAS ÚMIDAS CONTENDO PROTEÍNA E GORDURA</i>	105
5.12.5	<i>CÁPSULAS SECAS CONTENDO PROTEÍNA E GORDURA</i>	107
5.13	MORFOLOGIA E MICROESTRUTURA DAS MICROCÁPSULAS.	111
5.13.1	<i>MICROCÁPSULAS COM RECHEIO DE PROTEÍNA E GORDURA</i>	111
5.13.1.1	Microscopia ótica	111
5.13.1.2	Microscopia de varredura laser confocal.	112
5.13.1.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	115
5.14	DISTRIBUIÇÃO DOS TAMAÑHOS DE PARTÍCULAS	116
5.15	DIGESTIBILIDADE "IN VITRO "	124
6.	CONCLUSÕES GERAIS	127
7.	SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO	129
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
ANEXO 1		150



VISCOSIDADE INTRÍNSECA E MASSAS MOLECULARES	150
8.1 ALGINATO – MASSA MOLECULAR	151
8.2 GOMA GELANA – MASSA MOLECULAR	157
8.3 PECTINA – MASSA MOLECULAR	163
ANEXO 2	169
HISTOGRAMAS DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS	169

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. TAMANHO DE PARTÍCULA EM RELAÇÃO AO MÉTODO DE ENCAPSULAÇÃO.	7
TABELA 2. SISTEMAS ENCAPSULANTES E PROVÁVEIS MECANISMOS DE LIBERAÇÃO.	10
TABELA 3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA USO DAS MISTURAS DOS BIOPOLÍMEROS COMO MATERIAL DE PAREDE (COBERTURA), EXPRESSOS EM PORCENTAGEM.	38
TABELA 4. TRATAMENTOS SELECIONADOS.	45
TABELA 5. VISCOSIDADES INTRÍNSECAS E PESOS MOLECULARES PARA ALGINATO, GOMA GELANA E PECTINA.	66
TABELA 6. VALORES MÉDIOS ENCONTRADOS PARA QUANTIDADE DE PROTEÍNAS, UMIDADE, E.E. E PH DOS DIFERENTES TRATAMENTOS UTILIZADOS.	91
TABELA 7. COMPARAÇÃO DAS QUANTIDADES PROTÉICAS, OBTIDAS POR DIFERENTES MÉTODOS. VALORES DE CONCENTRAÇÕES CALCULADOS A PARTIR DAS EQUAÇÕES DE RETAS DA FIGURA 24.	96
TABELA 8. COEFICIENTE DE EXTINÇÃO (E) PARA A CAS E BSA A 205 E 280NM.	96
TABELA 9. EFICIÊNCIA DOS APARATOS PARA MEDIR A LIBERAÇÃO DE PROTEÍNA AO LONGO DO TEMPO, EXPRESSA EM PORCENTAGEM.	100
TABELA 10. VALORES DE DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> ESTIMADA PELA MEDIDA DE PROTEÓLISE E POR QUEDA DE PH.	124

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURA QUÍMICA DE UNIDADES DE GOMA GELANA (FONTE: SANDERSON ET AL., 1989).....	25
FIGURA 2. CONFORMAÇÃO QUÍMICA DA PECTINA (FONTE: MAY, 1997).....	28
FIGURA 3. ESTRUTURAS QUÍMICAS DA CARRAGENA (FONTE: THOMAS, 1997).....	29
FIGURA 4. CONFORMAÇÃO DOS ÁCIDOS B-D-MANURÔNICO E A-L-GULURÔNICO (FONTE: THIES, 1995).	31
FIGURA 5. MODELOS ESTRUTURAIS DA REDE DE GEL PARA MISTURAS BINÁRIAS. A) REDE DE ENTUMECIMENTO; B) REDE INTERPENETRANTE; C) REDE DE FASE SEPARADA E D) REDE PAREADA.	34
FIGURA 6 FLUXOGRAMA DO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	37
FIGURA 7. DIAGRAMA DE FASES UTILIZADOS. A. ALGINATO; B. CARRAGENA; C. GOMA GELANA; D. PECTINA. A LETRA “I” INDICA QUE HOVE GELIFICAÇÃO INSTANTÂNEA E A LETRA “A” QUE HOVE LIBERAÇÃO DE ÁGUA DA MATRIZ POLIMÉRICA APÓS 24 HORAS.	57
FIGURA 8 DIAGRAMA DE FASE DAS MISTURAS BINÁRIAS. A. GE-AL, B. PE-AL; C. PE-GE, D. CA-PE, E. CA-GE E F. CA-AL.....	61
FIGURA 9. DIAGRAMA DE FASES PARA MISTURAS TERNÁRIAS DOS POLISSACARÍDEOS UTILIZADOS. A. CA-PE-GE; B. CA-PE-AL; C. CA-GE-AL; D. PE-GE-AL.....	63
FIGURA 10 . DIAGRAMA DE FASE DA MISTURA QUATERNÁRIA DOS POLISSACARÍDEOS UTILIZADOS.	63
FIGURA 11. ASPERSOR DE VIDRO CONECTADO A ERLLENMEYER.	70

FIGURA 12. MICROCÁPSULAS DE ALGINATO CONTENDO COMO RECHEIO ÓLEORESINA DE PÁPRICA, ASPERGIDAS POR DIFERENTES PRESSÕES E ALTURAS.	71
FIGURA 13. MICROCÁPSULAS DE ALGINATO COM VARIAÇÕES NA QUANTIDADE DE MATERIAL A SER ENCAPSULADO	73
FIGURA 14. MICROCÁPSULAS OBTIDAS DE DIFERENTES MATRIZES.....	73
FIGURA 15. MORFOLOGIA DE SUPERFÍCIE OBTIDA POR MICROSCOPIA ÓTICA (20X) DAS MICROCÁPSULAS FABRICADAS COM MATRIZES DE MISTURAS BINÁRIAS, CONTENDO COMO RECHEIO ÓLEORESINA DE PÁPRICA.	77
FIGURA 16. MORFOLOGIA DE SUPERFÍCIE OBTIDA POR MICROSCOPIA ÓTICA (20X) DAS MICROCÁPSULAS FABRICADAS COM MATRIZES DE MISTURAS TERNÁRIAS, CONTENDO COMO RECHEIO ÓLEORESINA DE PÁPRICA.	79
FIGURA 17. MORFOLOGIA DE SUPERFÍCIE OBTIDA POR MICROSCOPIA ÓTICA (20X) DAS MICROCÁPSULAS FABRICADAS COM MATRIZ QUATERNÁRIA (PE-GE-AL-CA), CONTENDO COMO RECHEIO ÓLEORESINA DE PÁPRICA.	79
FIGURA 18. MORFOLOGIA E MICROESTRUTURA DAS MICROCÁPSULAS LIOFILIZADAS COM MATRIZ DE AL E RECHEIO DE CAS + GVH, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.	83
FIGURA 19. MORFOLOGIA E MICROESTRUTURA DAS MICROCÁPSULAS LIOFILIZADAS COM MATRIZ DE CA E RECHEIO DE CAS + GVH, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.	85
FIGURA 20. MORFOLOGIA E MICROESTRUTURA DAS MICROCÁPSULAS LIOFILIZADAS COM MATRIZ DE GE E RECHEIO DE CAS + GVH, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.	87
FIGURA 21. MORFOLOGIA E MICROESTRUTURA DAS MICROCÁPSULAS LIOFILIZADAS COM MATRIZ DE PE E RECHEIO DE CAS + GVH, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.	89

FIGURA 22. ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMIDA DE CASEÍNA COMERCIAL E CASEÍNATO DE SÓDIO (CONTROLE). BANDA 1 E 2 – AMOSTRA. BANDA 3 E 4 – PADRÃO.	92
FIGURA 23. FLUTUABILIDADE DE MICROCÁPSULAS DE PE+CAS+GVH AO LONGO DO TEMPO, EM CUBETA DE QUARTZO (4,0x2,0x23,0CM). TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA: 497.06µM.	93
FIGURA 24. CURVAS COMPARATIVAS DE ANÁLISE DE PROTEÍNA.	97
FIGURA 25. CURVAS DE LIBERAÇÃO DA PROTEÍNA DAS MICROCÁPSULAS (ÚMIDAS), EM FUNÇÃO DO TEMPO, CONTENDO COMO RECHEIO PROTEÍNA (CAS). MATRIZ: (■) ALGINATO; (X) CARRAGENA; (●) GOMA GELANA; (▲) PECTINA; (▼) MISTURA BINÁRIA – GE/AL; (◆) MISTURA TERNÁRIA - PE/GE/AL. VALORES EXPRESSOS EM PORCENTAGEM ACUMULADA.	101
FIGURA 26 CURVAS DE LIBERAÇÃO DA PROTEÍNA DAS MICROCÁPSULAS, EM FUNÇÃO DO TEMPO, CONTENDO COMO RECHEIO PROTEÍNA (CAS) E GORDURA (GVH).. MATRIZ: (■) ALGINATO; (X) CARRAGENA; (●) GOMA GELANA; (▲) PECTINA; (▼) MISTURA BINÁRIA – GE/AL; (◆) MISTURA TERNÁRIA - PE/GE/AL.. A. MICROCÁPSULAS ÚMIDAS; B. LIOFILIZADAS. VALORES EXPRESSOS EM PORCENTAGEM ACUMULADA.	109
FIGURA 27. MORFOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE SISTEMAS POLIMÉRICOS CONTENDO CAS+GVH OBTIDOS POR MICROSCOPIA ÓTICA EM AUMENTO DE 20X.....	113
FIGURA 28. MICROSCOPIA CONFOCAL: SISTEMAS ALGINATO-FITC OU CASEÍNA-FITC E GORDURA VEGETAL HIDROGENADA-NILE RED.	117
FIGURA 29. MORFOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE MICROCÁPSULAS DE ALGINATO COM RECHEIO DE CAS+GVH OBTIDO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DIC (20X).	119
FIGURA 30 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE MICROCÁPSULAS: 1A. ALGINATO COM RECHEIO DE PROTEÍNA; 1B. ALGINATO COM RECHEIO DE PROTEÍNA E GORDURA; 2A. GOMA GELANA COM RECHEIO DE PROTEÍNA; 2B. GOMA GELANA COM RECHEIO DE PROTEÍNA E GORDURA.....	121

FIGURA 31. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE MICROCÁPSULAS: 1A. PECTINA COM RECHEIO DE PROTEÍNA; 1B. PECTINA COM RECHEIO DE PROTEÍNA E GORDURA; 2A. CARRAGENA COM RECHEIO DE PROTEÍNA; 2B. CARRAGENA COM RECHEIO DE PROTEÍNA E GORDURA..... 122

FIGURA 32. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE MICROCÁPSULAS: 1A. GELANA-ALGINATO COM RECHEIO DE PROTEÍNA; 1B. GELANA-ALGINATO COM RECHEIO DE PROTEÍNA E GORDURA; 2A. PECTINA-GELANA-ALGINATO COM RECHEIO DE PROTEÍNA; 2B. PECTINA-GELANA-ALGINATO COM RECHEIO DE PROTEÍNA E GORDURA..... 123

NOMENCLATURA

AL – Alginato

AP1 – Aparato para medidas de liberação

AP2 – Aparato para medidas de liberação

AP3 – Aparato para medidas de liberação

BSA – Soro albumina bovina

BRAD – Bradford

CA – Carragena

CAS – Caseína

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

GE – Gelana

GVH – Gordura Vegetal Hidrogenada

PE – Pectina

UV – Ultra violeta

η_{sp} = viscosidade específica (mL/g)

η_{sol} = viscosidade da solução (mL/g)

η_{H_2O} = viscosidade da água (mL/g)

η_{iner} = viscosidade inerente (mL/g)

η_{red} = viscosidade reduzida (mL/g)

η_{red} = viscosidade relativa (mL/g)

C = concentração da solução (g/mL)

$\Delta pH_{amostra}$ = variação de pH da amostra

$\Delta pH_{caseína}$ = variação de pH da caseína

K = fator de conversão para o Cannon-Fenske (nº100) = 0,015

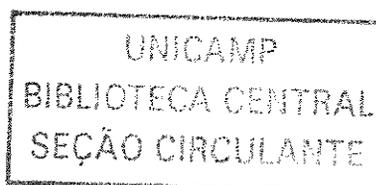
t = tempo de escoamento (s)

ρ = densidade relativa da água

RESUMO

Este trabalho visou a produção de microcápsulas capazes de reter proteínas, para serem utilizadas na tentativa de substituição dos organismos vivos usados na alimentação de larvas de peixes. Quatro diferentes polissacarídeos: alginato, carragena, goma gelana e pectina; todos com capacidade de formação de gel por polimerização iônica foram utilizados, individualmente e em associação, para obtenção de cápsulas e microcápsulas. A fabricação se deu através de uma bomba peristáltica (cápsulas) e de um aspersor capilar com alta pressão (microcápsulas). Foram construídos diagramas de fase para determinação das regiões sol, gel e sinerése. Parâmetros como fluutuabilidade, solubilidade, morfologia e tamanho das cápsulas e microcápsulas foram avaliados, sendo determinantes na posterior escolha e utilização de cápsulas e microcápsulas para fins voltados ao cultivo de peixes. A capacidade de liberação de proteína pela microcápsula foi investigada em matrizes úmidas e secas por liofilização, em períodos pré-determinados utilizando caseína (proteína modelo) e um sistema composto desta proteína com a introdução de gordura vegetal hidrogenada. Ensaio de digestibilidade *in vitro* foram conduzidos para verificar o acesso enzimático à proteína encapsulada. Os resultados apresentados pelos diagramas de fase mostraram a capacidade da goma gelana e carragena de formarem géis sem adição de cálcio a partir das concentrações poliméricas de 0,75 e 1,2%, respectivamente. Os diagramas também indicaram a predominância de um dos polímeros componente da mistura (binária, ternária ou quaternária) utilizadas na fabricação das microcápsulas. Todas as microcápsulas estudadas mostraram insolúveis após a geleificação e cura. A fluutuabilidade das cápsulas úmidas sem recheio variou de 21,7s (pectina-alginato) a 6,5s (carragena-alginato). A fluutuabilidade das microcápsulas úmidas e secas por liofilização contendo proteína e gordura foram superiores a 4 horas. O tamanho variou de variou de 1,5 a 2 mm para cápsulas (*microscópio estereoscópico*) e de 8 a 870 μm (*laser scattering*) com média de 150 μ para microcápsulas. Quanto a morfologia, as cápsulas e microcápsulas apresentaram formas esféricas em sua maioria, multinucleadas

com distribuição do recheio por toda extensão da matriz. A secagem em liofilizador causou uma perda parcial da forma esférica das microcápsulas mantendo, no entanto, sua integridade física. Os sistemas poliméricos envolvendo somente proteína revelaram diferentes perfis de liberação proteica, com maior liberação observada para matriz de alginato (100%) e menor para matriz obtida da mistura ternária pectina-gelana-alginato (10%), após 240 minutos em solução. Com a inclusão da gordura no sistema foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) na liberação de proteína pela microcápsula. A menor liberação foi observada para as microcápsulas liofilizadas. A digestibilidade *in vitro* das microcápsulas indicou o acesso das enzimas à proteína encapsulada com níveis consideráveis (medida proteolítica >40% e queda de pH >70%) de digestibilidade comparada a caseína livre, para todos os sistemas estudados.



SUMMARY

This research aimed at producing microcapsules capable of retaining proteins, with the objective of substituting the live organisms used in larval fish feed. Four different polysaccharides: alginate, carrageenan, gelatin and pectin were used, all having the capacity to form gels by ionic polymerization both individually and in association, in order to produce capsules or microcapsules. The capsules were produced using a peristaltic pump and the microcapsules using high-pressure capillary extrusion. Phase diagrams were constructed to determine the regions of sol, gel and syneresis. Parameters such as floatability, solubility, morphology and capsule/microcapsule size were evaluated, these parameters determining the subsequent choice and use of capsule or microcapsule in fish breeding. The protein liberating capacity of the microcapsules were investigated in moist and freeze-dried matrices after pre-determined periods, using casein (model protein) and a system composed by casein with the introduction of hydrogenated vegetable fat. *In vitro* digestibility trials were carried out to verify enzyme access to the encapsulated protein. The results presented by the phase diagrams showed the capacity of both gelatin and carrageenan to form gels as from polymeric concentrations of 0.75 and 1.2% respectively, without the addition of calcium. The diagrams also indicated the predominance of one of the component polymers of the mixture (binary, ternary or quaternary) used in the production of microcapsules. All the microcapsules studied were shown to be insoluble after jellification and curing. The floatability of the moist unfilled microcapsules varied from 21,7s (pectin-alginate) to 6,5s (carrageenan-alginate). The floatability of both moist and freeze-dried microcapsules containing protein and fat was greater than 4 hours. The size of the capsules varied from 1,5 to 2 mm (*stereoscopic microscopy*) and that of the microcapsules from 8 to 870 μm (*laser scattering*) with a mean of 150 μm . With respect to morphology, both the capsules and microcapsules were mostly spherical and multinucleated, the filling being distributed throughout the matrix. Freeze-drying resulted in a partial loss of the spherical form of the microcapsules, which nevertheless retained their physical integrity. The polymeric

systems filled with only protein showed different protein liberation profiles, with greater liberation being observed for the alginate matrix (100%) and lesser liberation by the ternary mixture of pectin-gellan-alginate (10%), after 240 minutes in solution. The inclusion of fat in the system resulted in a significant reduction ($p < 0.05$) in protein liberation by the microcapsule. The lowest degree of liberation was observed for the freeze-dried microcapsules. The *in vivo* digestibility of the microcapsules indicated access of the enzymes to the encapsulated protein, with considerable levels of digestibility (proteolytic mean $>40\%$ and a pH fall of $>70\%$) in all the systems studied, as compared to that of free casein.

1. INTRODUÇÃO

Quase todas as espécies de peixes e crustáceos, tanto marinhos como de água doce, em seus estágios iniciais de vida (larvas) necessitam de organismos plantônicos vivos como primeiro alimento. No entanto, quando cultivados, o uso destes organismos demanda infra-estrutura e manejo adequados gerando altos custos operacionais.

Nos sistemas intensivos de produção de peixes, o primeiro alimento dessas larvas é constituído principalmente pelos náuplios de *Artemia* e rotíferos, que são muito bem aceitos pela maioria das espécies de peixes, e são direcionados estritamente às fases iniciais de larvicultura.

O desenvolvimento e uso de rações comerciais surgem como alternativa potencial para substituir o alimento vivo, porém a produção de partículas ou microaglutinados muito pequenos, que contenham alta porcentagem de proteína, pode ser oneroso, além de sofrerem grande lixiviação quando em contato com a água. Este último fator é um ponto negativo na aquicultura, causando grandes problemas por deposição do material orgânico no fundo do tanque e conseqüente poluição ou perda da qualidade de água.

Uma proposta viável seria o uso de microencapsulados funcionando como uma película permeável com cinética de liberação de nutrientes controlada. Estas rações produzidas a partir da microencapsulação, utilizando misturas (blends) de gomas naturais (biopolímeros) e/ou proteínas, podem possibilitar a formação de camadas ou paredes estáveis, pouco solúveis em água e com baixa densidade relativa.

Biopolímeros são utilizados na cobertura e conseqüente imobilização total ou parcial de inúmeros tipos de recheio, tais como: enzimas, proteínas, microrganismos, aditivos alimentícios, pesticidas, compostos farmacológicos e alguns óleos essenciais (TANAKA et al., 1984). Apesar de sua enorme aplicação, sua extensão tem sido limitada somente a "nonfoods", sendo que a área de

alimentos tem sido até agora pouco explorada. O propósito primário das misturas desses biopolímeros é permitir um tamanho adequado de microcápsula e um bom controle de porosidade que favoreça a liberação gradual do núcleo (recheio).

A microencapsulação vem tornando-se um instrumento bem aceito em laboratório para estudos de necessidades nutricionais em larvas de crustáceos (SAKAMOTO et al., 1992), bivalves (LANGDON et al., 1985) e larvas e pós-larvas de alguns peixes (YÚFERA et al., 2000). Os primeiros trabalhos com microcápsulas nesta área baseavam-se em uma mistura de proteína-nylon para construção da parede da cápsula por polimerização interfacial porém, eram potencialmente tóxicas.

Uma opção para evitar o uso de solventes orgânicos ou temperaturas e pH extremos é a ligação iônica de polieletrólitos, onde o biomaterial é encapsulado como gota dentro de uma solução, formando uma gota gelificada (OKHAMAFE et al., 1996).

A microcápsula ideal deve ser capaz de resistir à desidratação e hidratação rápida, sem conseqüente ruptura da membrana externa (matriz), prevenindo assim perdas dos nutrientes por lixiviação e contaminação microbiana. Entretanto, atrativos e estimulantes gustativos do alimento incorporados dentro das dietas devem ser liberados, e para isso, a microcápsula deve possuir uma parede semipermeável.

Diversos trabalhos citados na literatura mostram o desenvolvimento de microcápsulas com uma matriz de parede insolúvel em água ou com limitada solubilidade à base de lipídeos, ceras e proteínas (REINECCIUS, 1995).

As propriedades físico-químicas sugerem que estes biopolímeros possam oferecer características interessantes no desenvolvimento de microcápsulas, pois permitem certo controle da liberação do núcleo, trazendo enormes vantagens para aplicação em alimentos.

2. Objetivo geral

A finalidade deste trabalho foi obter microencapsulados a partir da técnica de polimerização iônica, contendo um recheio adequado para posterior alimentação de larvas de diversos tipos de peixes neotropicais. Para isso buscou-se o desenvolvimento, a caracterização e a comparação das microcápsulas, utilizando como material de cobertura quatro gomas naturais: carragena, alginato, pectina e gelana e suas misturas, avaliando-se também as propriedades de liberação dos encapsulados obtidos.

2.1 Objetivos específicos:

- a. Construção de diagramas de fase dos biopolímeros utilizados, bem como de suas misturas e determinação da viscosidade intrínseca desses biopolímeros;
- b. Desenvolvimento de um aparato para produção das microcápsulas, e de um aparato para medir a liberação protéica ao longo do tempo;
- c. Caracterização das cápsulas e microcápsulas quanto a flutuabilidade, solubilidade em água, tamanho e morfologia;
- d. Secagem das microcápsulas;
- e. Caracterização físico-química das microcápsulas
- f. Acompanhamento da liberação de proteína de tamanho conhecido, pelos microencapsulados produzidos e a liberação após introdução de gordura, nestes sistemas poliméricos;
- g. Determinação da digestibilidade *in vitro* das microcápsulas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microencapsulação

A microencapsulação consiste na cobertura de partículas muito pequenas de ingredientes com um material visando reduzir a reatividade do material encapsulado (recheio) em relação ao meio (luz, oxigênio, umidade, temperatura, etc), controlando a taxa de liberação ou evaporação do mesmo, facilitando o manuseio do material encapsulado (SHAHIDI & HAN, 1993).

A microencapsulação é um processo que permite a variação de diversos fatores (ingredientes alimentares, reagentes e procedimentos) que influenciam nas características finais do produto. Pode ser formada por várias técnicas, onde a escolha do método em particular é determinada, em grande parte, pelas características de solubilidade dos componentes ativos e dos materiais carregados. É uma técnica bastante utilizada, entretanto muitos fatores afetam a estabilidade e a funcionalidade dessas microcápsulas (ROSENBERG & YUNG, 1993).

Para obtenção dos encapsulados, existem diversos métodos que se dividem em: químicos, através de inclusão molecular ou polimerização interfacial; os físicos, como o spray drying, spray chilling, spray cooling, leite fluidizado, extrusão, co-cristalização e liofilização; e os físico-químicos, que incluem a coacervação, separação por fase orgânica e formação de lipossomas (JACKSON e LEE, 1991).

Métodos de microencapsulação como: precipitação, polimerização interfacial e secagem por atomização estão bem estabelecidos (TANAKA et al., 1984; DUPUY et al., 1988; DOUGLAS e SEFTON, 1990). Entretanto, estes métodos não têm sido muito utilizados em trabalhos, cujo objetivo é a liberação do recheio, pois podem envolver a utilização de solventes orgânicos, temperaturas extremas ou condições de pH, que poderiam tornar os mesmos inativos. Uma alternativa é a polimerização iônica ou ligação iônica de polieletrólitos, onde o material é extrusado como gota dentro de uma solução iônica, formando uma esfera gelificada (ROCHA, 2001). Logo

após a formação, as esferas permanecem durante alguns minutos na superfície, e depois de algum tempo, dependendo da concentração e do tipo de cátion, elas diminuem de tamanho e submergem, devido ao aumento de densidade. Este período é conhecido como de maturação e é geralmente alcançado após 15 horas, aproximadamente. Esse sistema gelificado se desenvolve lentamente com o tempo, porque ligações inter cruzadas (reticulação) ocorrem durante a formação do gel, processando-se progressivamente da superfície para o interior da esfera gelificada. Simultaneamente, uma perda de água (sinerése) ocorre e desta maneira o sistema não se encontra inicialmente em um verdadeiro equilíbrio. O peso da esfera decresce com o tempo devido à contração da matriz e a expulsão da água (MESTDAGH e AXELOS, 1998).

Um problema freqüente é a irregularidade das cápsulas, que geralmente apresentam pequenas caudas. Sendo assim, para a formação de cápsulas esféricas, deve-se controlar os parâmetros: natureza e concentração da solução, tipo e tamanho molecular do cátion (MESTDAGH e AXELOS, 1998).

Alguns polímeros, quando em contato com íons, sofrem gelificação. A preparação de microcápsulas através de geleificação iônica envolve uma solução polimérica aquosa, com íons de baixa massa molar. Desta maneira, polieletrólitos de cargas opostas, interagem formando um complexo. Para o sucesso da encapsulação através de gelificação iônica, deve ocorrer a formação de uma estrutura amorfa meta estável, onde a redução do conteúdo de água aumenta a temperatura de transição vítrea, e resulta em uma matriz impermeável para certos compostos orgânicos, bem como para o oxigênio. A permeabilidade à água mantém-se finita (THIES, 1995).

A elasticidade das cápsulas aumenta conforme a afinidade do cátion/poliíon, e este parâmetro também é responsável pelo comportamento da sinerése. A concentração de cátion, a força iônica e o pH determinam a cinética da formação do gel, bem como o volume e estabilidade das cápsulas (MESTDAGH e AXELOS, 1998).

As microesferas poliméricas surgiram como alternativa para que o sistema de liberação controlada pudesse ser administrado de maneira simples, constituindo um sistema matricial no qual uma substância está dissolvida, dispersa ou encapsulada (SHEU e MARSHALL, 1993).

Segundo TREVISAN (1990), na seleção da matriz (cobertura) para imobilização de compostos ativos, diversos aspectos devem ser considerados tais como: as propriedades mecânicas das cápsulas, a forma física e o tamanho de partículas, a resistência ao ataque químico e microbiano, as características de superfície (carga, hidrofobicidade, a adsorção de outras substâncias, superfície específica e composição química), a morfologia do material, a sua permeabilidade, a capacidade de ser derivatizado, o preço e a disponibilidade comercial.

Dietas protéicas, carboidratos e partículas insolúveis em água podem ser incorporadas, e eficientemente mantidas por microcápsulas fabricadas por gelificação iônica, com o uso de hidrocolóides. Estas partículas podem apresentar uma larga distribuição de tamanho (5 a 1000 micrometros), porém apresentam restrições na retenção de compostos de baixo peso molecular ou solúvel em água (VILLAMAR & LANGDON, 1993). No entanto, microcápsulas com parede lipídica são utilizadas inclusive para entrega de micronutrientes, como vitaminas e aminoácidos específicos para animais filtradores marinhos (ostras, mariscos), mas somente uma pequena proporção, entre 5 a 15%, do volume das cápsulas, representa a quantidade de recheio que pode ser encapsulada (VILLAMAR & LANGDON, 1993; LOPEZ ALVARADO et al., 1994; BUCHAL e LANGON, 1998).

De acordo com SHAHIDI & HAN (1993) e THIES (1996), as microcápsulas apresentam uma ampla variedade de estruturas, onde algumas são de geometria esférica, com uma fase interna contínua rodeada por um material de parede também contínuo (estrutura de parede simples), outras podem apresentar uma geometria irregular, com fase interna distribuída em uma matriz do material de parede (estruturas agregadas).

O tamanho de cápsulas pode variar de microns até milímetros, sendo dependente do material e método utilizado no seu processamento. A tabela 1 apresenta os intervalos de tamanho, segundo o processo de obtenção utilizado.

A encapsulação de microrganismos e outros substratos como enzimas, em cápsulas esféricas de alginato de cálcio, têm sido um dos métodos mais largamente utilizados para imobilização desse tipo de material biológico (ROCHA, 2001). O alginato também apresenta propriedades únicas, e é capaz quando utilizado como matriz de encapsular e ou “entregar” uma grande variedade de células e proteínas. Estas propriedades incluem: ambiente aquoso relativamente inerte a matriz, processo de encapsulação em temperatura ambiente, livre de solventes orgânicos, alta porosidade do gel, que permite uma alta taxa de difusão de macromoléculas, habilidade para controlar esta porosidade com simples processo de cobrimento (TANAKA et al, 1984), dissolução e biodegradação do sistema sobre condições fisiológicas normais.

Tabela 1. Tamanho de partícula em relação ao método de encapsulação.

Métodos	Aplicação dos materiais	Tamanho (μm)
Físicos		
Extrusão estacionária	sólido/líquido/gás	1000 – 6000
Bocal submerso	sólido/líquido/gás	700 – 6000
Extrusão centrífuga	sólido/líquido/gás	125 – 3000
Bocal vibrante	sólido/líquido/gás	500 – 2000
Spray drying	Sólido/líquido	5 – 150
Disco rotativo	Sólido/líquido	5 – 1000
Pan coating	Sólido	> 500
Suspensão por ar	Sólido	50 – 10000
Químicos		
Coacervação	Sólido/líquido	1 – 500
Polimerização interfacial	Sólido/líquido	1 – 500
Evaporação do solvente	Sólido/líquido	1 – 5000
Polimerização in situ	Sólido/líquido	1 – 500

Fonte: Southwest Research Institute, 1991.

COPPI et al. (2002), estudando imobilização de proteínas em cápsulas de alginato com o objetivo de avaliarem o grau de "crosslinking" de albumina do soro bovino (BSA) e o polímero, e também o perfil de liberação dessas cápsulas, verificaram que em meio com pH 3,5 as microcápsulas obtidas mostraram alta capacidade de imobilização da proteína, atribuindo esse fenômeno às interações eletrostáticas entre a proteína no estado polication e o alginato no estado polianiónico, formando um complexo alginato-BSA.

Géis de alginato foram usados como padrão de comparação no estudo de características físicas e de liberação de sulfato de sabutamol preparado com diferentes polissacarídeos. As cápsulas foram examinadas por microscópio eletrônico de varredura, calorimetria diferencial de varredura (DSC) e difração em raio-X, para determinar a morfologia e o diâmetro médio, e o conteúdo de material de recheio contido nas capsulas. A liberação do material de recheio foi analisada em solução de HCl 0,1N (pH 1,2), água destilada e tampão fosfato (pH 7,4). O exame físico das cápsulas revelou a presença de cristais do material de recheio, sem interação entre este e os polímeros. A liberação foi dependente das propriedades iônicas dos polímeros e do pH do meio (FATTAH et al., 1998).

De acordo com THIES (1995), as principais propriedades das microcápsulas que devem ser consideradas são: estrutura geral, externa, interna (microscopia ótica e varredura); estrutura fina (raio-X e análise térmica); tamanho e distribuição de tamanho (microscopia e analisador de tamanho de partículas); composição da casca e recheio (análise térmica, cromatografia e espectroscopia); comportamento de liberação (mudança de peso, cromatografia e espectroscopia); propriedades físicas (compressão estática, resistência ao cisalhamento, mobilidade eletroforética) e estabilidade, entre outras.

3.2 Difusão e liberação controlada

A liberação do conteúdo das microcápsulas pode ocorrer através de vários mecanismos, como: ruptura mecânica ou dissolução, temperatura, pH, solubilidade no meio, biodegradação e por difusão (REINECCIUS, 1995). A tabela 2 apresenta alguns sistemas encapsulantes (SOUTHWEST RESEARCH INSTITUTE, 1991), solúveis em água e seus prováveis mecanismos de liberação.

A liberação do material de recheio pode ocorrer de diferentes formas, podendo representar quatro modelos teóricos de curva de liberação. O primeiro mecanismo considera a existência de um mecanismo de disparo (calor, luz, pH e degradações químicas da cápsula) que inicia a liberação. O segundo, assume que a parede da cápsula atua como reservatório, onde a taxa de liberação é constante. O terceiro modelo pressupõe a migração através da parede, mas considera um efeito adicional de liberação ocasionado por pequenos rompimentos na estrutura da cápsula. O quarto modelo considera a parede como uma membrana semipermeável e seletiva a diferentes pesos moleculares (THIES, 1995).

Não existe um único tipo de perfil de liberação que satisfaça todas as necessidades. Os dados de liberação reais tendem a se desviar dos perfis de liberação idealizados, sendo que as liberações lineares ou de ordem zero são menos comuns. As cápsulas desenvolvidas para liberação controlada tendem a apresentar liberação de primeira ordem (CARDOSO, 2000).

A cinética de liberação de primeira ordem ocorre quando o material de núcleo, é na verdade, uma solução. Este tipo de processo é o mais comum e a cinética de liberação obedece ao modelo de difusão de Fick. A cinética de liberação de materiais do recheio, tanto de matrizes poliméricas hidrofílicas, quanto hidrofóbicas, tem sido estudada experimentalmente, e a quantidade liberada representada por uma cinética $t^{1/2}$ tem sido geralmente observada (PAPADOKOSTAKI et al., 1998).

Tabela 2. Sistemas encapsulantes e prováveis mecanismos de liberação.

Sistemas Encapsulantes	Mecânico	Térmico	Dissolução	Químico
Alginato	•			
Carragena	•			
Caseinato	•			
Celulose modificada	•			
Quitosana	•			
Gelatina	•			
Goma xantana	•	•		
Goma arábica	•	•		
Látex	•			
Poliétileno-glicol	•	•		
Polipectato	•			
Polivinil-álcool	•			
Amido	•			
Açúcar modificado	•	•		•

Fonte: Southwest Research Institute, 1991.

No campo da bioencapsulação, muitas aplicações são baseadas nas propriedades de difusão de diferentes solutos para dentro e para fora da matriz gelificada. Suportes gelificados de policarboxilatos são freqüentemente usados como uma matriz para conter moléculas de importância biológica (MESTDAGH & AXELOS, 1998).

A difusão é regida por um gradiente de concentração e de forças atrativas intermoleculares, tais como: pontes de hidrogênio e interações de Van-der-Waals (SHAHIDI & HAN, 1993), controlada pela solubilidade do componente encapsulado na matriz e pela sua permeabilidade através da mesma (REINECCIUS, 1995). A difusão depende do tamanho, forma e polaridade da molécula penetrante, bem como da cadeia do polímero, grau de ligações e quantidade de cristalinidade (TANAKA et al., 1984).

A maioria dos efeitos de difusão relatada em géis pode ser explicada com base na mudança da tortuosidade ou porosidade, mudança no coeficiente de partição, interação de moléculas grandes com a rede da matriz do gel, interação entre solutos com diferentes difusões e efeitos da temperatura (WILLAERT e BARON, 1996).

A expansão do volume de microcápsulas, devido à hidratação, é um fator importante no controle da taxa de liberação de um agente bioativo, assim como na permeabilidade da cápsula, da área de superfície em contato com o meio aquoso e na concentração intracapsular do agente ativo diluído dentro da cápsula. A absorção de água provocou um aumento do volume de microcápsulas de alginato-quitosana de aproximadamente 75% do tamanho original, após 30 minutos de contato com a solução (POLK et al., 1994)

De acordo com KOIDA et al. (1987), o mecanismo de transporte do agente ativo através da microcápsula pode ocorrer: a) através de uma fase polimérica contínua (FLYNN et al. 1974); através de canais interconectados, como poros minúsculos ou pequenos rompimentos; ou c) paralelamente, através da fase polimérica contínua, e através de canais interconectados (BARRIE, 1968), a partir do qual modelos matemáticos de fluxo através da cápsula podem ser estabelecidos.

A difusão de solutos livres em meio líquido em muitas situações utiliza a equação de Stokes-Einsten, onde a constante de Boltzman, a viscosidade do solvente e a temperatura do sistema são considerados na determinação da difusividade (JANOLIO, 1982 apud CABRAL, 1990). Correlações semi-empíricas são também utilizadas, sendo a de Wilke-Chang bastante utilizada (REID et al., 1987).

Considerando a difusão de solutos para dentro e para fora das cápsulas de gel, para solutos de baixa massa molar em comparação a porosidade (10 a 20 μ m), o coeficiente de difusão não foi afetado pelo pH ou força iônica do meio onde se encontravam as cápsulas. O coeficiente de difusão decresceu com a massa molar do soluto, mas a variação do coeficiente nem sempre seguiu a lei de Stoke-Einstein. Ao

contrário do coeficiente de difusão, o coeficiente de partição é afetado pelo pH e/ou força iônica do meio. Isto significa que certas forças atrativas ou repulsivas de interação podem existir entre as moléculas difundidas e as cadeias da matriz de alginato, possibilitando alternativas de retenção/liberação diferenciadas (MESTDAGH e AXELOS, 1998).

Difusividade efetiva de solutos em cápsulas de alginato de cálcio, utilizando-se estado não estacionário, em esferas de gel imersas em volume de líquido finito, foram medidas por TANAKA et al. (1984), utilizando equações estabelecidas por Crank (Equação 1), podendo-se considerar a difusão do interior ao exterior da cápsula ou do exterior ao interior da mesma.

$$C_p = \frac{\alpha}{1 + \alpha} \cdot C_{L0} \cdot \left[1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6 \cdot (1 + \alpha) \cdot e^{-D \cdot q_n^2 \cdot t / a^2}}{9 + 9 \cdot \alpha + q_n^2 \cdot \alpha^2} \cdot \frac{a}{r} \cdot \frac{\text{sen}(q_n \cdot r / a)}{\text{sen} q_n} \right] \quad \text{Equação 1}$$

onde: C_p = concentração do substrato

C_{L0} = concentração inicial do substrato

a = diâmetro da cápsula

r = raio

t = tempo

$$\alpha = \left(\frac{V}{n} \right) \cdot \left(\frac{4 \cdot \pi \cdot a^3}{3} \right)$$

V = volume da solução, excluído o espaço ocupado pelas cápsulas

N = número de cápsulas

q_n = termos de raiz positiva $\neq 0$

LIMA (2001) encapsulou pirazinamida e isoniazida, fármacos utilizados para o combate à tuberculose, em lipossomas medindo a liberação *in vitro* dos recheios

utilizados. O sistema de difusão utilizou saco de diálise contendo as lipossomas, submersos em solução tampão, com agitação branda. Os resultados experimentais foram analisados considerando o sistema como esferas sólidas porosas, modelo difusivo, descrito pela lei de Fick. O ajuste dos dados experimentais a um modelo, ao invés do método convencional dos mínimos quadrados, onde todo o erro é atribuído a variável dependente, utilizou o método da máxima verossimilhança que considera a influência das incertezas das medidas experimentais, onde o detalhamento matemático é descrito na referência.

O processo de liberação em meios aquosos envolve a absorção de água pela cápsula, a dissolução do material de recheio, eventuais quebras de ligações hidrolíticas e, simultaneamente, a difusão do composto encapsulado. Mecanismos de liberação de um recheio encapsulado e sua modelagem matemática em sistemas que podem sofrer erosão, não permitem o tratamento como uma difusão simples ou uma difusão provocada pelo inchamento controlado da matriz, considerando assim, somente o fenômeno de transporte de massa (CRANK 1975; SPIEPMANN e PEPPAS, 2001).

O tipo de polímero e os diferentes processos físico-químicos envolvidos, determinam o controle da liberação, que podem ser afetados pelo tipo de erosão que pode estar ocorrendo. Em geral, dois tipos são observados: uma erosão de superfície, com predominância nas camadas mais externas poliméricas e uma de volume, mais lenta que ocorre no sistema todo, dependente da taxa de inchamento da cápsula. Como comportamento básico, polímeros com grupos funcionais mais reativos tendem a apresentar uma degradação de superfície rápida, enquanto polímeros com grupos funcionais menos reativos tendem a apresentar erosão de volume. Em contraste, o aumento de caminhos de difusão com o tempo dos sistemas de liberação, regidos exclusivamente pela difusão, podem ser compensados pelo aumento da permeabilidade/porosidade do sistema erodido, provocando uma saída constante ou crescente do recheio com o tempo (FAISANT, SIEPMANN e BERNOIT, 2002).

CHARLIER et al. (2000) utilizaram recentemente um modelo para quantificar a liberação em suporte de ácido poli-lactioglicólico (PLGA), considerando a difusão e a degradação, simultaneamente. ZYGOURAKIS (1990) apresentou o primeiro trabalho a simular a degradação do polímero, utilizando técnicas de Monte Carlo, para modelar a difusão. GOEPFERICH (1997) usou também a degradação polimérica (simulada com a técnica de Monte Carlo) e o processo de difusão, via transporte de massa (utilizando a segunda lei de Fick) em sua modelagem de liberação. Recentemente, trabalhos envolvendo esses dois tipos de eventos simultâneos na liberação de fluoracil encapsulado em PLGA foram desenvolvidos com modelagem matemática por FAISANT et al. (2002), onde a análise de tamanho de partícula, calorimetria diferencial de varredura, cromatografia de exclusão molecular e microscopia eletrônica de varredura foram utilizados para a obtenção dos resultados experimentais que fundamentaram o desenvolvimento da modelagem de liberação. Os autores observaram um efeito “burst” inicial, seguido por uma fase de liberação com cinética de ordem zero.

Quando cápsulas de alginato de cálcio são obtidas pelo gotejamento da solução de alginato de sódio contendo o material de recheio na solução de cloreto de cálcio, Coeficientes de difusão de solutos com massas molares menores que 2×10^4 Daltons, como a glicose estudados por HANNOUN e STEPHANOPOULOS (1986), o etanol por POLK et al. (1994) em membranas de alginato decresceram com o aumento da concentração do polímero e a taxa de liberação dependeu diretamente da concentração e composição dos ácidos gulurônico/manurômico, das condições de processamento da cápsula, do pH e da temperatura de fabricação das matrizes. Por outro lado, TANAKA et al. (1984) e KIERSTAN et al. (1982) observaram que as características de difusão de compostos de baixa massa molecular, não foram afetadas pela concentração do íon cálcio ou do gel de alginato.

No caso de compostos de alta massa molecular, como a hemoglobina, a γ -globulina, o fibrinogênio e a albumina, estudados por KIERSTAN et al. (1982),

TANAKA et al. (1984), MARTINSEN et al. (1992), a difusão foi afetada pela concentração do gel de alginato, mas não afetada pela concentração de íons cálcio.

O efeito da dimensão do gel, tipos de alginato e concentrações e extrusão dos íons sobre as propriedades de difusão dos géis de alginato foram estudados por KIERSTAN et al. (1982). O estudo indicou que géis de alginato com alto conteúdo de ácido-polimanurônico possuem boas características de porosidade, enquanto que alginatos com alto conteúdo de ácido poligulurônico formaram géis com baixa porosidade, especialmente a respeito aos compostos de alta massa molecular encapsulados.

O comportamento de liberação de matrizes de alginato em diversos meios de dissolução foi pouco afetado pela viscosidade da solução contendo o alginato. A composição de monômeros similares com diferentes viscosidades intrínsecas de alginato com alto conteúdo de blocos G, blocos M, blocos G e M, produziram curvas de liberação muito semelhantes (OZTBERG & GRAFFNER, 1994). Assim, a difusão controlada é dada pela matriz do gel (TOMIDA et al., 1993).

LOPEZ-ALVARADO et al. (1994) observaram que géis de alginato não foram adequados na retenção de moléculas não lipídicas de baixo massapeso molecular, o mesmo ocorrendo com carragena e zeína. Já os materiais lipídicos serão mantidos dentro da matriz, mesmo sendo de baixa massa molar, quando a solução contendo as cápsulas for aquosa (KING, 1988).

COPPI et al. (2002) estudando a difusão de soro albumina bovina (BSA) através de matrizes de alginato obtidas por spray-drying e polimerização interfacial, observaram que todas as amostras estudadas apresentaram um comportamento de liberação da BSA com 3 fases, sendo a primeira fase com liberação de aproximadamente 5% da proteína, no período de 2 horas, seguida por uma mudança rápida com 35% de liberação em 15 minutos e uma terceira fase, compreendida pela liberação de 60%, depois de 8 horas. Eles atribuíram a primeira fase à resistência ao meio ácido devido a complexa rede cálcio-alginato, a segunda devido a sua ruptura

no fluido intestinal e a terceira devido a matriz de alginato-quitosana, que retardou a liberação do resto de proteína presente na cápsula.

Microesferas com matriz polimérica de pectina produzidas por uma técnica de emulsificação e gelificação externa foram exploradas, e as propriedades de liberação de dois tipos diferentes de fármacos, com diferente solubilidade em água foram estudados por WONG et al. (2002). Eles observaram uma baixa porcentagem de liberação das drogas de baixa massa molecular pelas microesferas que apresentaram pequenos tamanhos (50μ) e uma grande área de superfície específica. Os estudos de correlação matemática indicaram que o perfil de liberação da droga de microesferas de pectinato foi significativamente afetado pelo conteúdo de droga utilizado, bem como pela extensividade de interações droga-pectina nestas microesferas.

O tamanho do poro presente no gel é determinante na difusão de moléculas utilizadas como recheio. Adicionalmente, adsorção de proteínas de baixa massa molar em capsulas de gel alginato pode ser controlada pelo ajuste do pH ou força iônica média. Uma liberação controlada de proteínas pré-adsorvidas pode também ser conseguida de maneira semelhante (VELINGS et al., 1994 em MESTDAGH e AXELOS, 1998). Segundo os autores, a concentração de cátions, a força iônica e o pH determinam a cinética de formação do gel, bem como o volume e estabilidade do suporte. A distribuição do tamanho dos poros varia e influencia a difusão das moléculas. O peso das cápsulas formadas decresce com o tempo devido à contração da matriz e a expulsão da água, alterando assim a porosidade das cápsulas.

MARTISEN et al. (1989) observaram, através de microscopia eletrônica, que cápsulas de alginato apresentaram uma rede com distribuição de tamanho de poro entre 50 e 1500 Å, onde proteínas globulares (30 Å) com carga negativa foram capazes de difundir em proporção dependente do seu tamanho.

Interações entre proteínas e materiais poliméricos dependem dos seguintes fatores: peso molecular da proteína, um importante parâmetro nas características de

difusão; ponto isoelétrico (pI) da proteína (e do polímero em alguns casos), que governam interações de cargas (polímero-proteína e proteína-proteína); presença da cisteína na proteína, que pode participar na formação de pontes dissulfídicas intermoleculares; seqüência de aminoácidos primários na proteína, que podem ser suscetíveis a modificações químicas em associação com o material polimérico; presença ou ausência de carboidratos na proteína, que podem melhorar ou prevenir a interação com o material polimérico e afetar o volume hidrodinâmico da proteína; relativa hidrofobicidade da proteína, que pode interagir com sítios hidrofóbicos no polímero; heterogeneidade da proteína. Estes fatores podem influenciar, juntamente com a taxa de biodegradação do polímero, a taxa de liberação protéica. Estudos *in vitro* de liberação protéica são essenciais para determinar a reprodutibilidade dos sistemas de cinética de liberação e a integridade da proteína liberada; entretanto, não oferecem uma imitação das performances dos sistemas *in vivo*. Muitos polímeros, por exemplo, podem degradar mais facilmente no organismo vivo do que em tubos testes, devido à presença de enzimas proteolíticas (GOMBOTZ e PETTIT, 1995).

Proteínas encapsuladas em matrizes de alginato são liberadas através de dois mecanismos: difusão da proteína através do poro da rede do polímero e degradação da rede do polímero. A carga da proteína pode também influenciar a taxa de difusão através da matriz de alginato, onde proteínas com carga positiva podem interagir com o alginato de carga negativa, inibindo a difusão no gel. Por outro lado, uma proteína com baixo pI (ponto isoelétrico) pode ser liberada mais rapidamente através da matriz, do que seria esperado da difusão molecular livre (GOMBOTZ e WEE, 1998; COPPI et al., 2002).

3.3 Dietas artificiais

Em países cuja produção potencial se focaliza em peixes de considerável valor econômico, um dos desafios é reduzir a dependência de alimento vivo durante

os primeiros estágios larvais de cultivo, como um modo de reduzir os custos de produção (YÚFERA et al., 1999).

Quando usado intensivamente, o alimento vivo apresenta problemas que incluem grandes investimentos no estabelecimento da cadeia alimentar, consumo de tempo e mão-de-obra, fornecimento inconstante, e às vezes, incompatibilidade nutricional, variando significativamente devido às mudanças na composição bioquímica desses organismos.

Nos últimos cinco anos, a safra de cistos de *Artemia* na região dos grandes lagos (E.U.A), maiores fornecedores mundiais, têm sido sazonal, devido às mudanças nas condições climáticas causadas pelo fenômeno “el niño”. A produção total desta safra (1999-2000) alcançou somente 820 t (produto bruto), bem abaixo de safras consideradas “pobres” nos últimos anos, com 2270t. O total do produto abasteceu somente 25% da demanda mundial (KOLKOVSKI, 2001).

PERSON - LE RUYET et al. (1993), calcularam os custos envolvidos com o alimento vivo (como principal *Artemia*) para o cultivo de “seabass” (*Dicentrarchus labrax*). O alimento vivo foi responsável por 79% do custo de produção de juvenis com 45 dias de idade e por 50%, dos custos nos primeiros três meses de cultivo, e representando somente 1,6% do peso seco total do alimento fornecido.

A microencapsulação vem sendo utilizada há alguns anos na elaboração de dietas para espécies aquícolas, com o objetivo de substituir o alimento vivo por alimentos que contenham qualidade nutritiva adequada e controlada para favorecer o desenvolvimento das fases larvais. Os ingredientes dessa dieta apresentam um papel importante na formulação de um sistema estável para elaboração de microcápsulas. De uma maneira geral, uma dieta para larvas deve conter diversas fontes protéicas e lipídicas, além de outros ingredientes como: vitaminas, minerais, lecitina e colesterol (PEDROZA- ISLAS, 2002).

Segundo YÚFERA et al. (1998) e GUTHRIE et al. (2000), microcápsulas podem ser um meio de fornecer microdietas preparadas para larvas de peixes em

substituição ao alimento vivo. Elas têm sido exploradas por alguns anos com o objetivo comum de manter as microdietas intactas até que peixes e larvas possam ingeri-las. No entanto, especial atenção deve ser focada para desenvolver uma microcápsula, cuja matriz retenha componentes hidrossolúveis, que sejam liberados rapidamente quando a microcápsula for ingerida pela larva de peixe. Além disso, a matriz da microcápsula deve ser, em algum grau, biodegradada no intestino da larva, para promover máxima sobrevivência, crescimento e desenvolvimento larval. A necessidade de conhecer, e compreender a habilidade digestiva da larva, também são questões importantes para elaboração desta dieta (SRIVASTAVA et al., 2002).

Baixa assimilação e digestão das dietas têm sido observadas e relacionadas aos baixos níveis de atividade enzimática e ausência de enzimas semelhantes à pepsina (SEGNER et al., 1989; VERRETH et al., 1992; KOLKOVSKI et al. e DAY et al., 1997). Segundo PERSON-LE RUYET (1989); WALFORD e LAM (1992) e SRIVASTAVA et al. (2002), o sistema digestivo não é totalmente funcional quando se inicia a alimentação exógena, na maioria das espécies de peixes. Sem um estômago funcional, a digestão do alimento ingerido ocorre no intestino da larva também chamado canal digestivo, onde o pH permanece alcalino e atividade de enzimas semelhantes à tripsina (principalmente proteases pancreáticas) é responsável pela hidrólise protéica. O processo digestivo pode ser assim sumarizado: o alimento é carregado ao lúmen intestinal sem nenhuma pré-digestão; as proteínas contidas no alimento são hidrolisadas em aminoácidos e polipeptídeos pelas proteases pancreáticas (existentes no lúmen); os polipeptídeos são digeridos novamente pelas peptidases existentes no epitélio intestinal, resultando em polipeptídeos menores e aminoácidos e os peptídeos restantes absorvidos no epitélio retal por pinocitose (KUROKAWA et al. 1996).

Estudos recentes realizados por SRIVASTAVA et al. (2002) determinaram as enzimas digestivas sintetizadas no pâncreas e a hidrólise de proteínas no canal digestivo, em larvas de linguado (*Paralichthys olivaceus*). Eles observaram, através da análise de expressão do mRNA, que as enzimas tripsina, quimiotripsina, elastase,

carboxipeptidase A e B e lipase, estavam presentes nestas larvas. A digestão de proteínas, acompanhada por eletroforese, mostrou que a tiroglobulina desidrogenase, a albumina e o lactato foram bem digeridos, enquanto que ferritina e catalase apresentaram resistência à atividade hidrolítica, indicando a possibilidade de algumas proteínas não serem digeridas em larvas sem um estômago.

Além da qualidade nutricional, a ração para larva deve apresentar características como: boa fluotabilidade, baixa velocidade de sedimentação, baixa taxa de dissolução e lixiviação e apresentar menor custo em relação a dietas vivas (JONES et al., 1993).

A lixiviação de nutrientes das dietas artificiais pode ser controlada pela otimização de técnicas de microencapsulação (ME) ou "microbounds" (MD) (LOPEZ-ALVARADO et al., 1994), através da determinação correta de agentes encapsulantes e suas concentrações (PEDROZA-ISLAS, et al., 1999). Os mesmos autores estudaram o comportamento de diferentes misturas de gomas mesquita (MG), dextrana (MD) e arábica (GA) para microencapsulação de dietas para larvas de camarão. Consideraram, com base no comportamento alimentar das larvas, que os melhores tratamentos seriam aqueles que possuíssem uma taxa de dissolução de 80-90%, após 240 minutos quando colocados em água do mar, e um tempo de fluotabilidade superior a 5 minutos. Na continuidade do trabalho, concluíram que as características de dissolução e tempo de fluotabilidade podem ser os critérios mais importantes para seleção de dietas microencapsuladas.

Em uma seqüência de estudos, YÚFERA et al. (1996 e 1999) estudaram dietas capazes de substituir a primeira alimentação de larvas de *Sparus aurata*. As dietas foram microencapsuladas por polimerização interfacial com o objetivo de obter uma estabilidade físico-química das partículas, boa qualidade da água, e posteriormente, a sobrevivência e o crescimento das larvas. A dieta deveria possuir as mesmas características fisiológicas e estruturais de um alimento vivo. As microcápsulas obtidas apresentaram um tamanho médio de 120 μ m (variação de 50 a 300 μ m), com boa fluotabilidade (baixa densidade aparente de 400-600 g/L) e

conservação de sua forma e estrutura, mesmo depois de 24 horas de hidratação, com pequenas detecções de perda da matéria solúvel representando até 5% do peso seco.

Dietas microparticuladas, com tamanho e qualidade nutricional adequada tem mostrado um grande aumento no cultivo de algumas espécies (GUTHRIE, et al., 2000). Porém, a completa substituição do alimento vivo tem sido limitada, devido à baixa assimilação e digestão dessas dietas (KOLKOVSKI e TANDLER, 1995; YÚFERA et al., 1999; KOLKOVSKI, 2001).

De acordo com KUBITZA (1995), além do sabor, a textura das dietas também é importante na aceitação das mesmas pelos peixes. Com algumas exceções, uma melhor transição alimentar de peixes carnívoros (alimento natural para artificial) é obtida quando rações úmidas são usadas como alimento inicial.

GUTHRIE et al. (2000) estudaram a aceitabilidade de diversas dietas microparticuladas como primeiro alimento de larvas de *Stizostedion vitreum*. Entre essas dietas encontravam-se microcápsulas obtidas de alginato e carragena, que foram comparadas ao alimento vivo constituído de náuplios de *Artemia* sp. Eles observaram que nenhum dos tratamentos teve diferenças significativas ($p > 0,05$) na porcentagem de alimentação da larva (decisão da larva de ingerir o alimento em um primeiro tempo), quando comparadas a *Artemia* sp.

Larvas de peixe “walleye” (*Stizostedion vitreum*) foram cultivadas com formulações de ração totalmente secas; no entanto, a sobrevivência e o crescimento observados foram baixos (KRISSE e MEADE, 1986; NICKUM, 1986; LOADMAN et al., 1989, citados por GUTHRIE et al., 2000). O alimento vivo possui uma densidade de nutrientes muito mais baixa do que as dietas microencapsuladas secas, devido a grande diferença de umidade. Assim, a quantidade de material de parede e a umidade podem alterar efetivamente a entrega ou liberação de nutrientes no intestino da larva. Segundo KOLKOVSKI (2001) a dificuldade da larva de digerir as dietas está relacionada à quantidade de matéria seca de (60 a 90%) presente na dieta, enquanto

o zooplâncton contém apenas 10%. CAHU & ZAMBONINO (1994), acreditam que as larvas são incapazes de digerir as rações secas desenvolvidas para alguns juvenis e peixes adultos.

3.3.1 Digestibilidade *in vitro*

Nos últimos anos, fatores como o custo e o tempo elevado para os ensaios de digestibilidade *in vivo*, renovaram o interesse no desenvolvimento de testes de digestibilidade *in vitro*, que possuem vantagens adicionais de eficácia, fácil desempenho e disponibilidade rápida de resultados (ROZAN et al., 1997).

A digestibilidade *in vivo* é mais acurada por permitir conhecer com exatidão o sistema digestivo do animal utilizado. Apesar disso, é um processo oneroso, requer tempo e infraestrutura adequada (LAZO et al., 1998; SHIPTON & BRITZ, 2002). YÚFERA et al. (2000), também relatam a dificuldade de extrair o pâncreas e o canal digestivo em larvas cujo tamanho é muito pequeno.

Uma grande variedade de testes de digestibilidade *in vitro* têm sido desenvolvido, sendo caracterizados por diferenças nos tipos de enzimas usados, condições de hidrólise, recuperação de produtos finais e tipo de análise executado (HAARD, 1992). Estes testes *in vitro* foram usados extensivamente em estudos nutritivos com animais terrestres, mas têm sido aplicados recentemente aos organismos aquáticos (BASSOMPIERRE et al., 1998 , ALARCÓN et al., 1999; MOYANO & SAVOIE, 2001; ABDUL-HAMID et al., 2002; SRIVASTAVA et al., 2002) Segundo LAZO et al. (1998) e BRUNSON (1997), a precisão de testes de digestibilidade *in vitro* pode ser afetada por um número de fatores, como concentrações e combinações não ótimas de enzimas, podendo subestimar ou superestimar os valores de digestibilidade. No entanto, estes métodos mostram-se acurados para predizer qualidade e disponibilidade protéica, ou ainda por correlacionar bem os valores de digestibilidade *in vivo* de diferentes espécies como humanos, ratos, porcos e peixes (HSU et al, 1977; RICH, et al., 1980; SATTERLEE et al., 1979; ANDERSON et., 1993; EZQUERRA et al., 1997; CARTER et al. 1999).

Segundo ALARCON et al. (1998) as técnicas *in vitro* para estudar a digestibilidade de peixes devem utilizar enzimas obtidas da espécie em estudo ou, em seu lugar, enzimas bacterianas para uma estimativa da atividade proteolítica em peixes.

CHONG et al. (2002) estudaram a confiabilidade de diversos métodos *in vitro* em comparação ao método *in vivo*, determinando a porcentagem de matéria seca e digestibilidade protéica de ingredientes usados na dieta de juvenis de *Symphysodon aequifasciata*. Os resultados indicaram que ambos os métodos apresentaram alta digestibilidade da dieta tanto de matéria seca (87,52%), quanto de proteína (91,18%). Os métodos *in vitro* utilizando enzimas bacterianas e mamárias ou extrato de enzimas do trato digestivo apresentaram as melhores correlações ($r^2 = 0.90$ e 0.85 , respectivamente), com os resultados *in vivo*.

MCGOOGAN & REIGH (1996); CARTER et al. (1999); ALLAN et al. (2000) e CHONG et al (2002) encontraram alta digestibilidade protéica e alta porcentagem de matéria seca para caseína, nos estudos *in vivo* e *in vitro*.

GARCIA-ORTEGA et al. (1998) estudaram a digestibilidade *in vitro* para cistos de *Artemia* sp descapsulados com o uso de um extrato multienzimático e obtiveram valores de 77,8% a 82,8%. Eles também não encontraram diferenças significativas de digestibilidade entre os cistos e amostras de náuplios de *Artemia*.

Um método que vem sendo bastante utilizado para estimar a digestibilidade protéica é o da medida da queda de pH (DIMES e HAARD, 1994; EZQUERRA et al., 1997) e pH-stat (GRABNER & HOFER, 1985; DIMES & HAARD, 1994; EZQUERRA et al., 1997; ALARCÓN et al., 1999; YÚFERA et al., 2000; SHIPTON & BRITZ, 2002). O método acompanha o comportamento do pH de uma suspensão de proteínas durante 10 minutos de incubação com um sistema multienzimático. Os valores encontrados foram altamente correlacionados com a digestibilidade aparente *in vivo* das proteínas em ratos. A principal vantagem do método é a agilidade da estimativa da taxa de hidrólise da proteína. No entanto, a queda de pH durante o período de digestão pode interferir na atividade da enzima e não ser constante durante toda

reação (EZQUERRA et al, 1998), induzindo uma incompleta proteólise das amostras e desta maneira, subestimando o coeficiente de digestibilidade (SHIPTON & BRITZ, 2002). A capacidade tampão de alguns peptídeos, proteínas e outros substratos existentes no alimento podem também influenciar o declínio do pH (DIMES & HAARD, 1994).

3.4 Biopolímeros

Gomas também chamadas hidrocolóides ou biopolímeros são classificadas como polissacarídeos. Elas são adicionadas a alimentos processados, atuando como espessantes, agentes modificadores de textura, estabilizantes de emulsões e espumas, gelificantes na suspensão de outros componentes e outros fins. Entre os principais agentes gelificantes se encontram a gelatina, alginato, pectina, carragena, ágar, amido e metil-celulose (WHISTLER et al., 1993).

Os principais polímeros e suas fontes podem ser divididos em: goma Agar, furcelana, carragena, e alginato obtidas de plantas aquáticas (algas marinhas); goma arábica, goma karaya e goma tragacanto, obtidas de exudados de plantas terrestres; goma guar, goma locusta e goma tara, obtida de sementes de plantas; a pectina obtida de plantas terrestres; a carboximetil celulose (CMC), hidroxipropilcelulose e celulose cristalina obtida de derivados de celulose e a goma xantana, obtida pela fermentação microbiana.

3.4.1 Goma gelana

Trata-se de um polissacarídeo solúvel em água, produzido por fermentação de uma cultura pura de *Sphingomonas elodea* (*Pseudomonas elodea*). Foi descoberto na década de 80, na Pensilvânia, e é um hidrocolóide multi-funcional, produzindo bons resultados em baixas concentrações.

Os açúcares constituintes da goma gelana são a glicose, o ácido glucurônico e a raminose na proporção molar de 2:1:1, conforme mostra a Figura 1. Uma das principais características da goma gelana é que ela forma gel com quase todos os íons, incluindo íons hidrogênio. Sua massa molecular é de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ Da (SANDERSON et al., 1989).

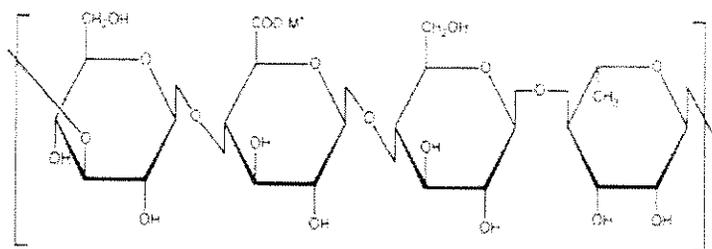


Figura 1. Estrutura química de unidades de goma gelana (fonte: SANDERSON et al., 1989).

).

Sua hidratação em água fria deionizada, pode ser parcialmente ou totalmente inibida se a goma contiver íons divalentes. A completa hidratação é alcançada com o aquecimento da dispersão a 70°C , ou pela mistura de sal monovalente da goma em água deionizada (GIBSON & SANDERSON, 1997). Suas soluções aquosas são altamente viscosas, sendo provavelmente uma dispersão de agregados, do que soluções verdadeiras.

O mecanismo exato de formação de géis de gelana não é bem conhecido. Desta maneira, o estado sólido (gel) é pressuposto ser de moléculas extendidas com formação de três enrolamentos de duplas hélices, entrelaçadas com giro para a esquerda (CHANDRASEKARAN et al., 1992). Acredita-se que a formação do gel ocorra através de associações de íons indutores com estas duplas hélices. Este mecanismo de gelificação sugere uma forte similaridade entre a goma gelana e a carragena, embora para a última existam evidências mais conclusivas (GRANSDALEN & SMIDSRÖD, 1987; SANDERSON et al., 1989).

A gelificação da goma depende da força iônica e da identidade do cátion, para íons monovalentes a força do gel aumenta, na seguinte ordem:

$TMA^+ < Li^+ < Na^+ < Cs^+ < H^+$. Para cátions divalentes a ordem, segue: $Mg^{2+} < Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+} < Zn^{2+} < Cu^{2+} < Pb^{2+}$. A falta de especificidade entre os cátions alcalinos terrosos diferencia significativamente a goma gelana de outros polissacarídeos contendo ácidos urônicos como alginato e a pectina, onde se observa afinidade iônica específica (GRASDALEN & SMIDSROD, 1987).

Medidas de rotação ótica e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), indicaram que a gelificação ocorre em duas etapas simultâneas, a ordenação e associação de cadeias. Esta transição ordenada-desordenada temorreversível, durante o aquecimento e resfriamento é interpretada, em termos, de uma transição hélice-coil reversível, associada simultaneamente à ocorrência de agregados (GRASDALEN & SMIDSROD, 1987).

Embora, somente a forma desacetilada seja comercial, ambas as gelanas (acetilada e desacetilada), formam géis temorreversíveis, variando em propriedades mecânicas de um gel macio e elástico para a forma acetilada, e para um gel duro e quebradiço para a forma desacetilada (KANG & VEEDER, 1982). O gel formado é forte, transparente, apresenta alto ponto de fusão, e pode ser adicionado em grande quantidade. Pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros produtos para produzir uma ampla variedade de texturas.

A adição de cálcio na porcentagem de 0,024 e 0,060 à goma gelana, produziu géis com forças de 5,12 e 4,94 (N/cm²), respectivamente. Com adição de 0,016 - 0,05% de cálcio, a firmeza e a dureza não foram sensíveis às mudanças iônicas, produzindo força e elasticidade do gel relativamente constantes. Para essas concentrações a fraturabilidade e a elasticidade permaneceram constantes (SANDERSON et al., 1989).

A mistura de mais de um hidrocolóide para formação de géis compostos é uma prática comum. A goma gelana é semelhante ao Agar e k-carragena, formando géis instáveis e frágeis, porém pode ser usada em combinações com esses agentes

gelificantes para melhorar as propriedades, como estabilidade ao calor para o caso do Agar, ou estabilidade ácida, no caso da carragena (SANDERSON et al., 1989).

3.4.2 Pectina

É um polímero natural encontrado na maioria das plantas. Este heteropolissacarídeo é obtido comercialmente por extração aquosa de material péctico de algumas frutas, sendo encontrada em maiores quantidades nas frutas cítricas e em maçãs. Ela consiste, principalmente, de ácido galacturônico contendo unidades carboxílicas esterificadas do ácido que formam cadeias lineares interrompidas pela presença do açúcar ramnose a intervalos periódicos, sendo normalmente classificada, de acordo com seu grau de esterificação, conforme apresentado na Figura 2, usualmente em pectinas de baixo e alto teor de esterificação (MAY, 1997).

A pectina é um poliácido apresentando carga negativa em pH baixo, e positiva em pHs elevados. A associação da pectina (poliânion) com um policátion forma produtos insolúveis (NUSSINOVITCH, 1997). Possui boa solubilidade, no entanto necessita ser dispersa em água aquecida, com temperatura acima de 60°C (MAY, 1997).

A gelificação da pectina ocorre através da formação de ligações entre íons carboxílicos da pectina e íons bivalentes (geralmente cálcio) ou tetravalentes, que atuam como ligantes entre as cadeias de pectina. Elas envolvem ligações quelantes intermoleculares do cátion, induzindo a formação de macromoléculas agregadas (KOHN, 1975). Um modelo de “caixa de ovos” tem sido sugerido para a formação da rede de gel (REES, 1982), com íons cálcio, sendo induzida da mesma forma que os géis de alginato. Os géis são geralmente formados a concentrações maiores do que 1%, sendo provável que no estado sol anterior a gelificação a pectina esteja em um estado de rede interpenetrante.

A proporção de cálcio mais usada de acordo com diversos autores (MAY, NUSSINOVITCH, 1997) é de 0,1 a 0,5% do peso do gel, sendo a formação do gel prejudicada na presença de pH muito ácido.

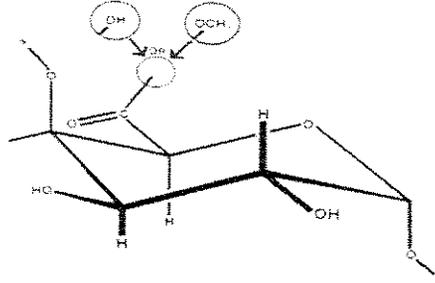


Figura 2. Conformação química da pectina (fonte: MAY, 1997).

Alguns aspectos funcionais ligados à saúde têm sido estudados por muitos pesquisadores. Como exemplos citados por NUSSINOVITCH (1997), a pectina passa inalterada (não sofre degradação enzimática) no intestino grosso, onde bactérias usam o polímero como uma fonte de carbono. Outros, citam que ela é hidrolizada no trato intestinal, produzindo em seguida substâncias não calóricas, promovendo interações com o colesterol na regulação da homeostase do colesterol hepático e metabolismo de lipoproteínas no porco (FERNADEZ et al., 1994), entre outros.

3.4.3 Carragena

É um polissacarídeo linear, aniônico, de alto peso molecular, obtido por extração com água ou água alcalina de certas espécies da classe *Rhodophyceae* (algas vermelhas). É um hidrocolóide formado por unidades alternadas de D-galactose e 3,6-anidrogalactose unidas por ligações β -1,3 e α -1,4 glicosídicas, contendo potássio, sódio e ésteres sulfato (polímero aniônico). A posição e o número de grupos de éster sulfato, bem como o conteúdo de 3,6-anidrogalactose, determinam as diferenças primárias entre os tipos de carragena, que podem ser: kappa, iota e lambda, conforme mostra a Figura 3. (THOMAS, 1997).

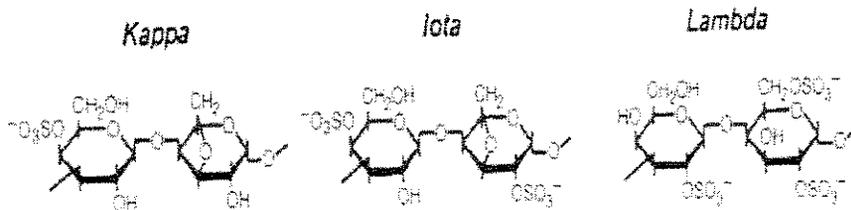


Figura 3. Estruturas químicas da carragena (Fonte: THOMAS, 1997).

Geralmente são polidispersas, isto é, não possuem massa molecular bem definida, variando de 100.000 a 1.000.000 Daltons (GLICKSMAN, 1979; EXTROM et al., 1963 apud MORRIS, 1998).

A temperatura de dissolução não é constante e depende da concentração da goma e dos cátions conduzidos por ela, ocorrendo à temperatura média de 49°C (GLICKSMAN, 1979). Sua viscosidade é profundamente afetada pelo pH e temperatura, aumentando exponencialmente com a concentração. Este comportamento é típico da carragena e outros polímeros de carga linear, (NUSSINOVITCH, 1997).

Embora, estudos (ROCHAS & RINAUDO, 1984) tenham indicado especificidade de ligação à forma "coil" da molécula de polissacarídeo, a grande maioria dos estudos usando atividade iônica, condutividade e RMN, não conseguiram evidenciar especificidade iônica de ligação para iota e kappa-carragena (PICULELL et al., 1989).

O mecanismo de gelificação proposto por REES (1982), sugere a necessidade de carga positiva para formar gel, e que a formação de hélices é requerida para que a gelificação das carragenas ocorra. A estrutura helicoidal formada constitui-se em dupla hélice (PLASHCHINA et al., 1986 apud MORRIS, 1998). Ambas, kappa e iota carragena, determinam a variação da textura do gel, formado a 40-70°C, dependendo do conteúdo de cátion. A κ-carragena produz géis rígidos e fortes exibindo algumas vezes sinerese. Ela contém 25% de ester sulfato e 34% 3,6-anidrogalaactose. A iota carragena produz géis elásticos, formando associação das

hélices com íons cálcio sendo esta associação limitada que contribui para elasticidade, não se observando sinerése. O gel é claro e estável quanto ao congelamento e descongelamento. Estes géis também podem ser refundidos pelo aquecimento a uma temperatura de 5 a 10°C acima do seu ponto de gelificação (STANLEY et al., 1992). A uma dada concentração, a rigidez, a turbidez, a histerese térmica e a tendência a sinerese, seguem a seguinte ordem: κ -carragena > γ -carragena, implicando que estas características são favorecidas por um baixo nível de sulfitação (REES, 1972 apud MORRIS, 1998). A gelificação pode ser induzida por cátions divalentes ou monovalentes (WATESI & NISHINARI, 1981 apud MORRIS, 1998).

BAYLEY (1955), baseado no estudo de difração de raio-X, propôs outro modelo que seria uma estrutura “caixa de ovos”, em que cátions de tamanhos favoráveis encaixam nas cadeias, formando uma associação. MORRIS et al. (1980) e YUGUCHI et al. (2002), sugerem que ocorra um modelo modificado de gelificação, quando uma quantidade de íons é incluída entre as duplas hélices.

A carragena possui capacidade de se combinar com algumas proteínas, especialmente às do leite, como a caseína, produzindo géis fortes, mesmo a baixas concentrações, entre 0,1% - 0,2% (GLICKSMAN, 1982; BOBBIO & BOBBIO, 1992). Misturas com outros hidrocolóides permitem obter uma grande variedade de texturas, produzindo géis estáveis à temperatura ambiente, adequados a formulação de produtos que não requerem refrigeração ou necessitem de maior retenção de umidade (THOMAS, 1997).

Coberturas contendo carragena como componente principal, têm sido aplicadas em uma grande variedade de alimentos para transportar agentes antimicrobianos e reduzir a umidade, oxidação ou desintegração de produtos alimentícios (KROCHTA e MULDER-JOHNSTON, 1997).

3.4.4 Alginatos

São polímeros lineares de alta massa molar com secções rígidas e regiões flexíveis, formados por monômeros de ácido β -D-Manurômico (M) e ácido α -L-Gulurômico (G), unidos linearmente através de ligações glicosídicas α -1,4, onde existem três tipos de estruturas de blocos: blocos de ácido β -D-Manurômico (M), blocos de ácido α -L-Gulurômico (G) e uma mistura desses blocos (COTTRELL & KOVACS, 1980). Conforme apresentado na Figura 4, a composição molecular específica de uma amostra de alginato depende da alga e do local de extração, podendo ocorrer variações nas porcentagens de ácido manurômico (M) e gulurômico (G)(THIES, 1995.). A composição e a extensão das seqüências, bem como o peso molecular, determinam suas propriedades físicas (GOMBOTZ & WEE, 1998).

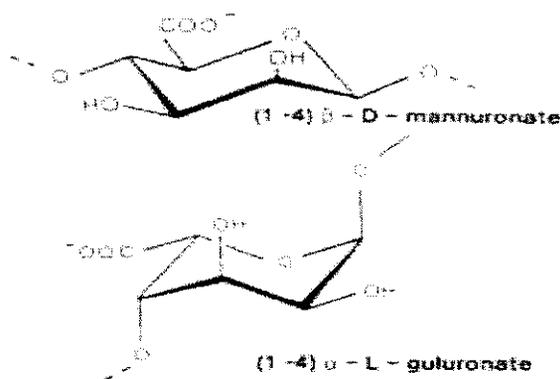


Figura 4. Conformação dos ácidos β -D-manurômico e α -L-gulurômico (Fonte: THIES, 1995).

A gelificação depende do tipo de cátion, onde o alginatos ricos em blocos G tem seu módulo de elasticidade aumentado na seguinte ordem: $Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$, com grande seletividade ao cálcio, atribuídos a sítios de ligação específicos de cálcio com grupos carboxílicos do ácido poligalacturômico, implicado em ligações interblocos G pelos íons cálcio. Essa gelificação e reticulação do polímero alcançadas principalmente pelas mudanças dos íons sódio dos ácidos gulurônicos por cátion divalentes, formam a agregação destes grupos dando a característica de uma estrutura "caixa de ovos" (GOMBOTZ & WEE, 1998). Esse mecanismo de formação do gel do alginato no modelo "caixa de ovos" proposto por

GRANT (1973), pode ser explicado pelas interações de segmentos G com íons cálcio. As regiões de blocos G são alinhadas lado a lado, resultando na formação de cavidades. Os íons cálcio fazem uma junção entre as cadeias, semelhante ao ovo numa caixa de ovos, formando uma rede tridimensional. A força do gel está diretamente relacionada com a quantidade de zonas de junção e a natureza das associações envolvidas nestas zonas.

Estudos viscosimétricos e de *light scattering* (SMIDSROD e HAUG, 1968 apud MORRIS, 1998), de soluções de alginato de sódio mostram um comportamento polieletrólítico, apresentando um alto grau de extensibilidade em solução a baixa força iônica, sugerindo uma macromolécula mecanicamente inflexível. (SMIDSROD, 1970).

Na formação de uma matriz de gel na presença de íons cálcio, cátions divalentes de cálcio são unidos a moléculas polianiônicas de alginato, formando uma zona de junção, possibilitando a formação da rede do gel à temperatura ambiente. A principal vantagem do gel de alginato é sua habilidade de ser termoestável, podendo ser armazenado à temperatura ambiente (ONSOYEN, 1997). Segundo THIES (1995), quando uma solução aquosa de alginato de sódio é adicionada por gotejamento a uma solução aquosa de cloreto de cálcio, um gel esférico, com forma e tamanho regular, pode ser formado. Essas capsulas são atóxicas. A matriz formada pode determinar a difusão do recheio ao exterior e de solvente ao interior das cápsulas de gel formadas. Entretanto, a erosão dos géis de alginato é um problema importante, uma vez que pode ocorrer a aceleração na liberação do material de recheio (SEZER e AKBUGA, 1999).

Algumas propriedades relevantes em géis de alginato de cálcio que incluem rigidez mecânica, aumento de volume, colapso da matriz e resistência a interferentes, como cátion monovalentes, são altamente dependentes da massa molecular desse polímero, bem como da proporção ácido manurômico e gularômico e no conteúdo de blocos GG. Alto conteúdo de blocos G e blocos G longos produz géis de alginato, com maior reatividade ao cálcio e mais forte potencial formador do gel,

rígidos, transparentes e mais quebradiços (SMIDSROD, 1974 apud MORRIS 1998, MARTINSEN et al, 1989; ONSOYEN, 1997). Esses géis também apresentam uma maior abertura dos poros e exibem alta taxa de liberação para proteínas, que podem estar relacionadas à baixa retração deste tipo de gel ou a diferença na barreira de difusão na superfície das esferas (MARTISEN et al., 1992). Em oposição, observação experimental por OSTBERG & GRAFFNER (1994) apontaram para uma redução na taxa de liberação, através da matriz.

3.4.5 Misturas de polissacarídeos

3.4.5.1 Misturas binárias

Estudos de misturas de polissacarídeos tem se tornado uma área de importância crescente nos últimos anos, com grande número de combinações de polissacarídeos. Quando dois polissacarídeos são misturados, e então gelificados, é possível definir um certo número de estruturas resultantes da mistura. Quatro tipos de estrutura podem ser descritas: redes provenientes de entumescimento, redes provenientes de separação, redes interpenetrantes e redes pareadas. As redes provenientes do entumescimento, consistem de duas redes independentes no mesmo volume, apresentando alguma interpenetração; as redes de separação de fase resultam da incompatibilidade ou mistura de polissacarídeos e as redes pareadas apresentam dois diferentes polissacarídeos, que podem se ligar através de novas zonas de junção heterotípicas (CAIRNS et al., 1987). Essas estruturas representadas por modelos, podem ser observadas na Figura 5.

Não deve ser assumido que a mistura A-B dos polímeros, sempre forme um tipo particular de mistura, o que pode ser determinado pela relação entre os componentes. Diversas técnicas têm sido utilizadas para o acompanhamento de concentração da mistura resultante incluindo a utilização de corantes específicos para o amido, o exemplo mais comum de separação de fases (HERMANSSON, 1995). Pela variação das condições, onde está ocorrendo a gelificação, é possível

variar a estrutura e textura dos géis misturados. Várias revisões importantes sobre os sistemas binários são disponíveis (WILLIAMS & PHILLIPS, 1995; MORRIS, 1995).

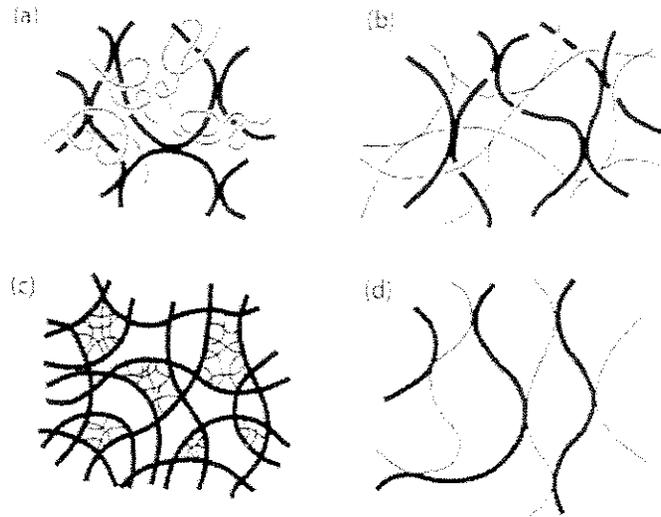


Figura 5. Modelos estruturais da rede de gel para misturas binárias. a) rede de entumescimento; b) rede interpenetrante; c) rede de fase separada e d) rede pareada.

Várias misturas binárias foram estudadas incluindo géis de xantana-galactomanana (NAKAMURA, 1986), xantana-glucomanana (DEA et al., 1986). Em misturas de pectina-alginato, a textura depende da relação de blocos M/G do alginato e do grau de esterificação (DE) da pectina, da relação pectina-alginato, pH e conteúdo de açúcares da mistura (THOM et al., 1982).

3.4.6 Misturas ternárias e quaternárias

A abordagem utilizada para o sistema binário pode ser estendida aos sistemas ternários e quaternários com alguma dificuldade adicional na interpretação dos resultados, segundo MORRIS (1998).

3.4.7 Diagrama de fases

MESTDAGH e AXELOS (1998) construíram um diagrama de fase (concentração molar de íons divalentes X concentração polimérica) utilizando pectina de baixo teor de esterificação e alginato, obtendo duas principais regiões separadas por uma curva. Abaixo desta linha somente uma fase homogênea e transparente foi observada, que podia ser uma solução ou um gel. Acima da linha, os autores observaram duas fases: uma fase escassa em polímero, transparente, em equilíbrio com uma fase rica polimérica que podia ser um precipitado, grandes agregados de microgels ou um gel denso e uniforme.

A construção dos diagramas de fase permitem identificar as regiões formadoras de gel em função das concentrações do polissacarídeo e íon utilizado, e também as regiões de concentração onde a formação do gel é instantânea, desejável para a formação das microcápsulas nesse trabalho. Relações mais específicas podem ser utilizadas para melhorar o grau de informação do diagrama, substituindo a concentração do polissacarídeo, pela concentração efetiva de grupos carboxílicos disponíveis à associação iônica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

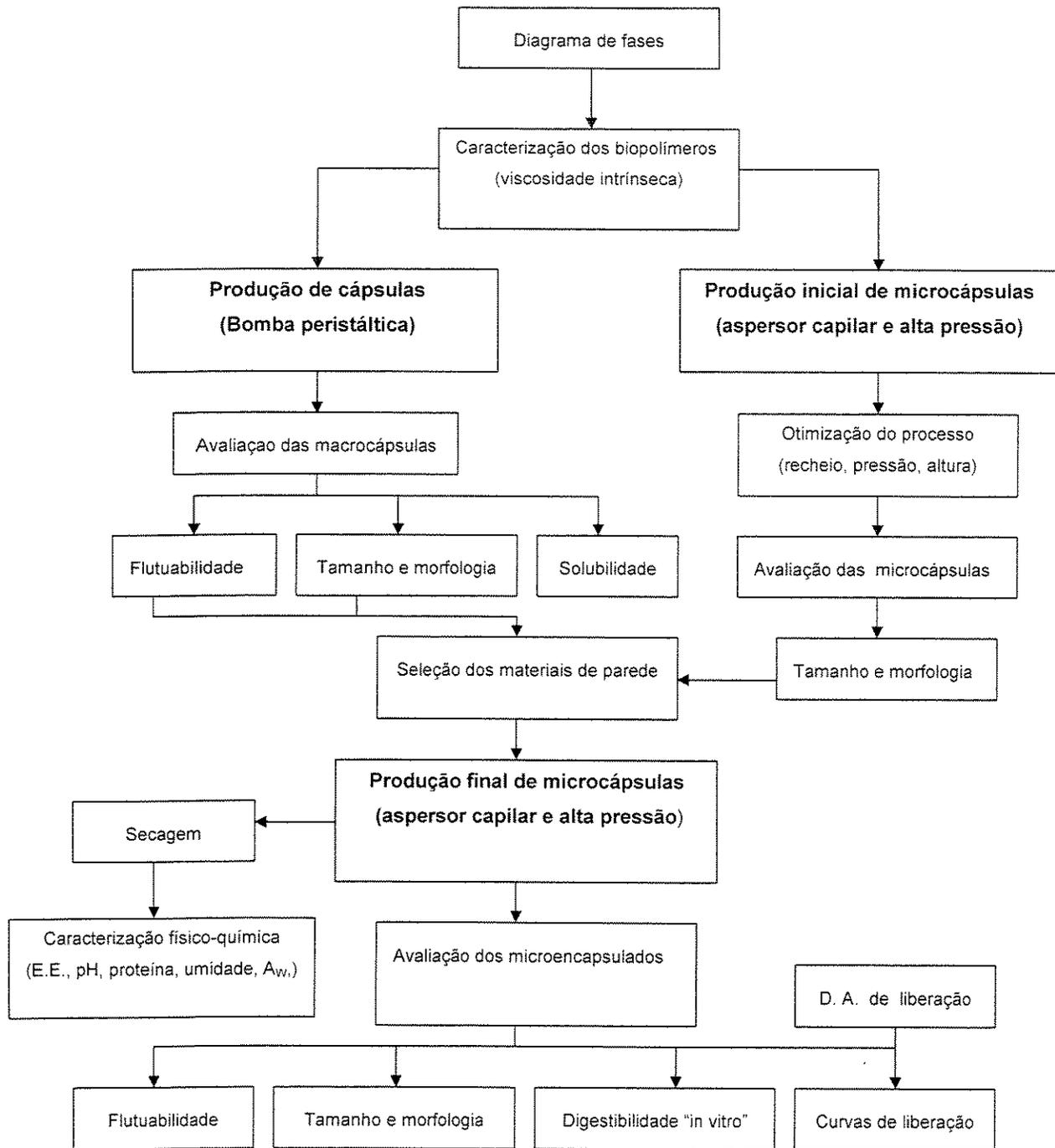
Para a formação das cápsulas e microcápsulas foram utilizados:

- alginato de sódio tipo Manugel DMB (alta massa molar, alto conteúdo de grupos guluronato), lote 500771, ref. 669990, cedido pela Companhia Nutrasweet Kelco/Monsanto;
- goma gelana purificada, alto peso molecular. lote 9L0020A, marca Monsanto;
- pectina cítrica, baixo teor de metoxilação (BTM) amidada tipo 8002/R; teor de metoxilação 26-30%, grau de amidação 15-21%, lote 11655, ref.11.9900, marca Citrus Colloids S/A, cedida pela Ind. Braspectina S.A. Este material foi fornecido sem padronização, ou seja, sem adição de açúcar;
- carragena, lote 48470, cedida pela Ind. Agar Brasileiro;
- cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), lote 64271, marca Merck;
- cloreto de potássio (KCl), lote 80023, marca Merck.

Como material de recheio foram utilizados: óleo resina de páprica Citromax, anelina em pó comercial, caseína comercial, marca Mcassab e gordura vegetal hidrogenada, marca Prime.

4.2 Métodos

O Fluxograma (Fig. 6) apresentado abaixo resume os itens e as caracterizações efetuadas no presente trabalho:



Nota: E.E.= Eficiência de encapsulação; A_w = Atividade de água; D.A.= Desenvolvimento do aparato de difusão.

Figura 6 Fluxograma do desenvolvimento do trabalho.

4.2.1 Diagrama de fases

A identificação da região onde ocorre a formação de gel foi investigada para sistemas contendo os polissacarídeos individuais, em misturas binárias, ternárias, quaternária, conforme descrito na Tabela 3 (planejamento de misturas em rede simplex - NETO et al.,2001). Os materiais foram dispersos em água destilada nas seguintes concentrações de solução: 0,25, 0,50, 0,75, 1,0 e 1,2%, e combinados com uma solução de cloreto de cálcio com concentrações de 0,125, 0,25, 0,50, 0,75, 1 e 1,5%.

Os tratamentos foram conduzidos em triplicata, de acordo com o planejamento definido na tabela 3.

Tabela 3. Planejamento experimental para uso das misturas dos biopolímeros como material de parede (cobertura), expressos em porcentagem.

Tratamentos	Biopolímeros			
	Pectina	Carragena	Gelana	Alginato
PE	100	0	0	0
CA	0	100	0	0
GE	0	0	100	0
AL	0	0	0	100
PE33-CA33-GE33	33	33	33	0
PE33-CA33-AL33	33	33	0	33
PE33-GE33-AL33	33	0	33	33
CA33-GE33-AL33	0	33	33	33
PE25-CA-25-GE25-AL25	25	25	25	25
PE50-CA50	50	50	0	0
GE50-AL50	0	0	50	50
PE50-GE50	50	0	50	0
CA50-GE50	0	50	50	0
CA50-AL50	0	50	0	50
PE50-AL50	50	0	0	50

As soluções poliméricas e de cloreto de cálcio foram aquecidas à temperatura de 70°C, com agitação lenta no aquecedor com agitador. Após o aquecimento, pipetou-se 2,5 mL da solução polimérica e 0,5 mL da solução de cloreto de cálcio dentro de um tubo de ensaio e agitou-se no agitador de tubos por 10 segundos, sendo depois colocada em repouso a temperatura ambiente. Logo após o preparo, foram feitas observações visuais para verificar se houve a ocorrência de gelificação instantânea, e após 24 horas, para a ocorrência de transição sol-gel e gel-sinerese. A observação imediata e a realizada depois de um período de 24 horas foram utilizadas para construção do diagrama de fase.

Para o tratamento com carragena, onde não se observou nenhum ponto de gelificação instantânea preliminarmente, utilizou-se o mesmo procedimento para formar os géis, porém substituiu-se a solução de íons cálcio por íons potássio. Outro procedimento para esse biopolímero, também adotado foi introduzir as soluções já misturadas em banho refrigerado na temperatura de -4 °C por 1 minuto.

4.2.2 Caracterização dos Biopolímeros

4.2.2.1 Viscosidade intrínseca

Previamente foram preparadas soluções com concentração igual a 0,5 % de alginato, goma gelana e pectina. As soluções foram deixadas em repouso por 24 horas para uma boa hidratação, e depois homogeneizadas e aquecidas à temperatura de 50° C, com agitação magnética por 30 minutos, para solubilização desses materiais. Soluções aquosas desses biopolímeros com diferentes concentrações foram preparadas com a diluição da solução inicial de 0,5%.

As soluções de alginato e pectina foram preparadas em soluções de cloreto de sódio 0,1M (SMIDSROD, 1970) e as soluções de goma gelana foram preparadas em solução de hidróxido de tetrametilamônio 0,025M (DREVETON et al., 1996). Todas as soluções foram preparadas em duplicata.

A densidade destas soluções diluídas foi determinada com o uso de um picnomêtro de 25 mL.

A viscosidade intrínseca foi determinada utilizando-se um viscosímetro capilar tipo Ostwald-Cannon-Fensk (nº 100). O volume de solução condicionado foi mantido constante (10,0ml). Foram feitas para cada ponto um mínimo de cinco medidas do tempo de escoamento entre os dois meniscos característicos do viscosímetro em uso. A viscosidade intrínseca foi determinada a $22,5 \pm 0,3$ °C, estando o viscosímetro imerso em banho termostático com circulação. A viscosidade intrínseca foi determinada pelas equações abaixo (HARDING, 1998):

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_{sol}}{\eta_{H_2O}}$$

Equação 1

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$$

Equação 2

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C}$$

Equação 3

$$\eta_{iner} = \frac{\ln \eta_{rel}}{C}$$

Equação 4

onde:

η_{sp} = viscosidade específica (mL/g)

η_{sol} = viscosidade da solução (mL/g)

η_{H_2O} = viscosidade da água (mL/g)

η_{iner} = viscosidade inerente (mL/g)

η_{red} = viscosidade reduzida (mL/g)

η_{rel} = viscosidade relativa (mL/g)

C = concentração da solução (g/mL)

As viscosidades da solução e da água (solvente) foram determinadas de acordo com a equação 6.

$$\frac{\eta}{\rho} = Kt$$

Equação 5

onde:

K = fator de conversão para o Cannon-Fenske (nº100) = 0,015

t = tempo de escoamento (s)

ρ = densidade relativa da água

A viscosidade intrínseca para os polímeros foi determinada como sendo o ponto de intersecção comum das retas $\eta_{red} \times C$ e $\eta_{iner} \times C$.

4.2.2.2 Determinação do pH

Os valores de pH das soluções de polissacarídeos (alginato, carragena, pectina e goma gelana), contendo juntamente o material a ser encapsulado foram determinados em potenciômetro digital (Digimed, DM 20) a 25°C.

4.2.3 Formação das macrocápsulas

As cápsulas foram produzidas considerando os polissacarídeos usados individualmente, com misturas binárias, ternárias e quaternária, de acordo com o planejamento descrito na Tabela 3, sendo que apenas as concentrações de solução polimérica e cloreto de cálcio que apresentaram gelificação instantânea (diagramas de fase) foram utilizadas.

As soluções foram aquecidas a 70°C com agitação lenta, adicionando-se anelina em pó à solução polimérica para que a matriz adquirisse cor. Esta solução foi

gotejada com auxílio de uma agulha hipodérmica nº15-5 (canola 4mm) e através de bomba peristáltica (Cole-Parmer Materflex 7553.20), na solução de cloreto de cálcio, com velocidade média de 1ml/minuto. As cápsulas gelificadas foram mantidas nesta solução por 30 minutos para permitir sua maturação e cura, sendo depois coletadas com peneira, lavadas com água destilada e destinadas a medidas de tamanho e flutuabilidade.

4.2.4 Caracterização das cápsulas

4.2.4.1 Solubilidade

Foram pesadas 3 g de cápsulas curadas e lavadas, obtidas em cada tratamento, transferindo-as para tubos de ensaio, contendo água a temperatura de 25°C. Os tubos foram colocados em agitador de tubos rotativo (Phoenix AP 22) e um tubo de cada tratamento foi retirado aos 60, 120, 180 e 240 minutos, sendo o material filtrado à vácuo em papel Whatman nº40 (tarado). O papel então foi seco em estufa com circulação de ar a 60°C, até peso constante (PEDROZA-ISLAS *et al.*, 2000). O procedimento foi feito em triplicata. A porcentagem de solubilização foi obtida por diferença de peso, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Solubilidade}_{\text{cápsulas}} = \text{Peso inicial (cápsula)} - \text{Peso final (cápsula não solubilizada)}$$

4.2.4.2 Flutuabilidade

A flutuabilidade ou capacidade de flutuação (CF) foi medida com base no método usado por PEZZATO *et al.*(1997), sofrendo pequenas adaptações.

Em um aquário de 30x14x25cm, com água doce estática (24°C), cápsulas foram colocadas na superfície de uma coluna de água de 12 cm, medindo-se o tempo requerido (segundos) para que as mesmas chegassem ao fundo da coluna.

Essa prática foi repetida dez vezes para cada tratamento. Este método foi utilizado para cápsulas curadas úmidas.

4.2.4.3 Microscopia ótica

A morfologia das cápsulas foi observada em microscópio ótico NIKON (Eclipse E800 – Japan), utilizando-se objetivas de 10X e 20X . A captação de imagens foi realizada através do software Image Pro Plus 4.0.

4.2.5 Produção inicial das microcápsulas

Para a formação das microcápsulas, todos os tratamentos foram padronizados com a concentração de solução polimérica e de cloreto de cálcio iguais a 1%.

A solução polimérica foi aquecida a 70°C com agitação lenta adicionando-se diferentes quantidades de óleo resina de páprica, onde a relação de matriz/recheio estudada foi de 3:1, 1,5:1, 1:1 e 0,75:1. A adição de óleos resina permitiu uma melhor visualização da formação das microcápsulas, devido a intensa cor laranja apresentada. Em seguida, estas soluções foram passadas por homogeneizador (Armfield FT9) de alta pressão (70 kg/cm²) com 5 ciclos de passagem.

A solução polimérica foi então aspergida sobre uma solução de cloreto de cálcio com agitação lenta, através de um aspersor capilar de vidro, para formação das microcápsulas. O aspersor estava conectado a um erlenmeyer e a produção das gotas foi feita por um fluxo de ar comprimido. Entre o bico aspersor e a superfície da solução iônica, foram testadas três pressões de trabalho: 0,60, 0,75 e 0,90kgf/cm² , em três diferentes alturas de 18, 28 e 38 cm.

O aspersor foi construído de forma a possibilitar a formação de microcápsulas, na faixa de tamanho (150 μ) adequado à alimentação futura das larvas dos peixes.

Após a definição da melhor quantidade de recheio, pressão de trabalho e altura de pulverização, todas as combinações dos biopolímeros, encontrados na tabela 3, foram utilizados para obtenção das microcápsulas com recheio de óleo-resina de pimenta. Após a formação as microcápsulas gelificadas foram mantidas na solução de íons por 30 minutos para cura, e a seguir, transferidas para solução aquosa e armazenadas em geladeira.

4.2.5.1 Morfologia e distribuição do tamanho

A morfologia e o tamanho das microcápsulas foram observados em microscópio óptico NIKON (Eclipse E800 – Japan), utilizando-se objetivas de 10x e 20x . A captação de imagens foi realizada pelo software Image Pro Plus 4.0. O tamanho foi avaliado em amostras contando 100 unidades de microcápsulas, para cada tratamento.

4.2.6 Produção de microcápsulas contendo proteína

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de flutuabilidade, estrutura e morfologia das cápsulas, foram selecionados os materiais de parede descritos na tabela 4, para produção das microcápsulas com recheio de proteína e posteriormente com recheio de proteína e gordura vegetal hidrogenada.

As soluções poliméricas foram preparadas na concentração de 1% (p/p). O recheio constituiu-se de uma solução de caseína (CAS), com concentração de 11,5% (p/p) solubilizada em pH 9.0. A mistura das duas soluções na proporção de 9:1 (solução polimérica:solução protéica) foram mantidas a 65° C e homogeneizadas em homogeneizador Ultra-Turrax T50 (IKA, Works do Brasil) a 10.000 rpm/1 min produzindo uma solução contendo 11,5mg de proteína/g de solução e 9mg de polissacarídeo/g de solução. Esta solução foi pulverizada através de um aspersor

capilar de vidro sobre pressão de ar de 0.90 Kg/cm² e altura constante de 18 cm entre o pulverizador e a solução iônica, 1% em CaCl₂(p/p), mantida sob agitação lenta e a temperatura ambiente (23 °C). As cápsulas foram mantidas na solução iônica para cura por 30 min, e em seguida separadas por peneira (0.125mm), lavadas com 700ml de água bidestilada e transferidas imediatamente para o ensaio de liberação. Todas as preparações foram feitas em triplicata.

Tabela 4. Tratamentos selecionados.

Material de parede (matriz)	Recheio
AL	CAS
GE	CAS
PE	CAS
CA	CAS
GE-AL	CAS
PE-GE-AL	CAS
AL	CAS + GVH
GE	CAS + GVH
PE	CAS + GVH
CA	CAS + GVH
GE-AL	CAS + GVH
PE-GE-AL	CAS + GVH

4.2.7 Produção de microcápsulas contendo proteína e gordura

As soluções poliméricas foram preparadas como anteriormente utilizadas. O recheio constitui-se de uma mistura contendo 60% de gordura vegetal hidrogenada (GVH), fundida a 70° C e misturada a 40% de uma solução de caseína (11,5% p/p). A homogeneização da solução polimérica com o recheio contendo gordura foi feita nas mesmas condições já descritas produzindo uma solução com relação mássica final de 9 mg de polissacarídeo/g de solução, 4,6 mg de caseína/g de solução e 60mg de gordura/g de solução. A produção, cura, separação e lavagem das microcápsulas foi igual aos procedimentos adotados para as microcápsulas sem gordura diferindo apenas na temperatura da solução de cálcio (1% p/p), que foi de

aproximadamente 5° C para o enrijecimento da gordura vegetal. Todas as preparações foram feitas em triplicata.

4.2.8 Secagem das microcápsulas

As microcápsulas foram congeladas (-18° C) e em seguida transferidas para a câmara de congelamento do liofilizador, onde atingiram a temperatura -40°C e submetidas a uma pressão de 0,1mm de Hg. O ponto final de secagem foi estabelecido para a temperatura final de 25°C por 2 horas (48 horas para o ciclo completo). O material seco foi peneirado, e as frações entre 0.6 e 0.125 mm foram reunidas e a amostra armazenada em dessecador/sílica gel, a temperatura ambiente. Posteriormente esse material foi avaliado quanto a liberação do recheio protéico.

4.2.9 Caracterização físico-química das microcápsulas

As microcápsulas foram caracterizadas em relação à quantidade de proteína total na cápsula (Kjeldahl – A.O.A.C., 1998), umidade (A.O.A.C.,1998), e eficiência de encapsulação (E.E.%) do material de recheio que foi calculada através da determinação da proteína remanescente nas cápsulas após o processo de cura, em relação à quantidade de proteína presente na solução antes da formação das cápsulas, expressa em porcentagem.

$$\% E.E = 100 - \left(\frac{\text{proteína encapsulada (g)}}{\text{proteína inicial (g)}} \cdot 100 \right)$$

Equação 6

4.2.10 Eletroforese

Amostras de 0,05 g de caseinato de sódio purificado em 5mL de tampão foram preparadas de acordo com SHALABI e FOX (1987), sendo aplicadas 5 μ L nos géis de corrida.

A eletroforese em gel de uréia foi realizada utilizando-se uma unidade Mini-Protean Biorad, de acordo com método modificado por FARKYE et al. (1991) a partir do método de ANDREWS (1983) em concentração de 12,5 % em acrilamida. e 49% de uréia. A corrida foi efetuada a 120 V com 2 horas de duração. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G250, de acordo com o método de BLAKESELY e BOEZI (1977).

4.2.11 Avaliações dos microencapsulados

4.2.11.1 Flutuabilidade

A flutuabilidade ou capacidade de flutuação (C.F.) foi medida em uma cubeta de quartzo 4,0x2,0x23,0cm, contendo água destilada (24°C). Foram pesadas aproximadamente 2g de microcápsulas úmidas com recheio de proteína e gordura que foram introduzidas na superfície da coluna de água, registrando-se imagens através da câmera Pentax K-100 (lente macro 100 mm) ao longo do tempo, nos intervalos pré-determinados: t=0 (imediatamente após as cápsulas serem colocadas na superfície da coluna de água), 0,75, 1, 5, 10, 30 e 60 minutos. O experimento foi conduzido em triplicata.

4.2.11.2 Curvas de liberação do recheio protéico

4.2.11.2.1 Determinação de proteínas

Anteriormente a construção das curvas de liberação protéica das microcápsulas foi necessário avaliar e definir um método adequado de medida de

proteína em solução. Uma curva padrão de caseína (comercial, Mcassab – 82,44%) e BSA (recristalizada 2x Sigma – 99%) foi construída pelo método modificado de Bradford (SEDMAN & GROSSBERG, 1977) e absorvância direta em ultravioleta - UV (280nm), onde alguns pontos foram também medidos por Kjeldahl.

Os valores obtidos em UV foram ainda corrigidos pelo coeficiente de extinção molar da caseína e da BSA. Para determinação do coeficiente utilizou-se as seguintes fórmulas:

1) coeficiente de extinção a 205 nm:

$$E(205) = 27 + 120 \cdot \left(\frac{A_{280}}{A_{205}} \right) \quad \text{Equação 7}$$

A concentração da proteína, a 205nm, pôde ser determinada pela relação:

$$[proteína] = \frac{A_{205}}{E_{205}} \quad \text{Equação 8}$$

2) coeficiente de extinção a 280 nm:

$$E_{280} = \frac{A_{280}}{[proteína]} \quad \text{Equação 9}$$

Para a construção das curvas de liberação o teor de proteína foi então, determinado pelo método modificado de Bradford (SEDMAN & GROSSBERG, 1977), corrigido para valores de Kjeldahl e comparados ao conteúdo inicial de proteína nas microcapsulas, sendo a liberação expressa em porcentagem.

4.2.11.2.2 Desenvolvimento do aparato de “difusão”

Baseado em dois experimentos, cujo objetivo era medir a liberação do recheio de micropartículas (TANAKA et al., 1984; FAISANT et al., 2002), foi desenvolvido um aparato para medir a liberação do recheio protéico. Este aparato de difusão permitiu

que as microcápsulas fossem mantidas suspensas em solução, porém com proteção de uma tela, permitindo a circulação de água sem que ocorressem danos na sua estrutura.

4.2.11.2.3 Protocolo experimental

As curvas de liberação foi acompanhada pela determinação do teor de proteína presente no sistema aquoso durante o período de 4 horas, com coletas de 10mL, aos 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos, com a imediata reposição do solvente e a determinação de proteína nas amostras efetuadas pelo método modificado de Bradford.

Para os experimentos com as microcápsulas úmidas contendo proteína ou proteína e gordura, foram utilizados 4.00 g de microcápsulas em 200 mL de água bidestilada. Para os experimentos com as cápsulas desidratadas, foram utilizadas 400 mg de cápsulas secas em 200 mL de água. Os ensaios de liberação foram feitos em triplicata sempre com preparações independentes das microcápsulas.

4.2.12 Morfologia e microestrutura das microcápsulas.

4.2.12.1 Microscopia ótica

A morfologia geral das microcápsulas foram observadas através de microscópio ótico NIKON (Eclipse E800 – Japan), utilizando-se objetivas de 10x e 20x . A captação de imagens foi realizada pelo software Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics, USA).

4.2.12.2 Microscopia de Varredura Laser Confocal (CLSM)

A utilização da microscopia confocal teve como objetivo identificar as estruturas das microcápsulas, bem como a localização física do polímero, da

proteína e da gordura na estrutura da microcápsula através da ligação de compostos fluorescentes específicos. Para esse experimento, o sistema alginato foi utilizado.

A morfologia e microestrutura das microcápsulas úmidas foram observadas em microscópio de Varredura Laser Confocal Olympus LSM – Fluoview versão 3-2 (Olympus, Tóquio, Japão). As condições de trabalho, para coleta de imagens estão descritas no anexo 1.

4.2.12.2.1 Preparo das amostras para a microscopia confocal

4.2.12.2.1.1 Indicador fluorescente de óleo - Nile Red - dimetil sulfóxido

O corante “nile red” (1mg/mL de dimetil sulfóxido) foi acrescentado à gordura vegetal hidrogenada já fundida, segundo metodologia proposta por LAMPRECHT et al. (2000), alterando-se porém a concentração do corante usada para 1mg de corante para 30mg de óleo (gordura fundida).

4.2.12.2.1.2 Indicador fluorescente da caseína e polissacarídeos – FITC (isotiocianato de fluoresceína)

A ligação do corante FITC a proteína ou ao polissacarídeo foi feita de acordo com o protocolo descrito por SCHREIBER et al. (1983) com algumas modificações. Foram adicionados 100mL da solução do corante (1mg/mL) para cada 2,5g de biopolímero ou proteína. Após a adição, as soluções de alginato ou caseína contendo o corante FITC foram agitadas com agitação magnética lenta sob aquecimento de 40°C por uma hora antes da utilização.

4.2.12.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras desidratadas (microcápsulas liofilizadas) foram fixadas em fitas metálicas de cobre adesiva dupla face, presas em “stubs” de alumínio de 1cm de diâmetro por 1cm de altura e recobertas por uma fina camada de ouro em um

evaporador (Baltec SCD50) 40mA/150s. Após o recobrimento as amostras foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol mod. JMS -T300, em 5 e 10kV.

4.2.12.4 Distribuição do tamanho de partículas

O tamanho e a distribuição das microcápsulas foram determinados através de um Analisador *Laser scattering* LA-900 (Horiba Instruments, Inc). Foi utilizada uma quantidade de amostra suficiente para atingir níveis de refração adequados à leitura na câmara de amostragem.

4.2.13 Digestibilidade *in vitro*

Para avaliar se a proteína encapsulada seria acessível e digerível foi utilizado o método de digestibilidade *in vitro*. O ensaio da digestibilidade foi realizado por dois métodos: uma adaptação de AKESON & STAHMANN (1964) e pela medida da queda de pH (LAZO, 1998).

As amostras utilizadas para esse experimento foram microcápsulas de alginato (AL), carragena (CA), goma gelana (GE) e pectina (PE), contendo como recheio caseína e gordura vegetal hidrogenada.

4.2.13.1 Método adaptado de AKESON & STAHMANN (1964)

Amostras (microcápsulas) contendo cerca de 125mg de proteína encapsulada foram digeridas pela adição de 5mL de extrato larval, com incubação a 37°C com agitação contínua em banho Maria (Dubnoff), por um período de 8 e 24 horas. A hidrólise foi interrompida pela adição de 5 mL de TCA 30% e o volume foi completado para 100 mL com TCA 5%. Após a precipitação, filtrou-se o material em

papel Watman n° 42, e na fração solubilizada determinou-se a quantidade de proteína total, pelo método de Bradford, em espectrofotômetro a 595nm. Uma solução de caseína foi empregada como padrão de referência.

As amostras foram também digeridas com uma solução de tripsina 1,5 (mg/mL) em substituição ao extrato larval, incubadas por 8 horas, seguindo as mesmas condições de processo citadas.

O branco da amostra utilizado foi uma solução de microcápsulas sem adição de enzima e o branco da enzima foi de uma solução sem microcápsulas. Segue-se todo o procedimento da amostra. As análises foram feitas em triplicatas

A digestibilidade foi calculada pela fórmula:

$$\%D = \frac{P_{amostra} - P_{branco} - P_{enzima}}{P_{total} - P_{branco}} \cdot 100$$

Equação 10

onde:

$P_{amostra}$ = quantidade de proteína na amostra digerida (mg/mL)

P_{branco} = quantidade de proteína na amostra não digerida (mg/mL)

P_{enzima} = quantidade de proteína na solução de enzima (mg/mL)

P_{total} = quantidade de proteína total na amostra (mg/mL)

4.2.13.1.1 Preparo do extrato enzimático

O extrato enzimático foi obtido a partir de dois lotes de larvas de tilápia com idade aproximada de 7 dias após eclosão, fornecidas pelo Centro de Aqüicultura da Unesp – campus Jaboticabal.

A obtenção do extrato enzimático larval foi conduzida a 13°C pela maceração das larvas inteiras em tampão Tris-HCl 50 mM CaCl₂, pH 8, na proporção de 1g/10

mL. Em seguida, os extratos foram centrifugados em centrífuga Sorvall RC5C (14.000g/30min/4°C), e o sobrenadante (solução enzimática) foi mantido em freezer doméstico (-18°C), e em nitrogênio líquido (-195°C), até o momento das análises.

4.2.13.2 Digestibilidade medida pela queda do pH (Lazo et al., 1998)

O método usado como uma medida de digestibilidade da proteína, consiste na determinação de queda de pH ($-\Delta\text{pH}$), durante do substrato (microcápsulas) às enzimas.

Foram preparadas soluções a partir das microcápsulas com concentração de proteína de 312,5 mg em 100mL de água destilada. O pH final foi corrigido para 8,0 com adição de NaOH ou HCl (0,001-0,1N). A solução foi mantida em agitação num Becker encamisado que manteve a temperatura da solução em 37°C. Foi adicionado 5 mL da solução de tripsina (1,5mg/mL) e o monitoramento do pH e da temperatura foi feito durante 10 minutos. As análises foram feitas em triplicatas. O valor de pH após 10 minutos de reação foi medido e comparado ao valor obtido para caseína livre em solução, como segue:

$$\%D = \frac{\Delta\text{pH}_{\text{amostra}}}{\Delta\text{pH}_{\text{caseína}}} \cdot 100$$

Equação 11

onde:

$\Delta\text{pH}_{\text{amostra}}$ = variação de pH da amostra

$\Delta\text{pH}_{\text{caseína}}$ = variação de pH da caseína

4.2.13.2.1 Preparo da solução de enzima

Uma solução de tripsina (marca Sigma) foi preparada em tampão Tris-HCl 50 mM CaCl_2 , pH 8, na concentração de 1,5mg/mL.

4.2.13.3 Determinação da atividade das proteases

A atividade proteolítica dos extratos larval e da solução de tripsina foi medida usando a caseína (Merck 2242) 1,2 %, pH 6 como substrato seguindo o método de GARCIA-ORTEGA et al. (1998).

As misturas foram incubadas por 10 minutos a 37°C e a reação foi interrompida pela adição de 5 mL de TCA 5%. A absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro a 280 nm.

Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que libera em 10 minutos, 1 mg de tirosina. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

4.2.14 Análise estatística

Diferenças significativas entre médias para os valores obtidos das curvas de liberação protéica e nas microcápsulas foram avaliadas utilizando teste de ANOVA e TUKEY, com auxílio do software Estatística for Windows 5.0 (Statsoft, USA), com 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diagrama de fases

Mesmo em um nível primário, o entendimento qualitativo dos sistemas gelificantes polieletrólíticos é difícil. Ele requer um conhecimento detalhado das propriedades individuais das cadeias, sua conformação e topologia de redes, os efeitos dos eletrólitos sobre as forças inter e intra-cadeias e também um entendimento básico da água e como suas propriedades são modificadas pela presença de eletrólitos (GRANSDALEN & SMIDSROD, 1987).

A relação estrutura-funcionalidade de biopolímeros requer definir os estados físico-químicos apresentados pelo mesmo, que podem afetar as propriedades de transporte tais como viscosidade, densidade e difusividade bem como a reatividade do sistema (MADEKA & KOKINI, 1996). Os estados físicos do componente/sistema podem ser representados por um diagrama de fase ou de estado, onde o comportamento é observado em função da temperatura, concentração, tempo, pressão, etc (SHADE et al., 1989). No caso da gelificação iônica, o diagrama de fase envolvendo a variação de concentração dos agentes poliméricos e do íon ligante tem como objetivo definir a região onde ocorre a formação física do gel polissacarídeo-íon, identificando também a região onde o sistema permanece em solução e a região onde ocorre a sinerése.

A construção dos diagramas foi essencial para a definição das concentrações do agente polimérico e do íon ligante, na região de formação de gel propícias para formação das cápsulas e microcápsulas. As Figuras de 7 a 9, representam os diagramas de fase obtidos.

Os sistemas contendo alginato ou pectina (Fig.7a e Fig. 7d, respectivamente) apresentaram regiões bem definidas de sol, gel e sinerese. A gelificação só foi possível a partir da concentração de 0,5% de polissacarídeo com 0,25% de cloreto de cálcio para a pectina e 0,5% de cloreto de cálcio para alginato.

Comparativamente aos outros polímeros estudados, o sistema contendo a pectina mostrou-se mais sensível a pequenas variações na concentração iônica, refletindo em menor área no diagrama de fase (Fig. 7d) da região gel. Efeito semelhante à variação iônica foi observado anteriormente por MAY (1997). Segundo KOHN, (1975), modelos para a gelificação têm apontado fortemente para influência do cálcio e em menor extensão para o pH, durante a gelificação.

Conforme, pode ser visto na Figura 7b, a carragena apresentou gelificação instantânea para todas as concentrações da goma e do cloreto de cálcio estudados. Como esperado, um aumento da concentração do polissacarídeo apresentou gelificação com quantidades decrescentes de íons, observando-se em concentrações superiores a 1,2%, que a formação de gel ocorreu sem a necessidade da solução iônica.

Comportamento semelhante foi observado para a goma gelana (Fig 7c), ou seja, a partir de concentrações superiores a 0,75% ocorreu formação de gel sem a adição de íons a solução, onde o aquecimento e posterior resfriamento da solução polimérica favoreceu a formação de dupla hélice entre os finais de moléculas próximas (GUNNING & MORRIS, 1990). Para esse sistema contendo goma gelana não foi observada a ocorrência de sinerese.

De modo geral, quando houve a formação do gel com presença de pequenos grumos com coloração esbranquiçada, diferente da cor do gel, também ocorreu a sinerese. À medida que se elevou a quantidade de cálcio na solução, uma incidência maior de aglomerados foi observada.

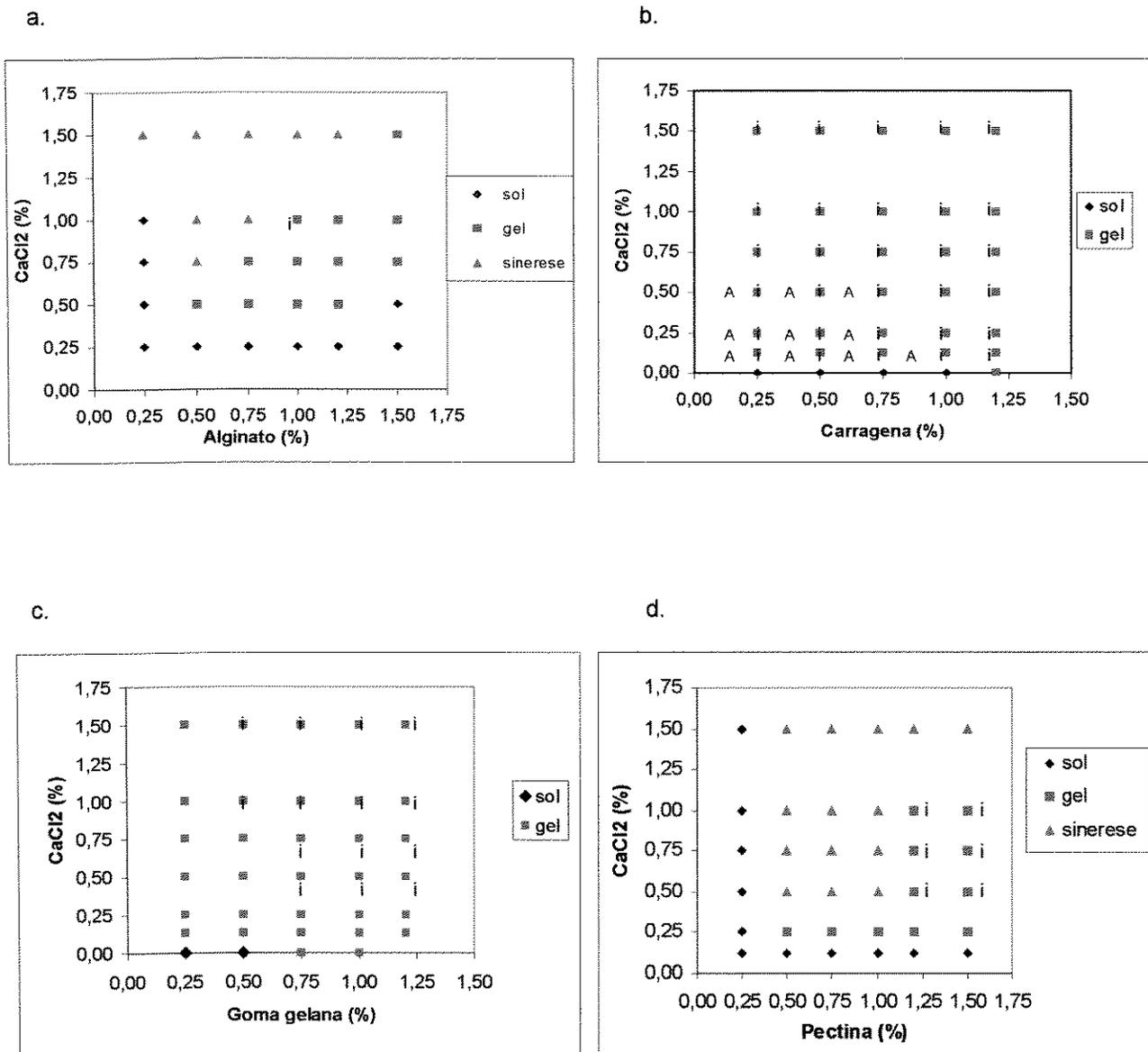


Figura 7. Diagrama de fases utilizados. a. Alginato; b. carragena; c. goma gelana; d. pectina. A letra "i" indica que houve gelificação instantânea e a letra "A" que houve liberação de água da matriz polimérica após 24 horas.

5.1.1 Misturas binárias

As misturas binárias mostraram comportamento semelhante aos polímeros de sua composição, sendo marcante a influência de um polímero em relação ao outro. Esta influência provocou um aumento dos pontos referentes à área de formação de gel e gelificação instantânea nas misturas GE-AL, PE-GE, CA-GE e CA-AL, e uma diminuição em PE-AL e PE-CA. Essas misturas binárias aparentemente sugerem a formação de diferentes redes de gel propostas por CAIRNS et al. (1987), onde a mistura de dois polissacarídeos pode não formar um tipo particular de mistura, o que pode ser determinado pela relação entre os componentes.

A mistura GE-AL (Fig. 8a) apresentou um comportamento de fases semelhante ao diagrama do alginato (Fig. 7a), sugerindo deste modo, a maior influência do alginato neste sistema.

A mistura PE-AL apresentou semelhança ao diagrama da pectina (Fig. 7d), sendo a menor área obtida entre os sistemas binários estudados, conforme pode ser observado na Figura 8b. STEINNES (1975) apud MORRIS (1998), observou que os géis mistos de pectina-alginato apresentaram gelificação, em condições que individualmente não ocorria à formação de gel, incluindo a ausência de cálcio, baixo pH e presença de açúcares, sugerindo a ocorrência de ligação intermolecular do alginato e da pectina.

No sistema PE-GE (Fig. 8c), observou-se um diagrama de fase mais parecido com o diagrama apresentado pela pectina isoladamente (Fig. 7d), em relação ao observado para gelana (Fig. 7c).

Em PE-CA (Fig. 8d) foram observadas somente duas fases: sol e gel, com maior semelhança ao comportamento observado para carragena individualmente (Fig. 7b).

A mistura CA-GE (Fig. 8e) apresentou o mesmo comportamento que a carragena, originando um diagrama idêntico (Fig. 7b). A gelificação sem a adição de

cálcio também foi observada para esta mistura, a partir de 1,2% de concentração polimérica no sistema.

A mistura CA-AL (Fig. 8f) originou um diagrama de fases semelhante ao diagrama da carragena (Fig. 7b).

5.1.2 Misturas ternárias

As misturas ternárias também mostraram um comportamento semelhante aos polímeros de sua composição, entretanto, com predominância de um dos polímeros. Não foram observados aumento das áreas referentes a formação de gel e gelificação instantânea em relação às misturas binárias e aos diagramas dos polímeros usados isoladamente. Os pressupostos citados para as misturas binárias, que diferentes redes de gel, podem ter sido formadas, também se aplicam às misturas ternárias e quaternárias, de acordo com CAIRNS et al. (1987).

De acordo com as Figuras 9a e 9c, as misturas CA-PE-GE e CA-GE-AL, apresentaram áreas de formação de gel muito semelhantes a carragena (Fig.7b) e a goma gelana, não apresentando sinerese nas concentrações estudadas. A gelificação sem adição de cálcio também foi observada na concentração de 1,2% para essas misturas.

As misturas CA-PE-AL e PE-GE-AL, conforme ilustram as Figuras 9b e 9d apresentaram as três regiões: sol, gel e sinerese, sendo que a mistura ternária CA-PE-AL mostrou maior área de formação de gel instantaneamente quando comparadas aos diagramas das outras misturas ternárias.

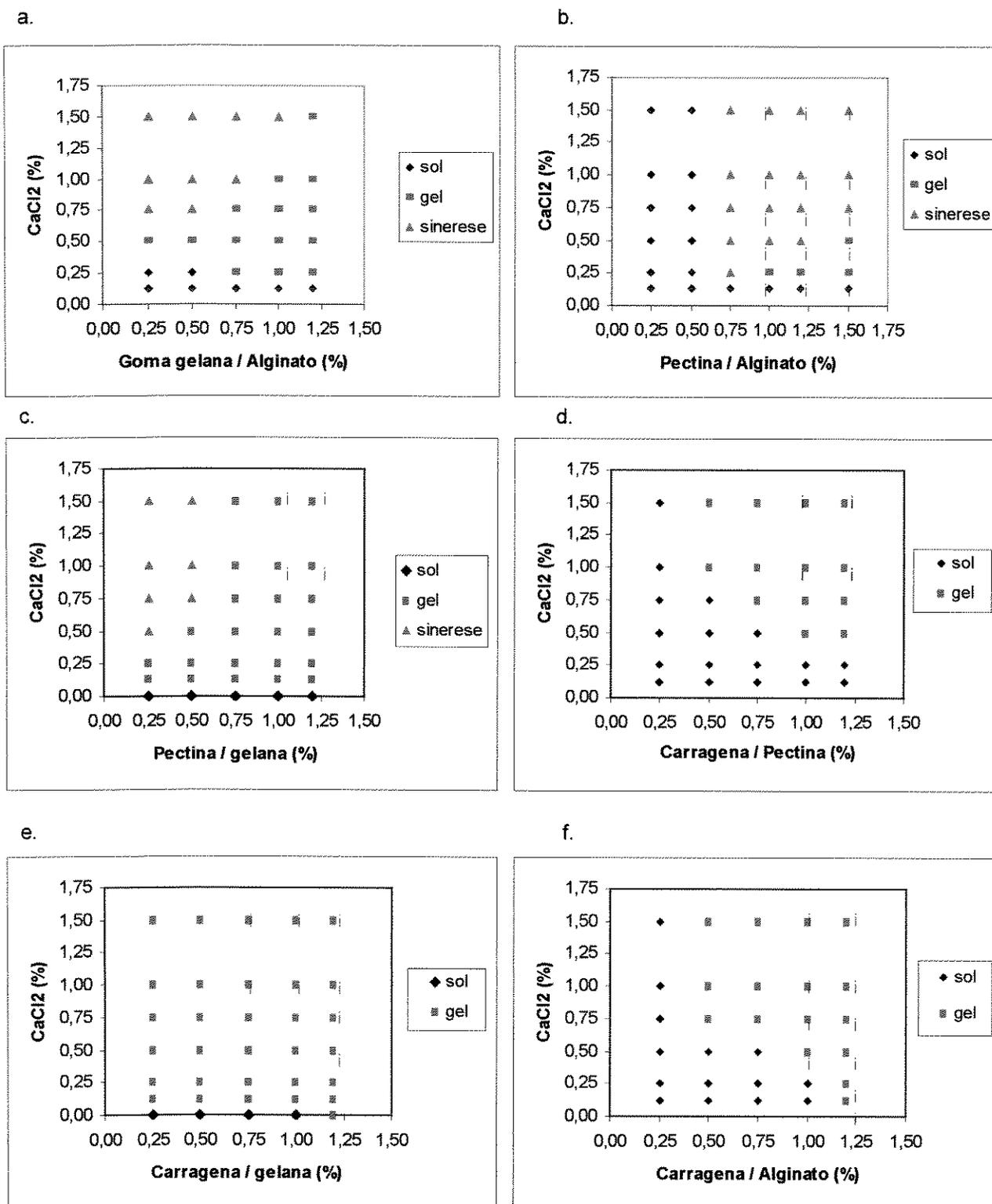


Figura 8. Diagrama de fase das misturas binárias. a. GE-AL, b. PE-AL; c. PE-GE, d. CA-PE, e. CA-GE e f. CA-AL.

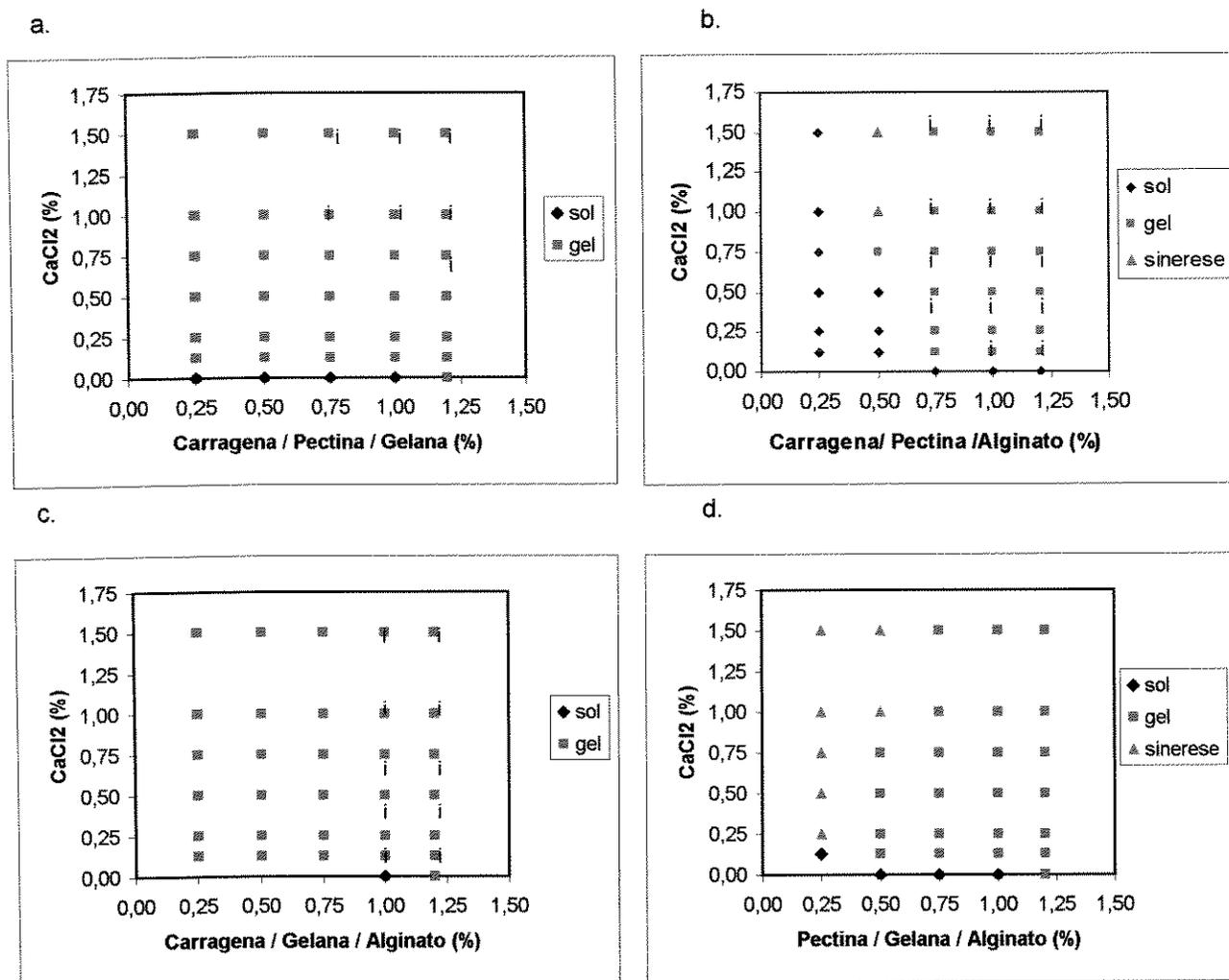


Figura 9. Diagrama de fases para misturas ternárias dos polissacarídeos utilizados. a. CA-PE-GE; b. CA-PE-AL; c. CA-GE-AL; d. PE-GE-AL.

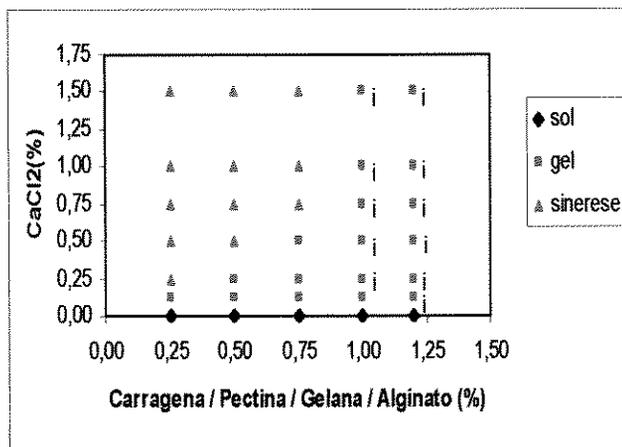


Figura 10. Diagrama de fase da mistura quaternária dos polissacarídeos utilizados.

5.1.3 Mistura quaternária

A mistura quaternária CA-PE-GE-AL (Fig. 10) apresentou as três regiões: sol, gel e sinerese, não sendo observados aumento das áreas referentes à formação de gel e gelificação instantânea em relação às misturas ternárias, binárias ou aos polímeros utilizados isoladamente.

5.2 Viscosidade intrínseca

A viscosidade intrínseca apresenta um grande valor prático na determinação da massa molecular de polímeros grandes (GRULKE, 1994). Viscosidade de soluções contendo algumas gomas foram apresentadas por RAO & YANSEEN (1986), enquanto que a viscosidade intrínseca de várias soluções protéicas foi apresentada por RHA e PRADIPASENA (1986).

As concentrações das soluções usadas para obtenção curvas de viscosidade reduzida e inerente foram selecionadas em função dos tempos de escoamento (t) que atendessem as recomendações de RODRIGUES (1982) para valores de $\eta_r < 2$ (viscosidade relativa, $\eta_r = \eta/\eta_s$ e $\eta = K \cdot \rho \cdot t$).

As massas moleculares dos biopolímeros foram calculadas usando-se as seguintes equações:

Alginato	$[\eta] = 2,0 \times 10^{-5} M_w^{1,0}$	SMIDSROD (1970)
Goma Gelana	$[\eta] = 7,48 \times 10^{-3} M_w^{0,91}$	DREVETON et al. (1996)
Pectina	$[\eta] = 0,0955 M_w^{0,73}$	ANGER & DONGOWSKI (1988)

As tabelas com os tempos de escoamento e as densidades das soluções determinadas para cada biopolímero, tabelas com os valores calculados para

viscosidades reduzida e inerente e concentrações exatas das soluções, gráficos com as curvas das viscosidades reduzida e inerente e cálculo da viscosidade intrínseca e do peso molecular específico para os biopolímeros utilizados se encontram no Anexo 1.

Tabela 5. Viscosidades intrínsecas e pesos moleculares para alginato, goma gelana e pectina.

Polissacarídeo	$[\eta]$ (100ml/g)	Massas Molecular (kDa)	Fórmulas de cálculo
Alginato	$5,63 \pm 0,42$	$281,37 \pm 20,76$	$[\eta]=2,0 \times 10^{-5} M_w^{1,0}$
Goma Gelana	$9,68 \pm 3,03$	$263,54 \pm 90,21$	$[\eta] = 7,48 \times 10^{-3} M_w^{0,91}$
Pectina (BTEA)	$2,10 \pm 0,07$	$69,02 \pm 3,30$	$[\eta] = 0,0955 M_w^{0,73}$

O valor de viscosidade intrínseca encontrado, conforme Tabela 5, para pectina está na faixa anteriormente observada de 5×10^4 a $1,5 \times 10^5$, onde a flexibilidade da cadeia parece depender da composição química, exibindo um caráter de macromolécula rígida estendida (SMIDSROD & HAUG, 1971). Valores encontrados para o alginato e goma gelana também estão nas faixas obtidas nas referências utilizadas para determinação da massa molecular.

Nas soluções de goma gelana foi usado o íon TMA⁺, devido ao seu grande tamanho, podendo interagir fracamente com polieletrólitos da cadeia, apresentando a habilidade de induzir uma ordenação nas cadeias e também permitir a medida da viscosidade intrínseca.

A viscosidade intrínseca da carragena não foi determinada. Embora não tenha sido quantificada por problemas de formação de aglomerados e dúvidas quanto a pureza do material utilizado, foi observado por SMIDSROD & GRANSDALEN (1987) que k-carragena e alginato de mesma massa molecular apresentaram menores viscosidades intrínsecas e raio de giração que as da goma gelana.

5.3 Formação das cápsulas

A formação das cápsulas pela bomba peristáltica foi uma primeira tentativa de se obter microcápsulas com tamanho adequado à alimentação das larvas de peixes. As cápsulas apresentaram um tamanho (1 a 2 mm) que permitiu uma observação visual do aspecto e comportamento da matriz formada.

As cápsulas foram mais bem formadas e esféricas, para todos os tratamentos à medida que se aumentou a concentração da solução polimérica, devido provavelmente a maiores quantidades de ligações inter cruzadas que ocorreram na cadeia molecular. A retenção da cor, decorrente da adição de anilina, também foi maior com o aumento da concentração, sugerindo também que houve uma diminuição da permeabilidade, todavia, estudos mais específicos de difusão são necessários para confirmação deste fato.

A fabricação das cápsulas de carragena apresentou restrições de processamento quando a concentração do polímero em solução foi superior a 1%, devido a um aumento da viscosidade da solução. Segundo NUSSINOVITCH (1997), a viscosidade está intimamente ligada à concentração da goma na solução, aumentando exponencialmente com o aumento da concentração, sendo este comportamento típico da carragena e outros polímeros de carga linear, como uma consequência de interações entre as cadeias de polímeros.

5.4 Caracterização das cápsulas

5.4.1 Solubilidade

Todos os tratamentos utilizados formaram cápsulas bastante insolúveis em água (aproximadamente < 10%), mostrando-se potencialmente interessantes para resolver problemas usuais como a lixiviação de nutrientes, que por sua vez afetam a qualidade da água nos tanques de cultivo, ou ainda para outros fins práticos.

5.4.2 Flutuabilidade

Devido ao fato das larvas de diversas espécies de peixes alimentarem-se em diferentes alturas na coluna d'água, a ração deve apresentar características específicas de flutuabilidade e tempo de sedimentação. Deste modo, a flutuabilidade é um importante parâmetro a ser avaliado no desenvolvimento de dietas para peixes e crustáceos.

O uso dessa técnica permitiu a observação de diferenças de flutuabilidade apresentadas pelas cápsulas, quando se alterou a concentração de polímero ou íon em sua fabricação, variando de 21,71 a 6,51s. Com o aumento da concentração do biopolímero ou da concentração do íon em solução, o tempo de flutuabilidade da cápsula foi menor, com maior efeito quando se elevou a quantidade de polímero presente. Este fato parece estar indicando um aumento de densidade da cápsula, devido a maior quantidade formada de matriz, através dos mecanismos de gelificação apresentados na revisão, formando sucessivas ligações intermoleculares, que se refletem na variação da densidade da cápsula (GRANSDALEN & SMIDSROD, 1987; MARTINSEN, 1989).

5.4.3 Microscopia ótica

A microscopia ótica revelou que todas as cápsulas fabricadas apresentaram boa formação, sendo em sua maioria com forma esférica.

5.5 Produção de microcápsulas

O método de produção de microcápsulas, utilizando gotejamento com auxílio da bomba peristáltica, não proporcionou um tamanho adequado de partícula, que se prestasse à alimentação de larvas de peixes, da ordem de 150 μ m. O tamanho observado foi da ordem de 1500 μ m, portanto, muito maior que o tamanho desejado. O uso de um aspesor capilar com alta pressão (Fig.11) alcançou um bom tamanho

de partícula (média de $150\mu\text{m}$), com variação de partícula aspergida (em micrometros) em função do tamanho do capilar, altura de aspensão e pressão de ar empregada.

Após a realização dos ensaios para escolha da melhor pressão de ar, altura de pulverização, relação de matriz/recheio foram então, estabelecidos os seguintes padrões: $0,90\text{ kgf/cm}^2$, 18 cm e 1:1, respectivamente. Conforme ilustra a Figura 12, aplicando-se uma pressão de trabalho de $0,60\text{ kgf/cm}^2$, as microcápsulas formadas apresentaram perda parcial do formato esférico com prolongamento em uma das extremidades, tendo um aspecto de cauda (Fig. 12a). Também foram observados nesta pressão, microesferas de óleos resina que não sofreram encapsulação. Com a aplicação de uma pressão de $0,75\text{ kgf/cm}^2$, as cápsulas apresentaram menores irregularidades quanto ao formato esférico, uma distribuição de tamanho de partículas mais homogêneo e menor presença de material não encapsulado (Fig. 12b). Já com uma pressão de trabalho de $0,90\text{ kgf/cm}^2$, as cápsulas apresentavam em sua maioria formato esférico, distribuição de tamanho bastante homogênea e ausência de material não encapsulado (Fig. 12c). Quanto ao aspecto visual da quantidade e coloração do recheio, a pressão de trabalho igual a $0,90\text{ kgf/cm}^2$, produziu microcápsulas de coloração mais forte e com maior quantidade de microesferas de óleo resina de páprica retidas na matriz em relação às outras pressões.

Nos testes de pulverização, para a altura de 18cm (Figura 12.d), as microcápsulas apresentaram forma esférica em sua maioria e ausência de material não encapsulado. Na altura de 28 cm (Figura 12.e), as microcápsulas apresentaram forma esférica e oval com presença de material não encapsulado, e na altura de 38 cm (Figura 12.f), as microcápsulas apresentaram perda parcial do formato esférico com prolongamento de uma extremidade formando uma cauda, em sua maioria, distribuição de tamanho heterogênea e presença de material não encapsulado. Na observação dos respectivos recheios foi observada uma coloração mais forte e escura para a altura de pulverização de 18cm em relação às demais alturas.

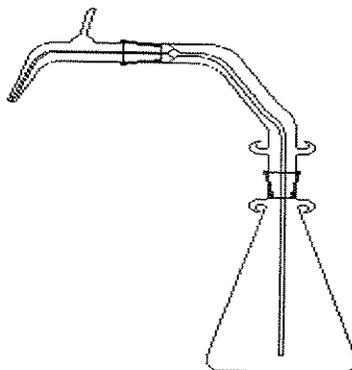


Figura 11. Aspersor de vidro conectado a erlenmeyer.

Na Figura 13 (a, b, e c) pôde-se verificar que ocorreu uma variação da coloração das microcápsulas quando se alterou a relação de quantidade matriz/recheio. As microcápsulas adquiriram coloração mais forte à medida que se aumentou a quantidade de recheio até a proporção de 1:1 (matriz/recheio). À medida que a concentração de recheio ficou maior que a quantidade de material de parede (0,75:1 - matriz/recheio) observou-se uma grande quantidade de material não encapsulado. A partir dessa observação foi definida a relação de 1:1 (matriz/recheio) para os testes posteriores.

5.6 Morfologia e distribuição do tamanho

Através da microscopia ótica foi possível observar a morfologia externa e estrutura interna das microcápsulas estudadas, o tamanho das esferas de óleo-resina de páprica encapsuladas e a distribuição desse recheio na matriz polimérica. O tamanho das microcápsulas também pôde ser observado, e as distribuições resultantes se encontram no Anexo 2.

Em geral, as microcápsulas apresentaram forma esférica em sua maioria e foram multinucleadas, com distribuição do recheio por toda matriz polimérica.

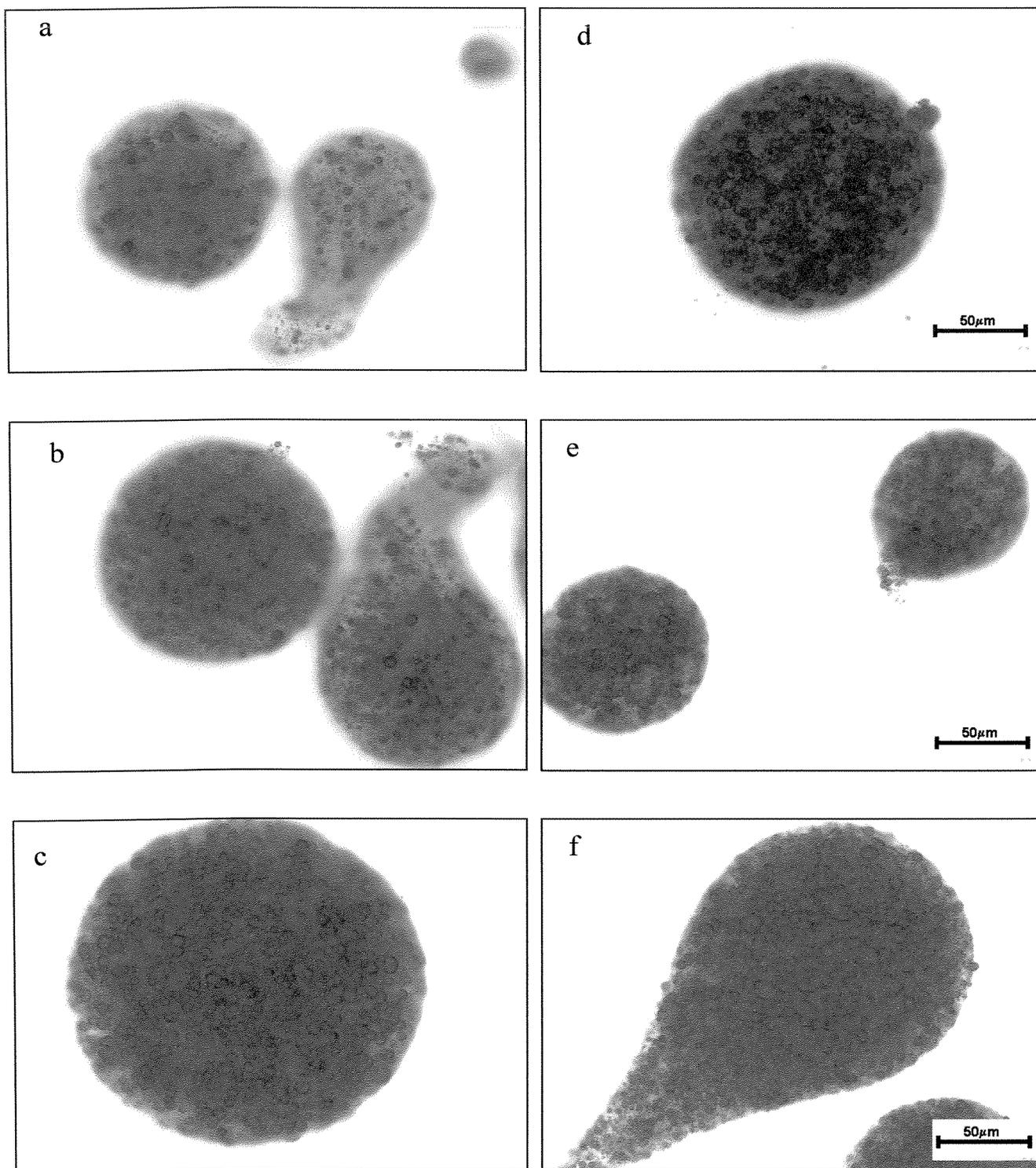


Figura 12. Microcápsulas de alginato contendo como recheio óleoresina de páprica, aspedidas por diferentes pressões e alturas - **a.** pressão igual a 0,60 kgf/cm²; **b.** pressão igual a 0,75 kgf/cm²; **c.** pressão igual a 0,90 kgf/cm²; **d.** altura de 18cm; **e.** altura de 28cm; **f.** altura de 38 cm. Objetiva de 20 vezes.

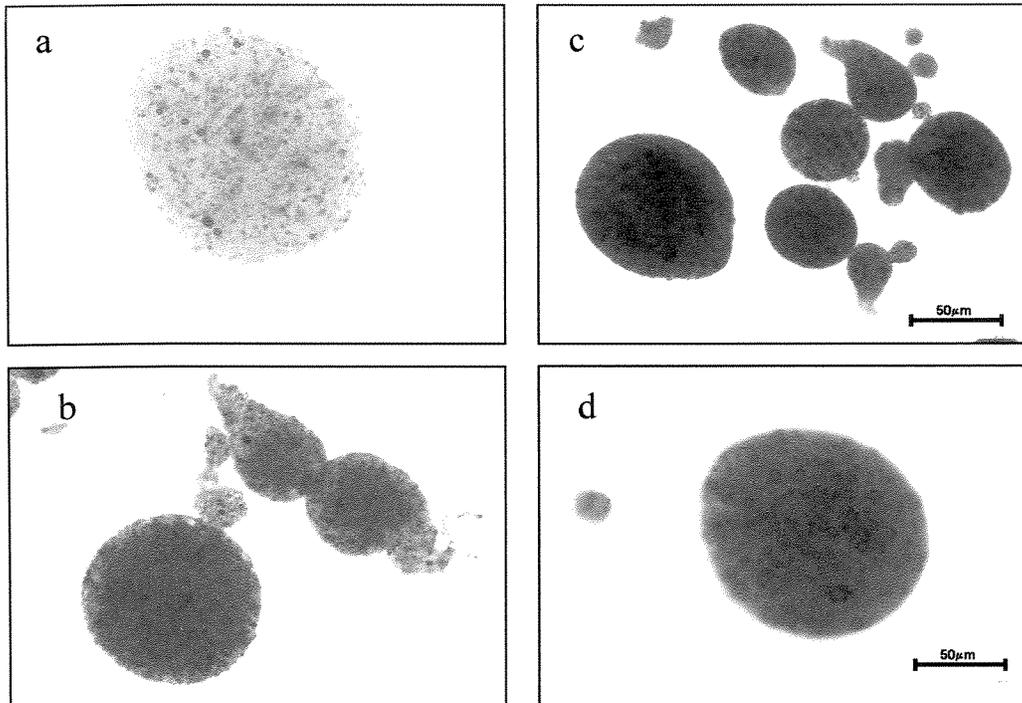


Figura 13. Microcápsulas de alginato com variações na quantidade de material a ser encapsulado – a. relação matriz/recheio de 3:1; b. relação 1,5:1; c. relação 1:1; d. relação 0,75:1. Objetiva de 20 vezes.

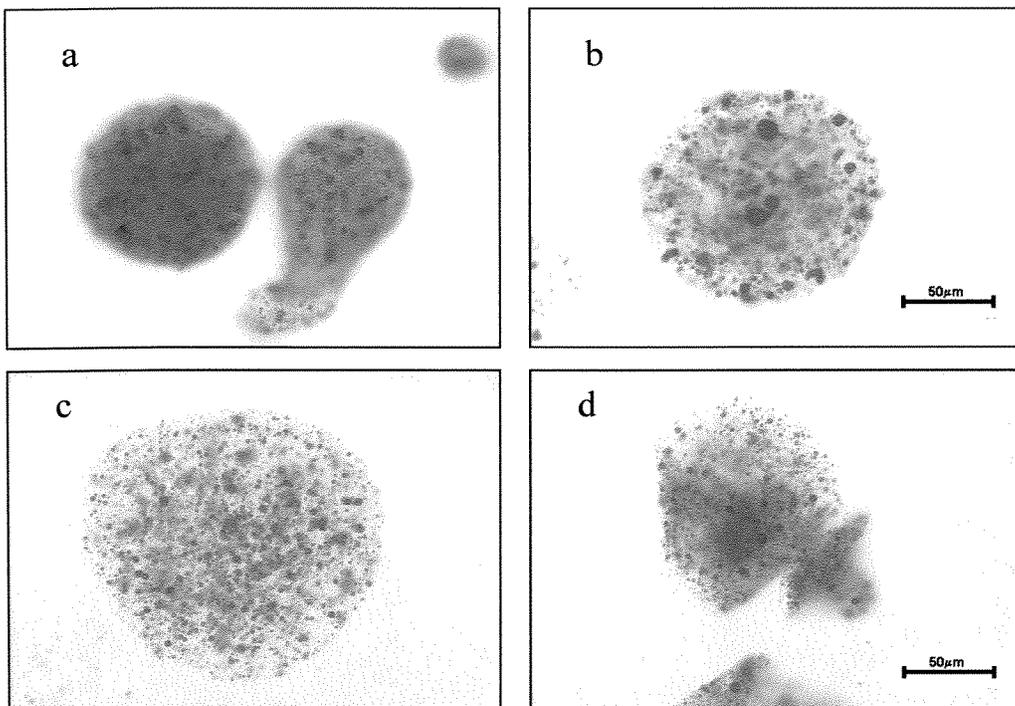


Figura 14. Microcápsulas obtidas de diferentes matrizes.- a. AL; b. CA; c. GE; d. PE. Objetiva de 20 vezes.

De acordo com a Figura 14, as microcápsulas cuja matriz era constituída de alginato (a) apresentaram forma de gota, coloração intensa e distribuição homogênea de microesferas de óleoresina pela matriz.

As de carragena (b) apresentaram-se esféricas e tamanho heterogêneo de microesferas de óleoresina distribuídos na matriz. As microcápsulas obtidas com goma gelana (c) apresentaram forma esférica, matriz incolor e foram semelhantes as microcápsulas de carragena quanto ao tamanho e distribuição das microesferas de óleoresina. As microcápsulas de pectina apresentaram formas amorfas, com distribuição homogênea do recheio na matriz.

A análise de tamanho das microcápsulas (Anexo 2) mostrou semelhança entre os materiais estudados, observando-se uma distribuição de tamanho na faixa de 12 a 775 μm , variando de 43 a 90% para a faixa de 100 a 300 μm , para os sistemas estudados. A interpretação dos dados em forma de histograma para análise de distribuição de tamanhos de microcápsulas também foi utilizada por YÚFERA et al. (1996) e VILLAMAR e LANGDON (1993).

5.6.1 Misturas binárias

Conforme ilustra a Figura 15, a mistura CA-AL (a) produziu grande quantidade de microcápsulas esféricas de coloração semelhante ao alginato, entretanto, com uma matriz mais clara, com distribuição homogênea das microesferas de óleo. A mistura CA-GE (b) produziu microcápsulas esféricas e alongadas semelhantes as microcápsulas de carragena e também da goma gelana, com conteúdo e distribuição heterogêneo de microesferas de óleo. A mistura GE/AL (c) formou microcápsulas esféricas, com uma coloração da matriz semelhante a gelana. A mistura PE/AL (d), exibiu formas esféricas, com coloração da matriz semelhante a da pectina. A mistura PE/CA (e), formou microcápsulas esféricas muito semelhantes as microcápsulas de carragena, com distribuição de tamanho heterogênea das microesferas de óleo

resina. A mistura PE/GE (f), produziu microcápsulas com forma esférica em sua maioria.

A intensa coloração laranja encontrada nas microcápsulas de GE-AL e CA-PE-AL pode ser atribuída ao alginato, uma vez que, este polímero é encontrado na composição das duas misturas e quando isolado exibe a cor mais forte.

5.6.2 Misturas ternárias

A mistura CA-GE-AL, conforme mostra a Figura 16a, produziu microcápsulas esféricas, semelhantes a gelana, na sua distribuição do recheio. CA-PE-AL (b) produziu microcápsulas com forma esférica, matriz de cor clara e distribuição de tamanho das microesferas do recheio homogênea. A mistura CA-PE-GE (c) produziu cápsulas esféricas e alongadas com esferas muito pequenas e homogêneas de óleo-resina em sua matriz, lembrando a microcápsula de gelana. PE-GE-AL (d) produziu microcápsulas esféricas, semelhantes as microcápsulas de pectina e alginato, sendo a matriz de coloração clara.

5.6.3 Mistura quaternária

A mistura quaternária CA-PE-GE-AL, conforme ilustra a Figura 17a, produziu cápsulas esféricas alongadas com matriz incolor e distribuição de tamanho das esferas de óleo-resina heterogênea.

As microcápsulas obtidas de misturas binárias, ternárias e quaternária parecem também apresentar a característica de predominância de um dos polímeros componentes da mistura, observado nos diagramas de fases.

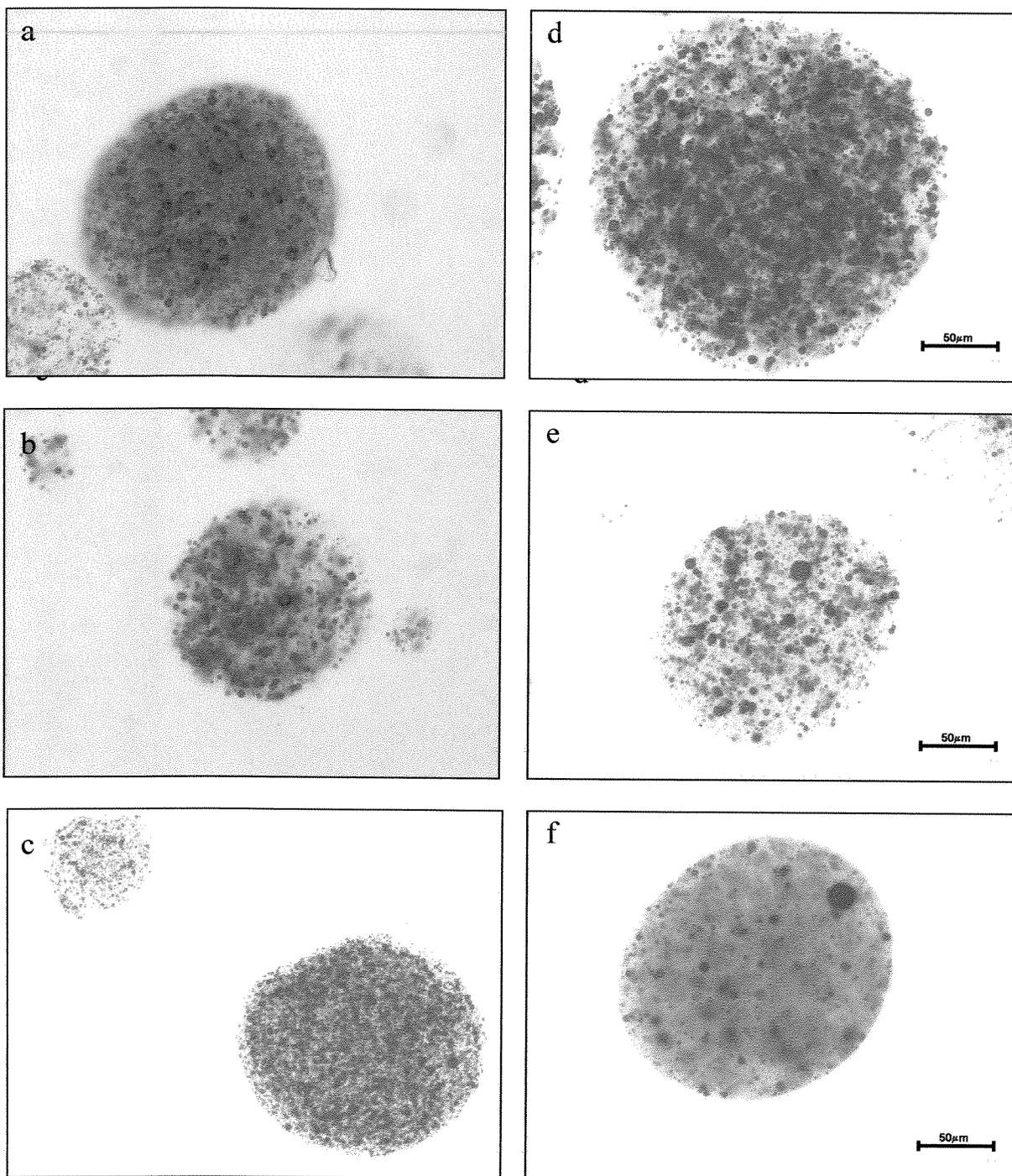


Figura 15. Morfologia de superfície obtida por microscopia ótica (20X) das microcápsulas fabricadas com matrizes de misturas binárias, contendo como recheio óleo-resina de páprica– a. CA/AL; b. CA/GE; c. GE/AL; d. PE/AL; e. PE/CA; f. PE/GE.

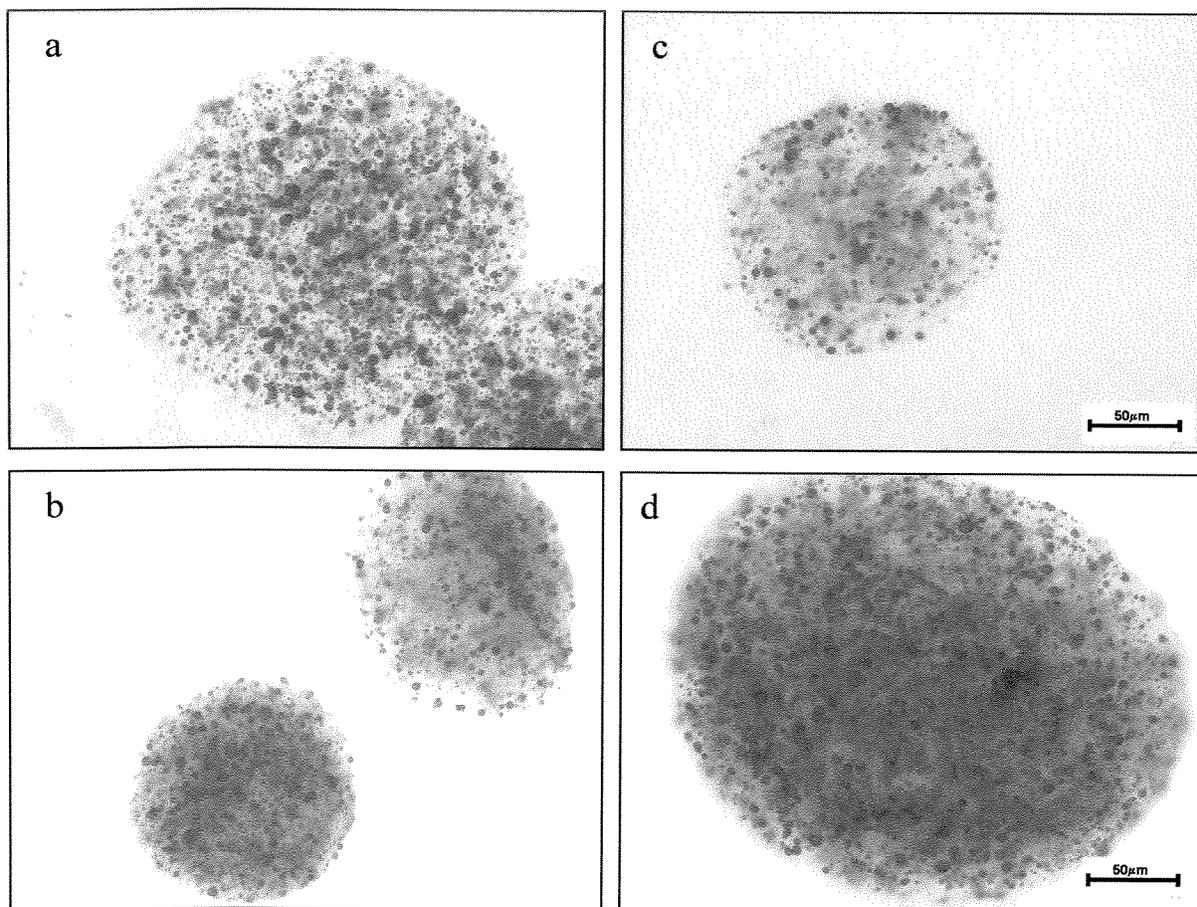


Figura 16. Morfologia de superfície obtida por microscopia ótica (20X) das microcápsulas fabricadas com matrizes de misturas ternárias contendo como recheio óleoresina de páprica – **a.** CA/GE/AL; **b.** CA/PE/AL; **c.** CA/PE/GE; **d.** PE/GE/AL..

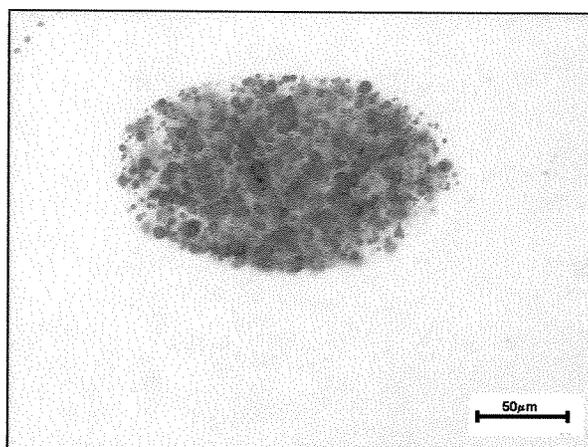


Figura 17. Morfologia de superfície obtida por microscopia ótica (20X) das microcápsulas fabricadas com matriz quaternária (PE-GE-AL-CA), contendo como recheio óleoresina de páprica

5.7 Microcápsulas com recheio de proteína e gordura

A troca de óleoresina de páprica por uma proteína modelo conhecida e posteriormente por um sistema composto da proteína e gordura vegetal permitiu avaliar o efeito na forma de liberação da proteína na matriz polimérica.

5.8 Secagem por liofilização

O processo de secagem por liofilização foi feito somente para as microcápsulas produzidas com os polissacarídeos utilizados individualmente, com formação de uma camada tipo esponja, característica deste tipo de secagem. Segundo VEELKEN (1984), a desidratação acentuada dos géis de polissacarídeos produzida por liofilização pode contribuir para a formação de matriz porosa semelhante a uma esponja e característica de materiais liofilizados.

A morfologia das microcápsulas secas por liofilização (Fig 18a a 21a) utilizando MEV, indicou a ocorrência de aglomeração generalizada das partículas levando a uma aparente perda da forma esférica e de tamanhos variados. No entanto a observação em um aumento maior (Fig 18b,c a 21b,c) mostra que alguns fragmentos mantiveram o contorno esférico, com alguma porosidade, evidenciando também a presença de pequenas e bem definidas esferas incrustadas no material sólido que parecem ser as esferas de gordura. Diferente de materiais liofilizados típicos, onde a porosidade é acentuada, as paredes dos materiais obtidos, embora não se apresentem lisas, parecem apresentar continuidade, como uma estrutura sólida, morfologia também sugerida anteriormente (WONG et al. 2002).

5.9 Caracterização físico-química das microcápsulas

Os valores de pH dos sistemas gelificantes contendo a proteína ou proteína e gordura, antes da aspersão em solução de cálcio foram medidos e se encontraram próximos a 9,0, o pH de dissolução da proteína (Tabela 6). Exceções entre os sistemas estudados foram às soluções contendo pectina que apresentaram pHs mais baixos, variando entre 5,0 a 6,0. Os valores de pH indicam que os polissacarídeos se encontravam acima de seus valores de pKa's, e assim em condições de carga mais favoráveis a associação iônica. Como esperado, a introdução de gordura nas microcápsulas provocou uma redução no conteúdo de água presente nas mesmas, independente do tipo de polímero utilizado. Nos sistemas contendo somente a proteína o teor de umidade variou de 96 a 98%, enquanto a introdução da gordura diminuiu para 90 – 93% o teor de água nos sistemas.

As eficiências de encapsulação para os sistemas isentos de gordura contendo polissacarídeos e caseína (Tabela 6), apresentaram rendimentos de 83.7 a 90.8%, com menores eficiências obtidas para microcápsulas produzidas com pectina, com gelana e pela mistura gelana-alginato. Embora, a quantidade de proteína utilizada tenha sido menor que a dos sistemas isentos de gordura, a eficiência de encapsulação foi maior nos sistemas contendo gordura e proteína, para as cápsulas contendo alginato (94.9%) ou pectina (95.4%) e apresentando um decréscimo para os sistemas contendo gelana individualmente (78.8%) e para o sistema ternário (71.8%).

Diversos trabalhos mediram a eficiência de encapsulação em sistemas semelhantes. FATTAH (1998) utilizou gelana e alginato como suportes na encapsulação de sulfato de salbutamol, em relações 1:2 (recheio:gelana) e 1:1(recheio:alginato) obtendo rendimentos de 69.2 e 72.5% para a gelana e para o alginato. VILLAMAR e LANGDON (1993) utilizaram uma mistura de alginato e gelatina introduzindo uma mistura de lipídeos para aumentar a retenção de compostos de baixa massa molecular, e aqueles aquosolúveis, obtendo eficiência de retenção de 84.8 (tiamina); 53 (riboflavina) e 84.7% (glicose).

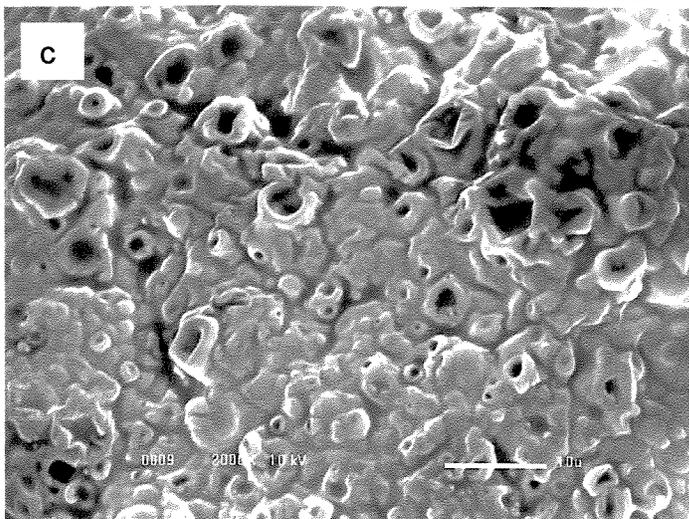
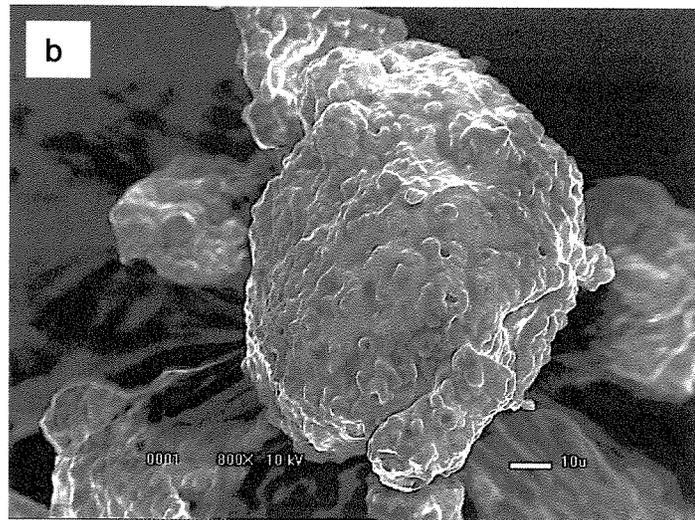
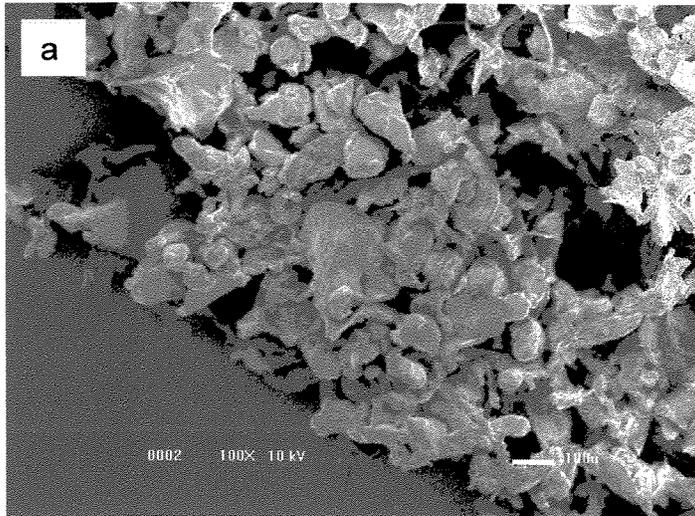


Figura 18. Morfologia e microestrutura das microcápsulas liofilizadas com matriz de AL e recheio de CAS+GVH, obtidas por microscopia eletrônica de varredura. **a.** aspecto do material formado (100X); **b.** aspecto da microcápsula (800X); **c.** visualização dos poros(2000X).

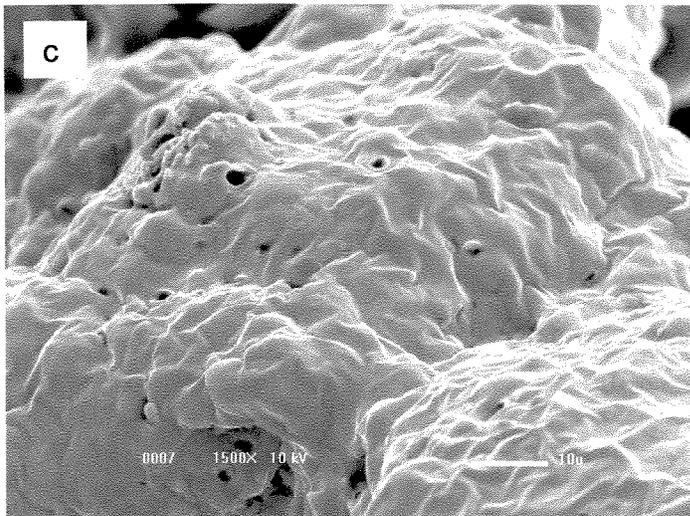
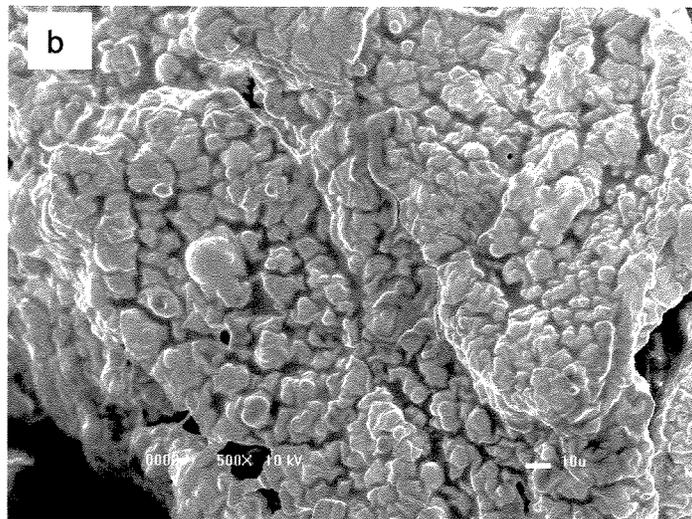
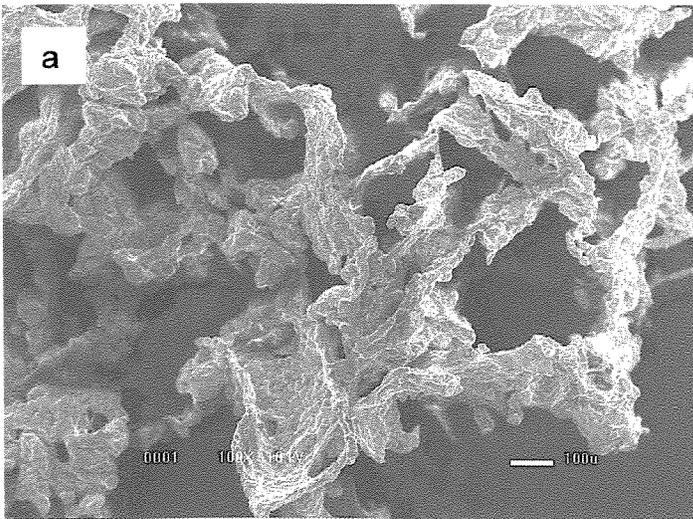


Figura 19. Morfologia e microestrutura das microcápsulas liofilizadas com matriz de CA e recheio de CAS+GVH, obtidas por microscopia eletrônica de varredura. **a.** aspecto do material formado (100X); **b.** parede da microcápsula (500X); **c.** visualização dos poros(1500X).

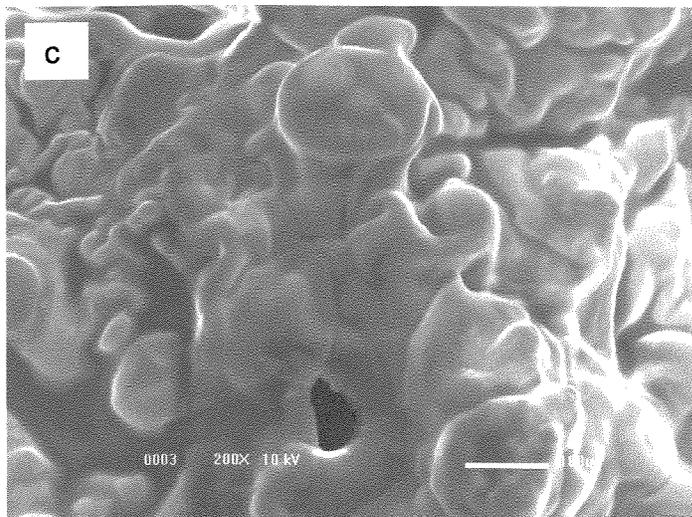
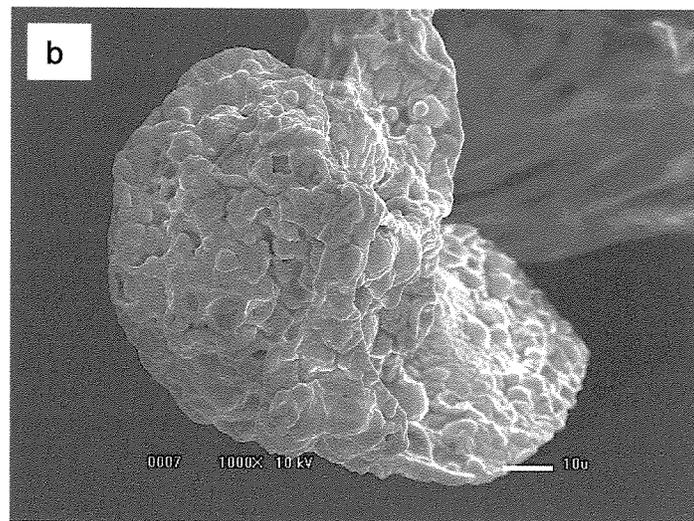
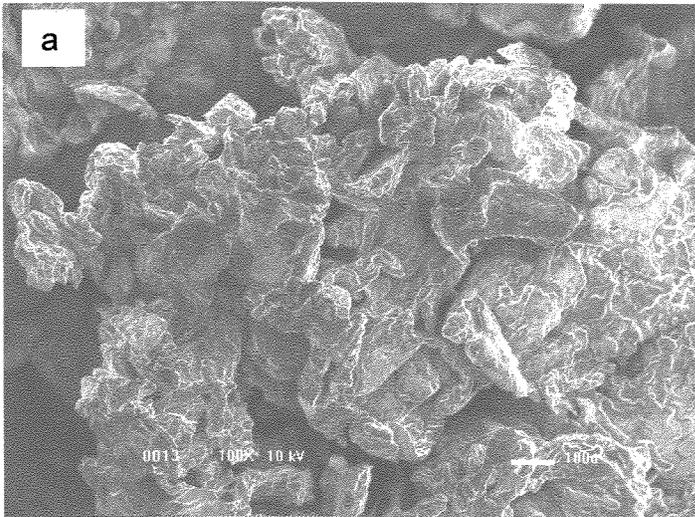


Figura 20. Morfologia e microestrutura das microcápsulas liofilizadas com matriz de GE e recheio de CAS+GVH, obtidas por microscopia eletrônica de varredura. **a.** aspecto do material formado (100X); **b.** aspecto da microcápsula (1000X); **c.** visualização da parede (2000X).

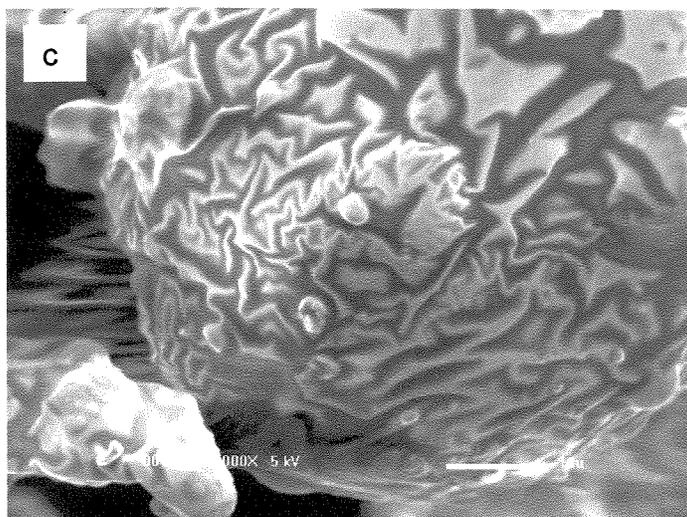
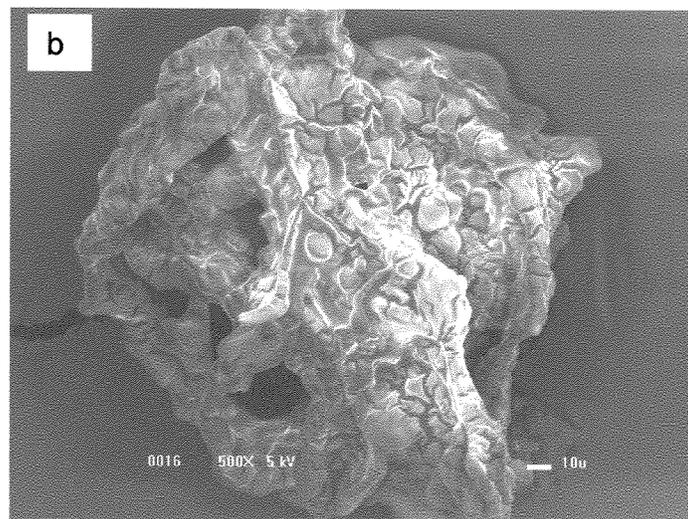
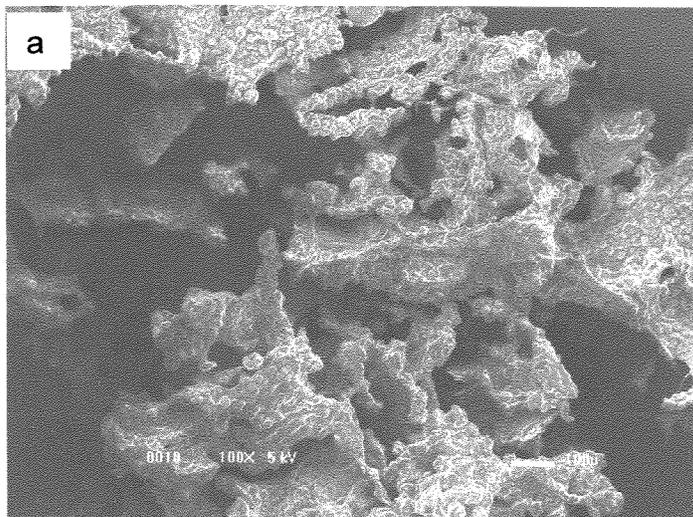


Figura 21. Morfologia e microestrutura das microcápsulas liofilizadas com matriz de PE e recheio de CAS+GVH, obtidas por microscopia eletrônica de varredura. **a.** aspecto do material formado (100X); **b.** aspecto da microcápsula (500X); **c.** visualização da parede (2000X).

Microcápsulas contendo soro albumina bovina (BSA), produzida em alginato de cálcio, posteriormente recoberto com quitosana, apresentaram valores altos (> 95%) para a eficiência de encapsulação (LIU et al., 1997). Valores inferiores (~22.5%) foram observados por COPPI et al. (2002) para a encapsulação de BSA, ou na encapsulação de insulina (65%) obtidos por GRAY e DOWSETT (1988). A comparação das eficiências de encapsulação é difícil, devido a diferenças entre os experimentos incluindo o tipo de polissacarídeo, o íon, suas concentrações, pH, natureza das interações, entre o agente encapsulante e o material encapsulado e a forma de produção, entre outros. Os sistemas poliméricos contendo somente proteína e os sistemas contendo polímero, proteína e gordura apresentaram valores de pH entre 5 e 9, medidas imediatamente antes da aspersão na solução iônica.

Tabela 6. Valores médios encontrados para quantidade de proteínas, umidade, E.E. e pH dos diferentes tratamentos utilizados.

Tratamentos	PH	E.E.* (%)	umidade (%)
1.AL + CAS	9,3	90,7	96
2.PE + CAS	5,0	83,8	98
3.GE + CAS	9,4	84,2	98
4.CA + CAS	9,4	90,8	98
5.GE-AL + CAS	9,4	82,2	98
6.PE-GE-AL + CAS	8,1	88,5	98
7.AL + CAS + GVH	9,2	95,4	90
8.PE + CAS + GVH	5,6	94,9	92
9.GE + CAS + GVH	8,4	78,8	93
10.CA + CAS + GVH	9,0	92,3	93
11.GE-AL + CAS + GVH	8,3	83,8	93
12.PE-GE-AL + CAS + GVH	7,7	71,8	90

* E.E. - significa eficiência de encapsulação do material de recheio.

5.10 Eletroforese

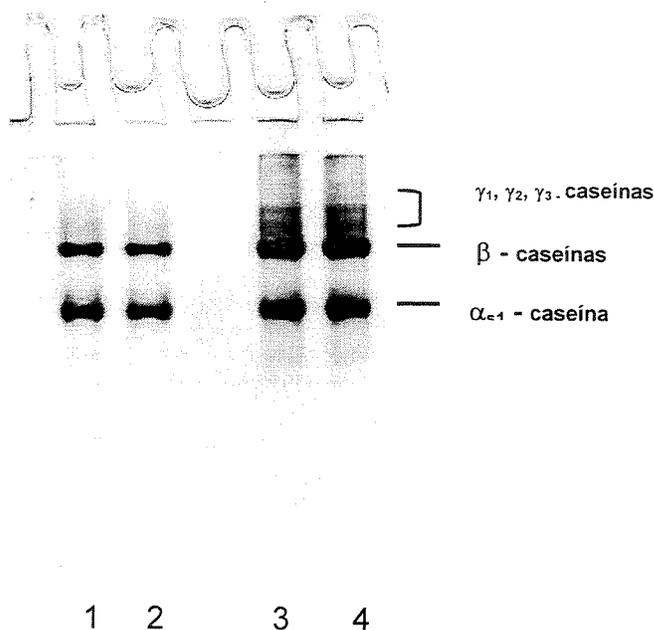


Figura 22. Eletroforese em gel de acrilamida de caseína comercial e caseínato de sódio (controle). Banda 1 e 2 – amostra. Banda 3 e 4 – padrão.

A caracterização e composição de proteínas, da caseína comercial escolhida para ser utilizada como recheio das microcápsulas foi avaliada, através da eletroforese. A Figura 22, mostra respectivamente a eletroforese da caseína comercial e um caseínato de sódio padrão. O perfil da caseína comercial indicou a presença das mesmas bandas protéicas observadas no caseínato de sódio padrão. Essas bandas parecem ser das proteínas α_{s1} , β e γ -caseínas. De acordo com FOX (1998), essas proteínas apresentam peso molecular de 23.613 para α_{s1} , 24.000 para β , e 20.500 a 11.500 Daltons para as γ_1 , γ_2 e γ_3 .

5.11 Flutuabilidade

A flutuabilidade, inicialmente seria avaliada, segundo metodologia proposta por (PEDROZA-ISLAS *et al.* 2000), mas devido à permanência das microcápsulas em suspensão por mais de 4 horas, não foi possível realizar a leitura espectrofotométrica das amostras, de acordo com o método proposto. O método previa a deposição do material até que a transmitância fosse menor que 10%, indicando que a maior parte das microcápsulas se encontrasse sedimentada.

Em substituição, uma captação de imagens foi realizada seqüencialmente, ao longo do tempo. Os resultados apresentados na Figura 23 mostraram que as microcápsulas com matriz de pectina, depois de introduzidas na superfície da coluna de água ($t=0$) se dirigiram para o fundo da cubeta até o tempo de 5 minutos. Após este intervalo, as microcápsulas se movimentaram constantemente e aleatoriamente para todas as direções, flutuando por toda coluna de água; indicando uma alta capacidade de flutuação e um tempo para sedimentação muito mais longo do que o necessário a alimentação das larvas.

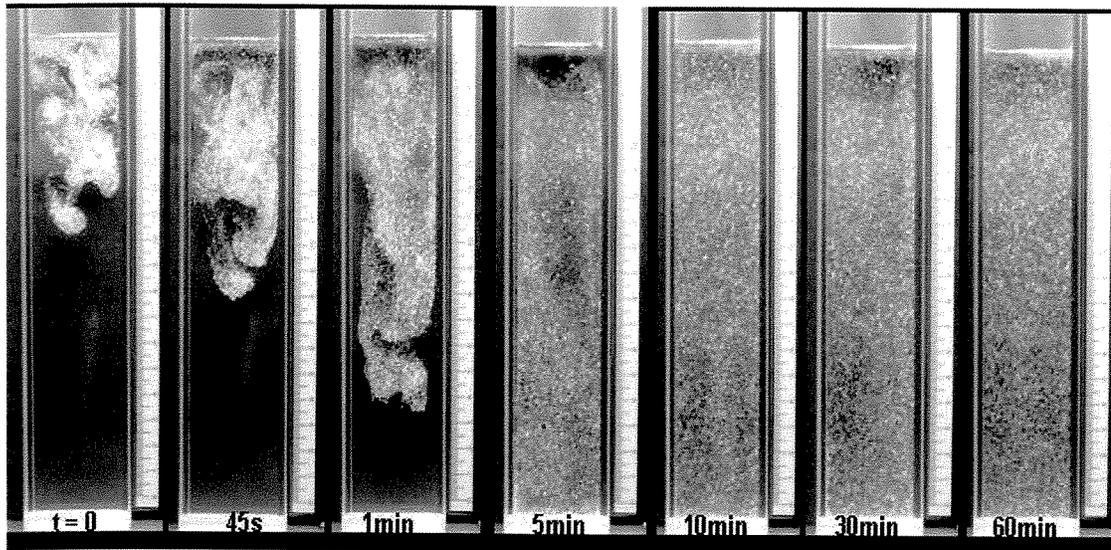


Figura 23. Flutuabilidade de microcápsulas de PE+CAS+GVH ao longo do tempo, em cubeta de quartzo (4,0x2,0x23,0cm). Tamanho médio de partícula: 497.06 μ m.

Os outros tratamentos com alginato, gelana e carragena também apresentaram comportamento semelhante, entretanto, as microcápsulas de alginato revelaram uma leve deposição das partículas no fundo da cubeta.

Após o intervalo de 24 horas, os sistemas poliméricos com carragena e pectina apresentaram deposição da maior parte das microcápsulas, na superfície da água e os sistemas de alginato e goma gelana com deposição da maioria das microcápsulas no fundo. O sistema envolvendo goma gelana, ainda apresentou parte das microcápsulas na superfície da coluna de água. Estas diferenças de flutuabilidade, observadas visualmente, indicam que as microcápsulas apresentaram diferentes densidades, como também observado na flutuabilidade, realizada anteriormente para as cápsulas, obtidas com o auxílio de bomba peristáltica (Item 1.4.3.). A flutuabilidade foi também influenciada, em parte pela adição da gordura nos sistemas.

O comportamento observado na flutuabilidade das microcápsulas é desejável em função dos propósitos aos quais as microcápsulas se destinam.

5.12 Curvas de liberação do recheio protéico

5.12.1 Determinação de proteínas

O método de Kjeldahl utilizado extensivamente na determinação de proteínas, é conhecido por ser bastante preciso e por estar sujeito a poucos interferentes. No entanto, para amostras líquidas com baixo teor de proteína, exige grandes volumes de amostra o que pode diminuir a sensibilidade do método e estender grandemente o tempo de análise.

Como alternativa, existem métodos espectrofotométricos que são mais rápidos e com alta sensibilidade em baixas concentrações. Para a determinação da proteína liberada pelas microcápsulas, foram testados dois métodos comumente usados, a leitura direta de aminoácidos que absorvem em comprimentos de luz na faixa ultravioleta e a reação colorimétrica de complexação com Coomassie Brilliant Blue,

através do método modificado de Bradford (Brad), onde foram detectadas diferenças na determinação de proteína entre os métodos.

A Figura 24 apresenta as curvas-padrões, e respectivas equações de reta, obtidas pelos métodos de Brad e UV utilizando como proteína padrão: caseína (CAS) e soro albumina bovina (BSA). O coeficiente angular de inclinação das retas referentes à mesma proteína, independente do método, foi o mesmo, no entanto os coeficientes angulares das retas de BSA e caseína foram diferentes, indicando que a BSA não deve ser usada como proteína padrão, para a quantificação da caseína.

A Tabela 7 apresenta a comparação das quantidades de proteínas obtidas pelos métodos (Bradford e Absorbância Direta em UV), com os valores obtidos pelo método de Kjeldahl.

Tabela 7. Comparação das quantidades protéicas, obtidas por diferentes métodos. Valores de concentrações calculados a partir das equações de retas da Figura 24.

Kjeldahl	BSA		Caseína	
	0,5 mg/ml	0,3 mg/ml	0,5 mg/ml	0,7 mg/ml
UV-CAS	0,46	0,56	0,93	1,34
UV-BSA	0,52	0,64	1,05	1,51
Brad-CAS	0,39	0,32	0,53	0,74
Brad-BSA	0,54	0,41	0,77	1,11

O coeficiente de extinção usado na determinação da proteína por UV foi calculado segundo STOSCHECK (1990), e os valores obtidos encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Coeficiente de extinção (E) para a CAS e BSA a 205 e 280nm.

	BSA	CAS
E205 (mL mg ⁻¹ cm ⁻¹)	29,936	29,5441
Concentração (mg/ml)	0,528	1,118
E280 (mL mg ⁻¹ cm ⁻¹)	0,732	0,626

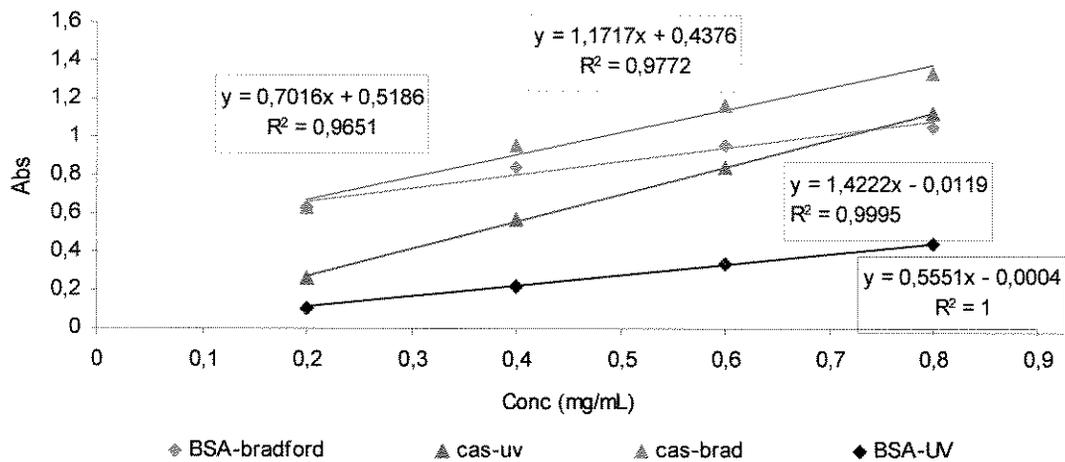


Figura 24. Curvas comparativas de análise de proteína.

A BSA tem sido sugerida como referência em vários métodos de quantificação de proteína (SEDMAN & GROSSBERG, 1977; COPELAND, 1994), porém dependendo da composição da proteína podem ocorrer diferenças na estimativa do valor real de concentração. Assim, a curva padrão mais adequada, segundo COPELAND (1994) seria aquela construída a partir de soluções de concentrações conhecidas, da própria proteína a ser estudada.

O método UV apesar de ter como vantagem a não adição de reagentes para sua execução, permitindo a quantificação direta da proteína em solução, pode sofrer interferência pela presença de diversos compostos, que absorvem luz no mesmo comprimento de onda dos aminoácidos aromáticos (aminoácidos, ácidos nucleicos, detergentes, etc).

Em função da reação colorimétrica envolvendo o corante Comassie Brilliant Blue G250 e a proteína ser bastante específica, e possuir poucos interferentes, a proteína liberada das microcápsulas foi dosada por este método.

As curvas de liberação foram construídas a partir da relação, em porcentagem, entre a proteína liberada com o tempo e corrigida para o valor de Kjeldahl, com o valor determinado inicialmente na microcápsula. A diferença média percentual entre os métodos de Kjeldahl e Brad foi de 6.1%, para a caseína, e se manteve ao longo da curva padrão, na faixa estudada.

5.12.2 Desenvolvimento do aparato de “difusão”

O aparato para o estudo de liberação de formato cilíndrico (60 X 60 mm, altura e diâmetro) foi construído em malha de aço inox (abertura 0.120 mm), imerso em Becker (300ml). As cápsulas eram colocadas dentro do cilindro, com agitação magnética e circulação da solução através de bomba peristáltica, a temperatura ambiente (23 °C).

O ajuste do sistema de liberação (container de amostra e o tipo de agitação) que garantiu a movimentação das microcápsulas e a rápida difusão da proteína para a parte externa do container, exigiu agitação magnética e também a circulação do solvente utilizando-se bomba peristáltica. A determinação da concentração protéica dentro e fora do container resultou em 97,3% de proteína difundida para a parte externa após dois minutos de operação e 99.6% após 5 minutos, definindo assim a configuração adotada para o sistema de medida da liberação (Tabela 9, AP 3).

Como pode ser observado na Tabela 9, a eficiência dos equipamentos desenvolvidos foi avaliada através do gradiente de concentração protéico dentro e fora do aparato, permitindo assim o acompanhamento da difusão de solutos pela tela protetora que circundava as microcápsulas.

Os dois modelos iniciais propostos, acomodavam as microcápsulas do lado externo do aparato, sendo as alíquotas de amostragem retiradas na parte interna, com a agitação feita por agitação recíproca e agitação magnética, respectivamente. Estes sistemas, porém não apresentaram resultados satisfatórios, apresentando valores de eficiência, para os tempos estudados, menores do que 95%.

Tabela 9. Eficiência dos aparatos para medir a liberação de proteína ao longo do tempo, expressa em porcentagem.

Tempo (min.)	Eficiência (%)**		
	AP 1*	AP 2	AP 3
2	4,00	90,82	97,30
5	56,6	94,88	99,55
10	98,02	93,35	99,75
20	95,62	90,66	98,94
30	91,16	91,55	98,51
60	97,42	97,91	98,57

*As siglas AP 1, AP 2 e AP 3 significam os aparatos desenvolvidos.

** A eficiência foi calculada, através da diferença de concentração do lado externo em relação ao lado interno do aparato de difusão, expressa em porcentagem.

5.12.3 Microcápsulas úmidas contendo proteína

A liberação controlada de proteínas em matrizes polimérica é geralmente utilizada para prolongar a meia vida de circulação das proteínas, ou para direcionar a entrega da proteína em locais específicos (GOMBOTZ e WEE, 1998). O perfil de liberação permite conhecer as características conjuntas de porosidade e possíveis interações recheio/material de parede, apresentados pelas microcápsulas, direcionando-as para utilizações específicas. A Figura 25 apresenta as curvas de liberação obtidas durante 240 minutos de experimento, quando somente proteína foi incorporada as microcápsulas. Microcápsulas produzidas com alginato apresentaram a liberação total da proteína encapsulada (100%), no período estudado.

Esse comportamento para cápsulas de alginato de cálcio havia sido observado anteriormente por TANAKA et al. (1984) onde glicose, triptofano α -lactoalbumina apresentaram coeficientes de difusão iguais aos obtidos em água pura, observando também a liberação completa de albumina, γ -globulina e fibrinogênio, com altas massas moleculares difundindo das cápsulas para a solução. MARTINSEN, SKAJAK-BRAEK, SMIDSRØD (1989) encapsularam ovoalbumina, BSA, γ -globulina e fibrinogênio (PM de $4.5 \cdot 10^4$ a $33 \cdot 10^4$ Da) em alginato de cálcio, observando diferenças entre as curvas de liberação, onde a taxa de difusão decrescia com o aumento do tamanho da proteína, e

crescia conforme aumentava o conteúdo de ácido galacturônico na cadeia polimérica do alginato.

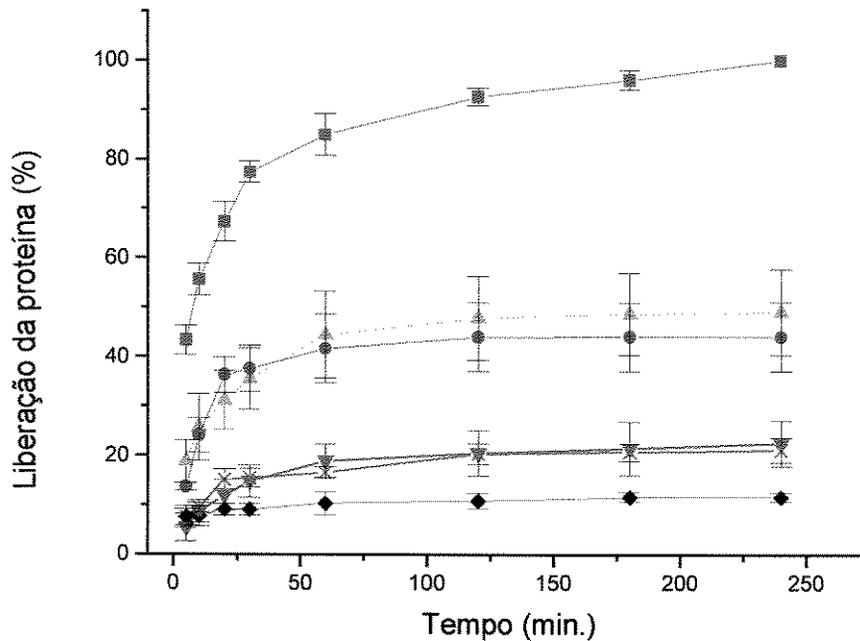


Figura 25. Curvas de liberação da proteína das microcápsulas (úmidas), em função do tempo, contendo como recheio proteína (CAS). Matriz: (■) alginato; (x) carragena; (●) goma gelana; (▲) pectina; (▼) mistura binária – GE/AL; (◆) mistura ternária - PE/GE/AL. Valores expressos em porcentagem acumulada.

Apesar das diferenças, foi observada uma alta liberação para a solução de todas as proteínas estudadas, variando de 0.80 a 1.0 (quantidade de proteína na cápsula/quantidade de proteína na solução) após 250 minutos de experimento. Por outro lado KIERSTAN e BUCKE (1977), observaram que glicose oxidase ($PM = 1.54 \cdot 10^5$ Da) e innulase ($PM > 10^5$ Da), foram retidas pelas cápsulas de alginato, justificando que não somente a massa molecular, mas a estrutura do composto encapsulado deveria ser considerada. TOMIDA, NAKAMURA, YOSHITOMI, KIRYU (1993) encapsularam teofilina em alginato de cálcio, observando uma liberação de 80% da droga, após duas horas em solução, entretanto quando a cápsula foi produzida de

forma inversa, sendo a droga adicionada a solução de íons cálcio e gotejada em solução de alginato, a liberação no mesmo período de tempo apresentou uma redução para 25% de liberação, em relação ao conteúdo inicial.

Pode-se observar (Fig. 25) que as microcápsulas de alginato contendo proteína apresentaram liberação de 70% nos primeiros 30 minutos de permanência em solução, com a liberação do restante da proteína entre 30 a 240 minutos. Essas quantidades liberadas podem estar associadas a interações eletrostáticas, predominantes na associação proteína/alginato (VELLINGS et al., 1995; COPPI et al., 2002). Na condição de pH do experimento (9.3, Tabela 6), tanto proteína como o alginato, estavam negativamente carregados ($\text{pH} > \text{pKa}$) em decorrência da desprotonação dos grupos carboxílicos, ocorrendo portanto maior repulsão eletrostática o que pode ter provocado a liberação mais rapidamente através da matriz (GOMBOTZ e WEE, 1998; COPPI et al., 2002).

MARTINSEN, SKAJAK-BRAEK, SMIDSROD (1989) observaram que a taxa de liberação de proteínas ácidas em esferas de alginato de cálcio era inversamente proporcional ao peso molecular da proteína, onde as proteínas ácidas eram menos prováveis de interagir com o alginato, e desta forma serem liberadas por difusão através dos poros da matriz, enquanto proteínas básicas poderiam interagir com a rede da matriz e assim apresentar uma difusão através dos poros diminuída. Esses autores observaram que a matriz de alginato apresentava uma variação de tamanho de poros entre 50 a 1500 Å, e assim proteínas globulares com raio de giração de 30 Å e carga líquida negativa não deveriam ser retidas pela rede, podendo difundir através das esferas para a solução. Controle de liberação devido a interações eletrostáticas foi observado para microcápsulas de alginato contendo BSA em pH 3.5 (COPPI et al., 2002). GREY e DOWSETT (1988) observaram que a liberação de BSA encapsulada em alginato de cálcio (1.5%) foi da ordem de 77%, onde a liberação de 73% ocorreu nas primeiras quatro horas de liberação e os 4% restantes liberados entre 4 e 24 h, observando também liberações de até 95%, em função das diferentes concentrações de alginato utilizadas.

A porosidade, bem como o tipo de matriz polimérica do alginato, não foram suficientes para evitar que a molécula de caseína ficasse retida na matriz. Uma forma de melhorar esta retenção segundo TANAKA et al (1984); MATIRSEN et al. (1987); GOMBOTZ e WEE, (1998), seria aumentar concentração da solução de alginato, reduzindo assim o tamanho dos poros nas microcápsulas. Porém, com o aumento da concentração do polímero resultaria em um aumento da força do gel produzindo cápsulas mais rígidas, o que pode não ser interessante ao propósito do trabalho, pois as larvas de peixes em sua maioria, possuem um tubo digestivo incompleto ainda em formação, neste estágio de vida. Estudos específicos, correlacionando os diagramas de fase, as concentrações poliméricas e a dureza das microcápsulas, bem como sua porosidade e posterior levantamento dos perfis de liberação são necessários à continuidade do presente estudo.

As cápsulas produzidas com a mistura ternária (pectina/gelana/alginato, 1/3:1/3:1/3) apresentaram a menor porcentagem de liberação, seguidas pelas microcápsulas obtidas da mistura binária (gelana/alginato, $\frac{1}{2} : \frac{1}{2}$) e pela carragena, entre os polissacarídeos para as cápsulas úmidas, retendo 90%, 80% e próximo de 80%, respectivamente após 240 minutos, em relação à proteína originalmente presente nas cápsulas. Menores liberações nos sistemas binários e ternários podem ter sido provocados pela formação de uma rede de gel melhor entrelaçada, com possível diminuição da quantidade e tamanho dos poros, dificultando assim a liberação da proteína para a solução. Um significativo decréscimo na retenção de albumina encapsulada em mistura de alginato-quitosana comparada às encapsuladas em alginato foram atribuídas por POLK et al. (1994) a uma combinação do aumento da interação iônica quitosana-alginato e a um aumento da interpenetração entre os polímeros na rede que pode ter produzido uma membrana mais grossa e forte, criando assim uma maior barreira à difusão da proteína.

Microcápsulas de pectina e gelana apresentaram liberações em torno de 35%, nos primeiros 30 minutos em solução. Após esse intervalo a liberação não apresentou mais diferenças significativas ($p < 0.05$) mantendo-se próxima de 40%, com retenção ligeiramente maior para as microcápsulas de pectina (Fig.25). Esse sistema apresentou

o menor valor de pH (5.0, Tabela 6) entre os estudados, entretanto acima do pKa da pectina (pKa =3.5, WONG et al., 2002) tornado-a desprotonada, com carga negativa e bastante próxima ao valor do pI da caseína (4.6), indicando uma possível redução na solubilidade protéica, o que pode ter influenciado a retenção da proteína no interior das microcápsulas.

Para todos tratamentos contendo o polissacarídeo e proteína, exceto quando as misturas binária e ternária foram utilizadas, foi observada uma maior inclinação nas curvas de liberação até 30 min, indicando a existência de um efeito “burst” devido ao material encapsulado sobre ou próximo à superfície das microcápsulas. Uma segunda fase é observada nas curvas apresentando um perfil de liberação próximo ao “estado estacionário”, excetuando-se as cápsulas produzidas com alginato nas quais a liberação foi crescente até a o final do experimento. Efeito “burst” foi observado por LIU et al (1997) na encapsulação de BSA para cápsulas produzidas com alginato e também para cápsulas produzidas com alginato e revestidas com quitosana, com propriedades de liberação melhoradas em relação ao alginato. Por outro lado, COPPI et al. (2002) utilizaram alginato e quitosana na encapsulação de BSA, observando um comportamento de três fases na curva de liberação, com uma baixa liberação na primeira fase, um efeito “burst” acentuado na segunda e uma terceira fase de liberação constante, atribuindo esses efeitos ao comportamento dos polímeros frente à variação de pHs durante o estudo de liberação.

As curvas de liberação para as cápsulas contendo os polissacarídeos e a proteína apresentaram diferenças significativas entre os diferentes materiais de parede utilizados ($p < 0.05$). Ao final de 240 minutos, com exceção entre as cápsulas produzidas com pectina e gelana.

5.12.4 Cápsulas úmidas contendo proteína e gordura

Embora a gelificação iônica seja um método brando para a encapsulação de compostos com atividade biológica, e os polissacarídeos utilizados apresentem

características não tóxicas, cápsulas produzidas dessa forma apresentam taxas de liberação bastante altas especialmente para compostos aquossolúveis e de baixa massa molecular (VILLAMAR e LANGDON, 1993). Várias estratégias têm sido empregadas para melhorar as características de liberação, entre elas, a inclusão de uma mistura de lipídeos foi adotada, mostrando-se adequada para a retenção desses compostos na produção de microcápsulas desenvolvidas para alimentação de larvas de espécies marinhas (LANGDON et al., 1994); a substituição de outro íon pelo cálcio na formação do crosslinking foi utilizado por GRAY, DOWSETT (1988), onde a matriz alginato-zinco mostrou-se mais eficiente na liberação prolongada de insulina e mais recentemente, a utilização de polilisina como agente de crosslinking ou a cobertura das cápsulas de alginato por quitosana também produziram perfis de liberação bastante melhorados, especialmente para o conjunto alginato-lisina utilizando BSA e interleukin-2, um agente com propriedades imunoterapêuticas (LIU et al., 1997).

De forma a produzir mínimas alterações de tamanho, dureza e tentativamente mesma quantidade e diâmetro de poros presentes nas microcápsulas, a mesma relação de agente gelificante e íons cálcio para a produção de cápsulas contendo proteína e gordura foi mantida, provocando portanto a adição de quantidades menores de proteína nos sistemas contendo gordura. A comparação entre os sistemas contendo proteína e os contendo proteína e gordura não pode ser feita diretamente, uma vez que a quantidade de recheio pode determinar diferentes eficiências de encapsulação e diferentes perfis de liberação. LIU et al. (1997) observaram que um aumento na quantidade de BSA encapsulada de 1 a 16% (p/p) provocou mudanças significativas no tempo de liberação de 50% da proteína encapsulada, que variou de 20 a 45 h para os extremos de concentração estudadas.

As curvas de liberação dos sistemas com a inclusão da gordura (Fig 26 a) apresentaram a seguinte ordem decrescente de liberação: carragena (88%) > alginato (30%) > sistema binário e ternário (10 a 15%) > gelana e pectina (inferior a 2%), com a inversão dos sistemas binário e ternário, em relação a gelana e pectina; a carragena em relação ao alginato, observados no sistema sem gordura (Fig. 25).

A matriz de carragena apresentou uma alta taxa de liberação, crescente ao longo do tempo até o final do experimento. Este comportamento atípico, com grande quantidade de proteína liberada em sistema contendo gordura, presume a ocorrência de desestabilização da emulsão, devido a uma provável competição do polímero e da proteína pela gordura. Segundo GLICKSMAN (1979) uma repulsão mútua entre os grupos sulfato resultam na extensão, prolongação e posterior desenrolamento na cadeia da carragena causando hidrofobicidade.

Os perfis de liberação obtidos (Fig. 25 e Fig 26a) foram semelhantes, o efeito “burst” ocorre com ou sem a adição da gordura. A análise estatística apontou diferenças significativas ($p < 0.05$) ao final de 240 minutos, entre os sistemas contendo gordura, excetuando-se as cápsulas produzidas com pectina ou com gelana, estatisticamente sem diferença.

Para todos os sistemas com gordura, observou-se que a mesma manteve-se dentro da cápsula durante a permanência das cápsulas em suspensão no meio aquoso, durante os experimentos de liberação. Este comportamento também observado por KING (1988) relata que, embora a porosidade dos géis de alginato permita a livre difusão de solutos aquosolúveis, materiais lipídicos serão mantidos dentro da matriz, mesmo sendo de baixa massa molar, quando a solução contendo as cápsulas for aquosa.

5.12.5 Cápsulas secas contendo proteína e gordura

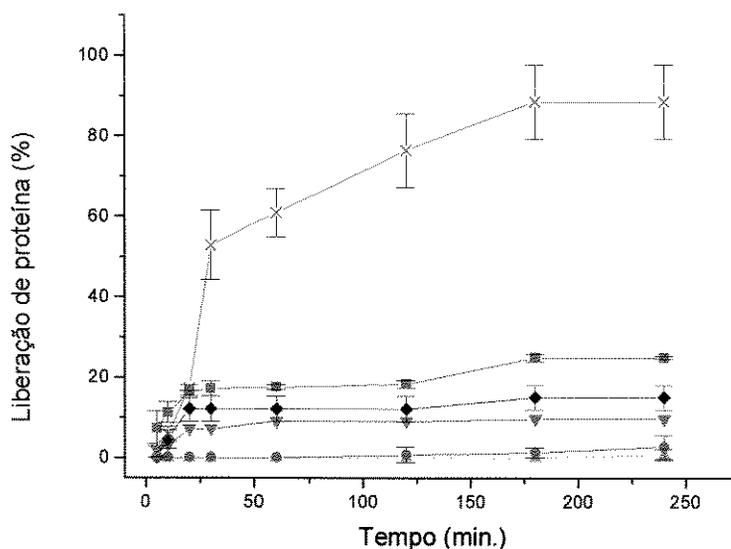
A porosidade de um gel pode ser significativamente reduzida pela secagem parcial das esferas (SMIDSROD, 1973), sugerindo que alguma restrição na difusão, mesmo para pequenas moléculas possa ocorrer; no entanto, a desidratação das cápsulas pode resultar em quebras na superfície e facilitar a erosão posterior durante o contato das cápsulas com o meio de liberação. Matrizes de alginato contendo dextrana azul, após desidratação foram submetidas a ensaio de liberação observando-se que a liberação da dextrana das amostras desidratadas foi mais rápida, comparada às amostras úmidas em decorrência do aparecimento de rachaduras nas capsulas (KIM et

al., 1992). Adicionalmente, as microcápsulas desidratadas expandem em solução aquosa, sendo a absorção de água e o inchamento das cápsulas um importante fator no controle da taxa de liberação do composto encapsulado, uma vez que a permeabilidade da cápsula é afetada pelo aumento no tamanho dos poros, bem como da superfície de área disponível para contato com a solução que a rodeia (POLK et al., 1994). A distribuição e tamanho dos poros têm fundamental influência na difusão das moléculas, através da rede de gel nas microcapsulas (VELINGS et al, 1994 apud MESTDAGH e AXELOS, 1998).

Os perfis de liberação obtidos (Fig 26b) para as microcápsulas liofilizadas, contendo proteína e gordura mantiveram-se muito próximos aos obtidos para as microcápsulas úmidas (Fig. 26a), com mesma ordem de grandeza e significativo decréscimo (~7%) para as cápsulas de alginato secas em relação às úmidas, após 3 horas de liberação. Cápsulas de gelana ou pectina apresentaram praticamente os mesmos valores para as cápsulas úmidas e secas quanto à liberação protéica. Esses resultados indicam que as cápsulas parecem ter mantido alguma integridade, e possam ter se reidratado consideravelmente em relação ao sistema úmido. Esse efeito foi observado por POLK et al. (1994), trabalhando com cápsulas desidratadas de alginato e misturas de alginato-quitosana, onde os sistemas reabsorveram água em grande quantidade readquirindo 75% de seu diâmetro original, após ½ h de contato, e posteriormente atingindo 90% do diâmetro inicial em 24 horas. Recuperação do volume original das microcápsulas liofilizadas após reidratação foi observada em porcentagem semelhante por LIU et al. (1997).

A desidratação acentuada dos géis de polissacarídeos produzida por liofilização pode contribuir para a formação de matriz porosa, semelhante a uma esponja e característica de materiais liofilizados. (VEELKEN e PAPE, 1984). A morfologia das microcápsulas secas por liofilização utilizando MEV (Fig. 18 a 21), parece indicar que a secagem e a reidratação não causaram um excessivo rompimento das microcápsulas, o que determinou um comportamento de liberação semelhante ao das cápsulas úmidas. Esse efeito pode ter sido determinado pela presença das gotas de gordura entremeadas na matriz polissacarídica das microcápsulas.

a.



b.

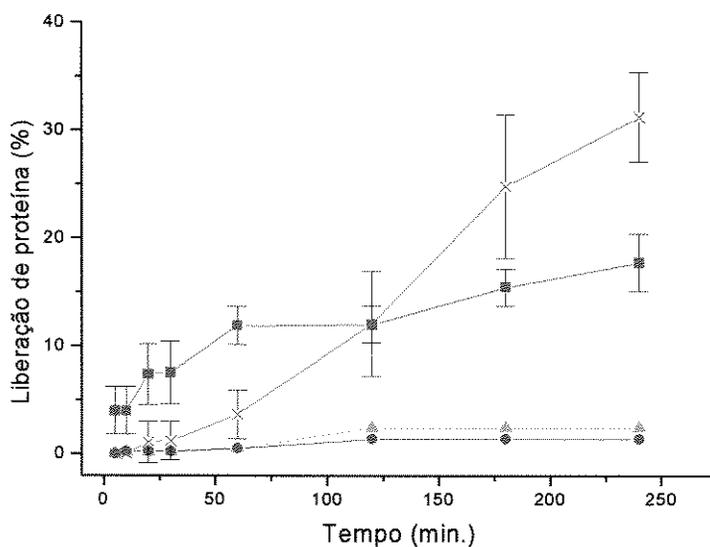


Figura 26 Curvas de liberação da proteína das microcápsulas, em função do tempo, contendo como recheio proteína (CAS) e gordura (GVH).. Matriz: (■) alginato; (x) carragena; (●) goma gelana; (▲) pectina; (▼) mistura binária – GE/AL; (♦) mistura ternária - PE/GE/AL.. a. microcápsulas úmidas; b. liofilizadas. Valores expressos em porcentagem acumulada.

As curvas de liberação de proteína observadas nas diferentes microcápsulas tenderam a apresentar um comportamento, descrito na literatura como cinética de liberação de primeira ordem. TANAKA et al. (1984); THIES (1995); CARDOSO (2000), observaram que cápsulas desenvolvidas para liberação controlada tendem a apresentar liberação de primeira ordem. No entanto, mais estudos com aplicação de modelagens matemáticas, sobre os resultados experimentais obtidos, podem ser feitos para se ajustar um modelo de liberação às curvas experimentais obtidas. Desta forma, o conhecimento do processo de liberação poderá permitir o desenvolvimento de sistemas onde o controle da liberação seja o objetivo alvo para o desenho de novas microcápsulas.

5.13 Morfologia e microestrutura das microcápsulas.

5.13.1 Microcapsulas com recheio de proteína e gordura

5.13.1.1 Microscopia ótica

Em geral, as observações das microcápsulas com recheio composto de proteína e gordura foram semelhantes às aquelas já observadas, com recheio de óleo-resina de páprica, com formas esféricas em sua maioria e multinucleadas, exceto as obtidas com matriz de PE, que antes apresentavam uma forma mais amorfa. As gotas de gordura também apresentam uma distribuição de tamanho facilmente observável na microscopia ótica. Cápsulas mais translúcidas foram observadas para as fabricadas com gelatina. As microcápsulas obtidas, com diferentes matrizes podem ser visualizadas na Figura 27

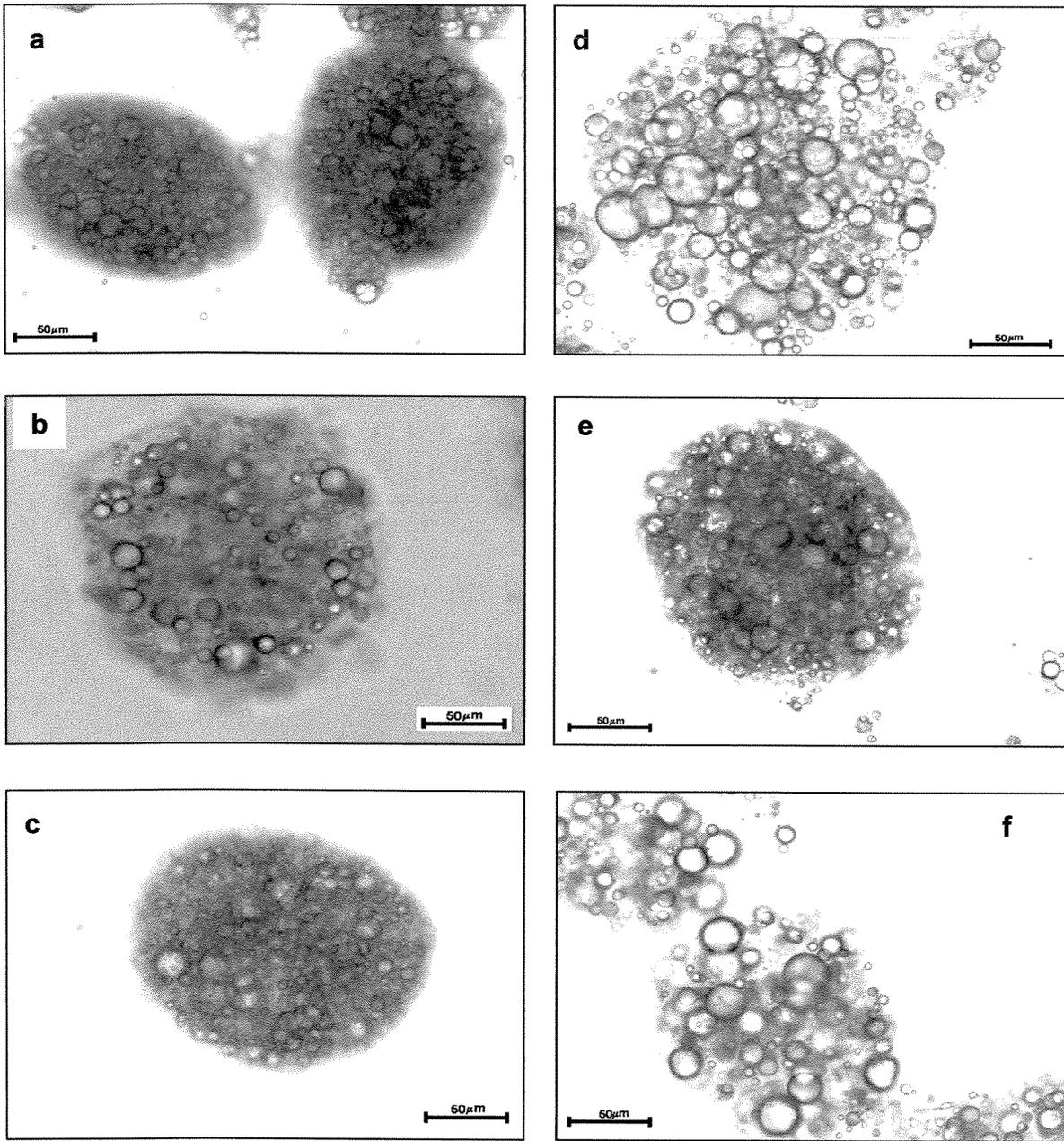
A diferença de cor observada nas microcápsulas fabricadas com óleo-resina e aquelas contendo proteína e gordura, entre as diferentes coberturas (matrizes) utilizadas, tinham sido relacionadas a uma aparente quantidade de recheio. Porém, quando se determinou a quantidade de proteína dentro da cápsula observou-se que

não havia correlação com estas diferenças de cor. Pressupõe-se que diferentes interações com as matrizes dos polímeros utilizados, podem estar ocorrendo, alterando assim a refração do óleo encapsulado, ou ainda que essas matrizes possam ter opacidade e cor diferenciadas o que resultaria em diferentes cores observadas nas microcápsulas.

5.13.1.2 Microscopia de varredura laser confocal.

A análise por microscopia confocal permitiu uma melhor visualização da microcápsula, sendo possível, devido à especificidade dos corantes utilizados, localizar as esferas de proteínas, polissacarídeos e gorduras, espacialmente distribuídas na microcápsula, em diferentes planos de profundidade.

A Figura 28, apresenta microcápsulas observadas por microscopia confocal utilizando diferentes arranjos. A série 1a, 2a e 3a representa, respectivamente, a gordura colorida com Nile red, a proteína colorida com FITC e a sobreposição das imagens, todas efetuadas aproximadamente, no meio da espessura da microcápsula. É possível observar a distribuição das gotas de proteína e as de gordura por todo o corte da microcápsula, que se apresenta esférica. Na série 1b, 2b e 3c, a gordura continua corada com Nile red e o FITC foi usado para colorir a solução polimérica de alginato e a posterior superposição das duas imagens. Detalhes da distribuição da gordura e do contorno esférico da matriz polimérica podem ser observados. Todos os constituintes foram coloridos, anteriormente a formação das microcápsulas. A observação das microcápsulas revelou que a matriz se apresenta multinucleada, conforme também observado na microscopia ótica. Uma vez, que a reação com o FITC não foi inibida, o excesso do corante pode ter reagido posteriormente. Neste caso, algumas alternativas de inativação e lavagem para a retirada do excesso do reagente livre foram adotadas por outros autores (LAMPRECHT et al., 2000). A possibilidade de alterar as características físico-químicas do polissacarídeo, e a possibilidade de desnaturação da proteína, levaram a não adoção desses procedimentos neste trabalho.



Figuras 27. Morfologia de superfície de sistemas poliméricos contendo CAS+GVH obtidos por microscopia ótica em aumento de 20X. **a.** AL; **b.** PE; **c.** CA; **d.** GE; **e.** GE-AL; **f.** PE-GE-AL.

Ainda utilizando a captação de imagens no confocal, agora no modo DIC (Contraste Interferencial Diferencial de Fase), a cápsula contendo GVH ligada ao Nile red e à proteína associada ao FITC, foi efetuada. A Figura 29, representa a mesma cápsula observada na Figura 28.3b, porém agora sem fluorescência, somente através de microscopia ótica no aparelho confocal, permitindo visualizar a distribuição das gotas de gordura em todos os planos de profundidade da microesfera, o que foi possível devido a cápsula se apresentar translúcida. A distribuição do polímero para formação da rede polimérica também pode ser observada. Uma comparação do tamanho, tanto das gotas de gordura como as de proteína, também pode ser feita com auxílio dos corantes da proteína (FITC) e da gordura (Nilo red), e comparadas as imagens obtidas na microscopia ótica (Fig. 27) e eletrônica de varredura (Fig. 18 a 21).

5.13.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das microcápsulas secas por liofilização.

A avaliação da microestrutura das microcápsulas foi importante, pois segundo ROSENBERG et al. (1990), a estrutura pode estar relacionada com a capacidade de proteção apresentada por diferentes biopolímeros. Os autores sugerem que as indicações desta capacidade são fornecidas pelo grau de integridade e porosidade das microcápsulas.

As morfologias apresentadas, bem como os comentários foram relatados no item 1.1 (Secagem por liofilização). As depressões ou rugosidades observadas na superfície das microcápsulas (Fig. 18 a 21) semelhante ao observado na secagem por atomização, parecem decorrentes da saída de água da microcápsula, durante a sublimação no processo de liofilização .

5.14 Distribuição dos tamanhos de partículas

As microcápsulas apresentaram tamanhos compatíveis aos organismos aquáticos, como o rotífero *B.plicatilis* (99 a 281 μ m) e náuplios de *Artemia* sp (350 a 530 μ m), comumente utilizados como alimentação das larvas de peixe. A análise por *laser scattering*, apresentou uma faixa máxima de tamanho entre 2 a 870 μ m. A semelhança com os resultados obtidos por microscopia ótica de microcápsulas com óleo-resina de páprica (12 a 775 μ m) sugere que a observação por microscopia ótica seja suficiente, sendo uma análise de grande importância, para permitir uma comparação direta entre os resultados, além de fornecer informações adicionais sobre as microcápsulas tais como forma, localização e distribuição aparente do recheio.

A distribuição de tamanho para as diferentes microcápsulas (Fig. 3) apresentou-se unimodal, independente do material com exceção a carragena, com um tamanho médio de 199,2; 223,3; 194,3; 5,9; 227,1 e 190,0 μ m para microcápsulas de alginato, pectina, gelana, carragena, mistura binária e ternária, respectivamente, contendo proteína. Para as microcápsulas contendo proteína e gordura, seguindo a ordem apresentada, a distribuição de tamanho foi de 78,5; 497,0; 134,3; 5,17; 110,81 e 181,5 μ m, respectivamente.

A determinação da distribuição do tamanho de partículas por *laser scattering*, apresentou certa discrepância nas amostras analisadas. Esses desvios podem estar associados a interferências na determinação do tamanho de partículas, devido à distribuição de massa molecular relativamente alta dos polissacarídeos estudados apresentando polidispersão, comum em muitos polímeros. A maior discrepância se encontra nas microcápsulas com matriz de carragena, apresentando tamanhos bem inferiores aos demais tratamentos, o que não foi observado na determinação de tamanho por microscopia ótica.

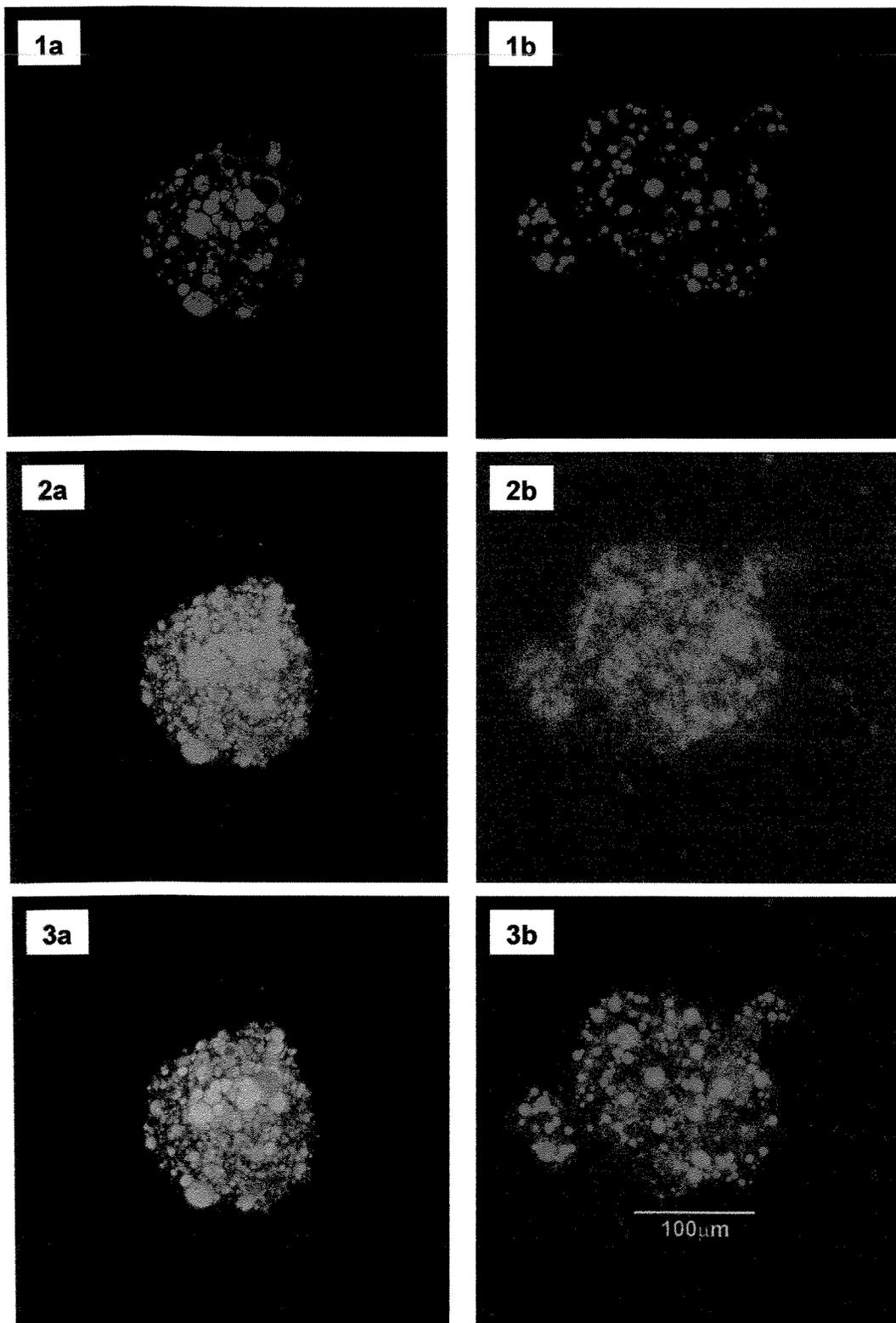


Figura 28. Microscopia Confocal: Sistema Alginato-FITC ou Caseína-FITC (fluorescência observada-cor verde) e Gordura Hidrogenada-Nile Red (fluorescência observada-cor vermelha): 1a. e 1b. Gordura Hidrogenada-Nile Red 2a. Caseína-FITC; 2b. Alginato-FITC, 3a. Sobreposição Caseína-FITC e Gordura Hidrogenada-Nile Red; 3b Sobreposição alginato-FITC e Gordura Hidrogenada-Nile Red.

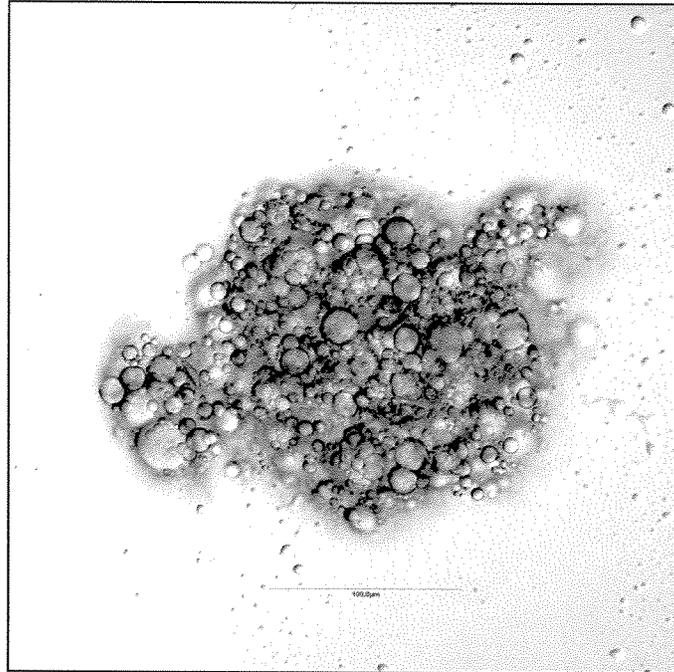


Figura 29. Morfologia de superfície de microcápsulas de AL com recheio de CAS+GVH obtido por microscopia confocal DIC (20X).

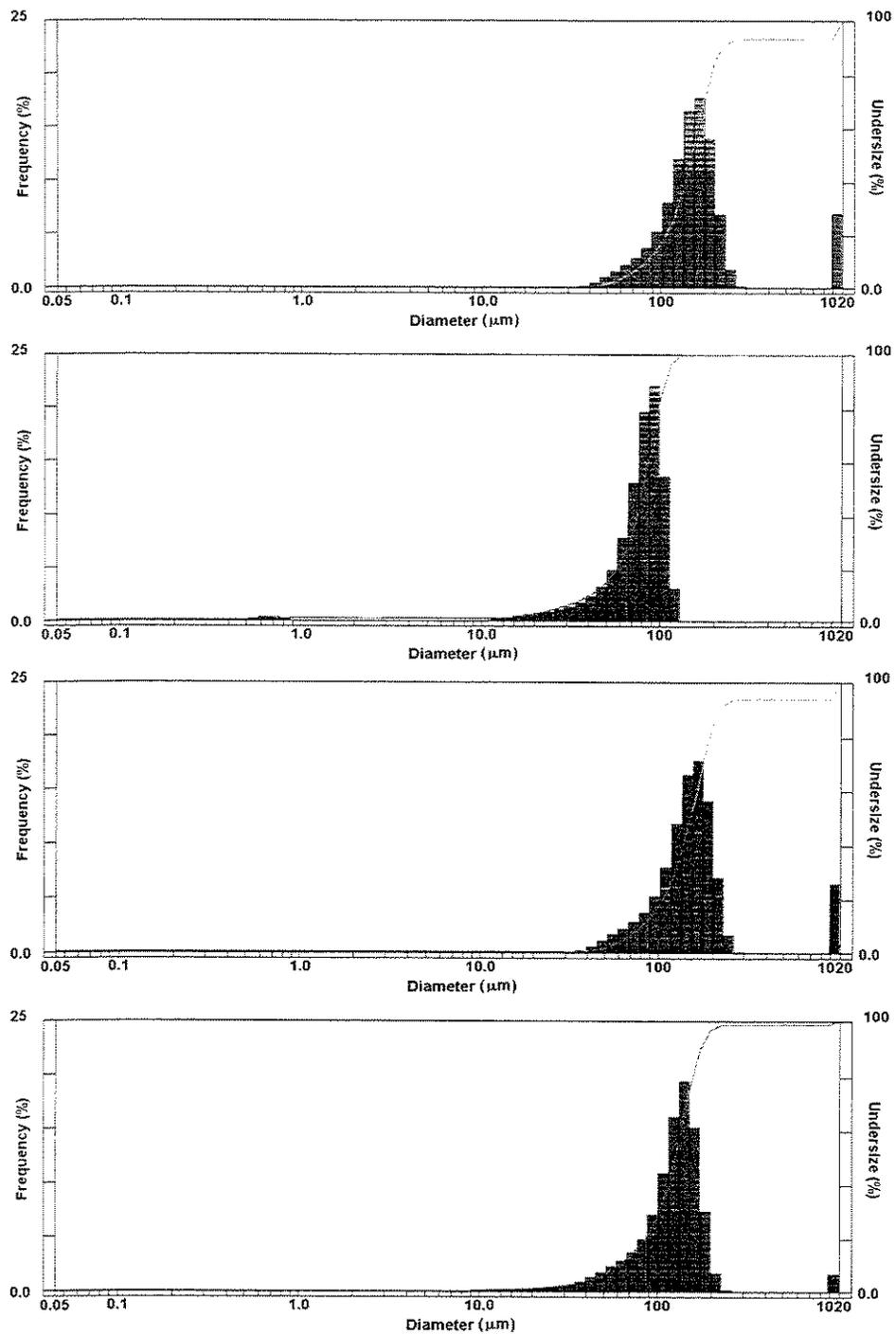


Figura 30 Distribuição de tamanho de microcápsulas: 1a. alginato com recheio de proteína; 1b. alginato com recheio de proteína e gordura; 2a. goma gelana com recheio de proteína; 2b. goma gelana com recheio de proteína e gordura.

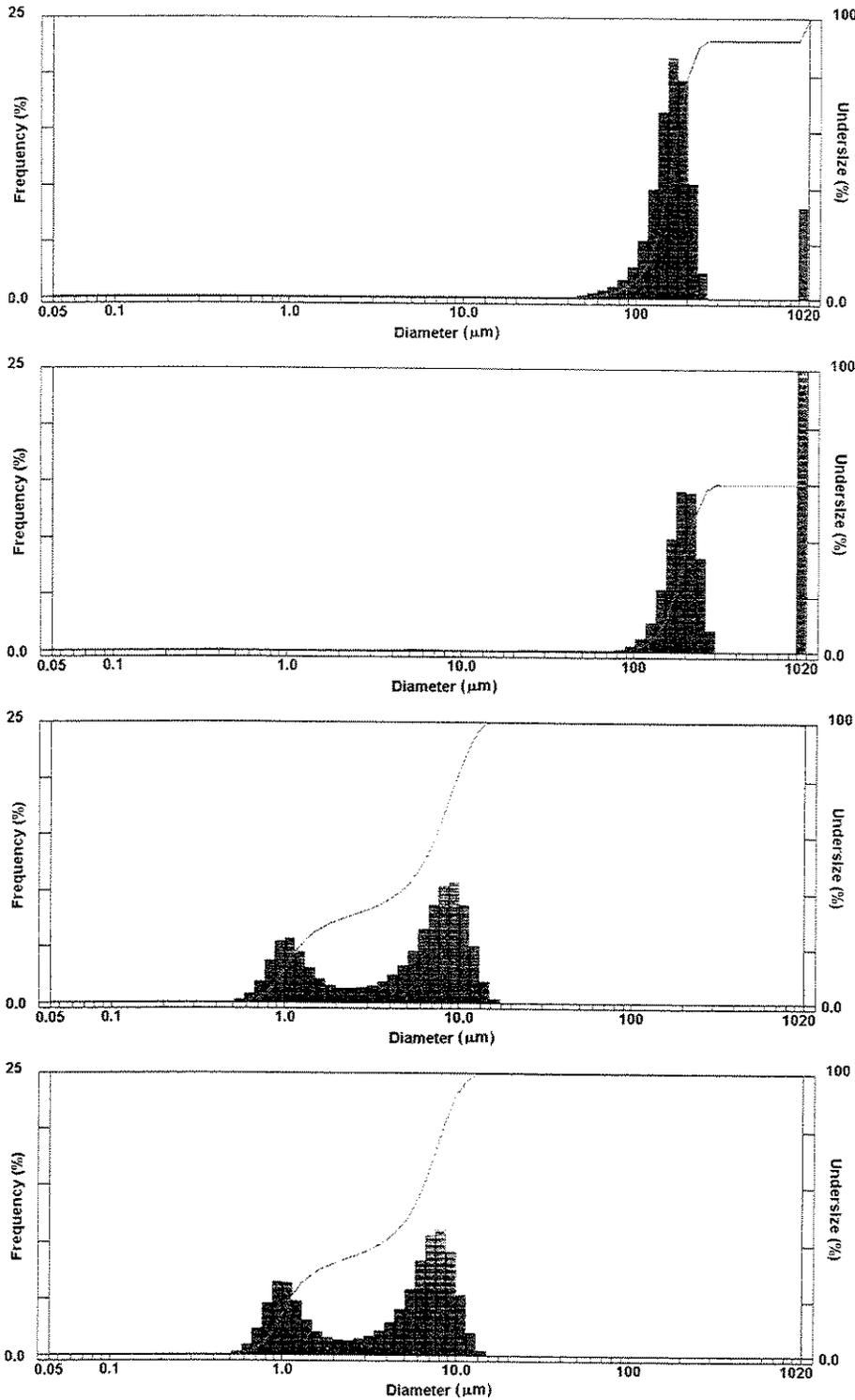


Figura 31. Distribuição de tamanho de microcápsulas: 1a. pectina com recheio de proteína; 1b. pectina com recheio de proteína e gordura; 2a. carragena com recheio de proteína; 2b. carragena com recheio de proteína e gordura.

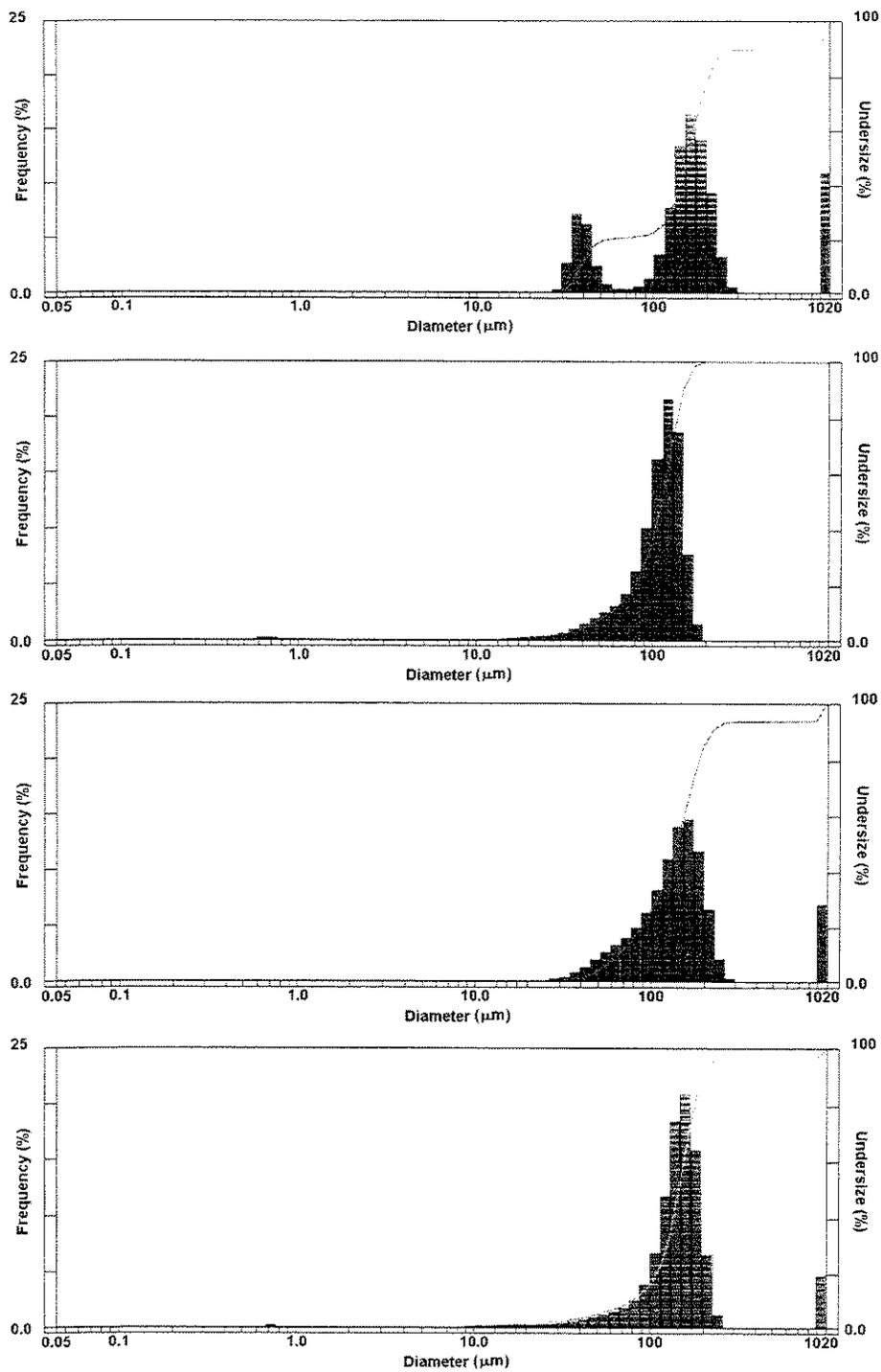


Figura 32. Distribuição de tamanho de microcápsulas: 1a. Gelana-alginato com recheio de proteína; 1b. Gelana-alginato com recheio de proteína e gordura; 2a. Pectina-gelana-alginato com recheio de proteína; 2b. Pectina-gelana-alginato com recheio de proteína e gordura.

5.15 Digestibilidade “in vitro ”

A medida da digestibilidade em larvas de peixes é necessária para se produzir uma dieta artificial que potencialmente possa substituir o alimento vivo. A sua determinação é uma das principais etapas para avaliação da biodisponibilidade dos nutrientes, para uma dada espécie. Este tipo de análise vem sendo executada rotineiramente em um grande número de centros de pesquisa no mundo todo voltados à larvicultura e a criação de peixes (BRUNSON, 1997; LAZO et al.,1998; BASSOMPIERRE et al., ALARCÓN et al., 1999; MOYANO & SAVOIE, 2001; ABDUL-HAMID et al., 2002; SRIVASTAVA et al.,2002).

A digestibilidade *in vitro* tem sido uma ferramenta muito importante para o desenvolvimento de dietas artificiais, visto a dificuldade de acompanhar em experimentos *in vivo*, a digestibilidade protéica dos alimentos destinados as larvas, cujo tamanho é muito pequeno e o manuseio difícil.

Com o intuito de avaliar o acesso de enzimas digestivas à proteína microencapsulada pelos polissacarídeos, ensaios de digestibilidade *in vitro* foram conduzidos por duas metodologias. Os resultados apresentados se encontram na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de digestibilidade *in vitro* estimada pela medida de proteólise e por queda de pH.

Amostra	Medida proteolítica (%)			Queda de pH (%) tripsina
	extrato larval (1)	extrato larval (2)	Tripsina	
AL	65,86±0,18 ^a	42,8±0,08 ^a	42,59±0,01 ^a	77,53±0,01 ^a
CA	59,51±0,04 ^a	28,45±0,02 ^c	43,79±0,02 ^a	76,26±0,01 ^a
GE	46,59±0,09 ^{ab}	46,95±0,05 ^a	48,34±0,01 ^a	69,52±0,01 ^b
PE	39,77±0,04 ^b	33,23±0,02 ^b	49,81±0,03 ^a	76,67±0,02 ^a

Médias com as mesmas letras não diferem significativamente entre si (p>0,05). Letras minúsculas apresentam diferenças entre amostras. A simbologia (1) significa que o extrato foi conservado em freezer e (2) conservado em nitrogênio líquido.

As microcápsulas apresentaram diferentes valores de digestibilidade *in vitro* para os métodos de proteólise estudados. No primeiro ensaio usando a metodologia adaptada de AKESON & STAHMANN (1964), que teve 24 horas de incubação das microcápsulas com extrato larval de tilápia (1) conservados em freezer, observou-se diferentes digestibilidades da proteína encapsulada em matrizes de AL e CA, em relação as matrizes GE e PE. Ensaio para verificação de diferenças na digestibilidade da proteína livre em diferentes tempos (8, 18 e 24 horas de incubação) foram realizados e não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si.

Um segundo experimento conduzido com extrato de novas larvas (2), conservados em nitrogênio líquido, seguindo a mesma metodologia utilizada no primeiro experimento, porém com tempo de digestão reduzido para 8 horas apresentou diferenças de digestibilidade, para as microcápsulas produzidas com AL e CA, comparadas ao ensaio com digestão de 24 horas.

A influência de possíveis fatores como a diferença de idade das larvas, entre o extrato larval (1) do primeiro ensaio e o extrato larval (2) do segundo ensaio, ou ainda o modo usado de conservação dos extratos (em freezer e nitrogênio líquido) podem ter causado alterações no nível de atividade enzimática e provocado os diferentes valores de digestibilidade obtidos.

A substituição do extrato enzimático pela enzima tripsina, ainda foi feita para verificar a capacidade de acesso da à proteína encapsulada. Os resultados mostraram-se próximos, não sendo entretanto, observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras.

Os valores de digestibilidade *in vitro* observados podem estar associados à dissolução e ou a hidratação das microcápsulas, facilitando o acesso das enzimas proteolíticas à proteína. O acesso das enzimas à proteína microencapsulada pode ter ocorrido pelos poros ou fissuras da cápsula, hidrolisando as macromoléculas de caseína em cadeias menores de peptídeos, capazes de atravessar e difundir-se livremente através da matriz e poros da microcápsula. Este ataque enzimático

observado pode estar relacionado as enzimas semelhantes a tripsina, já funcionais nas larvas da maioria das espécies de peixes (PERSON-LE RUYET, 1993; HERNANDEZ, 2003), ou ainda de enzimas não específicas encontradas no corpo larval.

Muitos autores como ALARCÓN, MOYANO, DÍAZ, FERNÁNDEZ-DÍAZ & YÚFERA (1999), GARCIA-ORTEGA et al. e YÚFERA (2000) realizaram estudos de digestibilidade *in vitro* utilizando larvas inteiras para obtenção do extrato como fonte de enzimas digestivas. Eles observaram que o uso da larva inteira pode apresentar desvantagens, pois enzimas proteolíticas do intestino podem interagir com outras enzimas encontradas nos tecidos e músculos e os resultados podem ser menos representativos da digestão intestinal.

O outro método utilizado, onde a digestibilidade foi determinada pela queda de pH, vem sendo utilizado na aquicultura (DIMES e HAARD, 1994; EZQUERRA et al., 1997;) devido a rapidez na estimativa da taxa de hidrólise da proteína e a boa correlação com resultados *in vivo* ($r^2=0,90$). Este método apresentou altos valores de digestibilidade para caseína encapsulada, não apresentando diferenças significativas ($p<0,05$) entre as amostras de AL, CA e PE. Esses valores de digestibilidade da caseína podem estar ainda subestimados, como pode ter acontecido com os resultados encontrados, anteriormente, por DIMES e HAARD (1994), que compararam estes valores com os resultados obtidos *in vivo*. Ensaio para verificar a reprodutibilidade do método também foram feitos com isolado protéico de soja (94,7% de proteína) e os resultados obtidos foram similares aos encontrados por LAZO et al.(1998).

Estudos posteriores mais detalhados como otimizar as condições de atividade enzimática (tempo de incubação, pH, relação substrato/enzima), determinar os inibidores enzimáticos e qualificar as possíveis enzimas presentes no extrato são necessários. O uso de enzimas específicas extraídas do pâncreas e estômago do peixe a ser estudado, também constituem um meio de melhorar a estimativa da digestibilidade, e assim obter boas correlações com resultados *in vivo*.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Entre os sistemas estudados, goma gelana formou gel sem a adição de íons cálcio nas concentrações estudadas, fato também observado para algumas concentrações de carragena. Todas as microcápsulas estudadas mostraram-se bastante insolúveis após a geleificação. Aumento da concentração polimérica ou da concentração iônica provocou aumento na densidade das cápsulas, observável pelo tempo de sedimentação, com maior efeito quando se aumentou a concentração iônica. Microcápsulas obtidas de misturas apresentaram o efeito preponderante de um dos componentes polissacarídicos.

O aparato de pulverização desenvolvido permite a confecção de microcápsulas de tamanhos variados de acordo com a finalidade de utilização. Quando bomba peristáltica foi utilizada, o tamanho variou de 1,5 a 2 mm medidos por estereoscópio. Em relação ao uso do capilar aspersor com alta pressão obteve-se uma distribuição de tamanho, utilizando óleo-resina de páprica como recheio, variando de 12 a 775 μm (microscopia ótica), com pelo menos 50% das cápsulas entre 100 a 300 μm , enquanto que as com recheio composto de caseína e gordura apresentaram variação entre 8 a 870 μm (*laser scattering*).

Com a incorporação de um recheio apolar as microcápsulas produzidas por geleificação iônica mostraram-se bem sucedidas na proteção da liberação do recheio devido a diferenças de polaridade. A introdução de proteína aquossolúvel também foi possível, porém requer a introdução de composto apolar (gordura) à formulação do recheio. A eficiência de encapsulação apresentou resultados satisfatórios com valores acima de 70% de encapsulação em relação à proteína adicionada no sistema.

Os diferentes polissacarídeos, embora produzindo microcápsulas pelo mesmo processo, apresentaram diferentes curvas de liberação da proteína testada. Comparações entre os tratamentos que não continham gordura, mostraram maior liberação para matriz de AL (100%) e a menor liberação para

matriz obtida da mistura ternária PE-GE-AL (10%). Os outros tratamentos envolvendo as matrizes de PE, GE, CA e GE-AL apresentaram perfis de liberação intermediários (20 a 40%) entre os máximos e mínimos observados. Os tratamentos com recheio composto de proteína e gordura, mostraram que a matriz de CA apresentou maior liberação (88%) e as matrizes de PE e GE apresentaram menor liberação proteica (<2%). Os tratamentos com as matrizes GE-AL e PE-GE-AL também apresentaram baixa taxa de liberação (15%). Os perfis de liberação observadas através das curvas de liberação mostraram um efeito “burst” inicial, onde maior inclinação das curvas foi observada.

A secagem por liofilização das microcápsulas contendo gordura-proteína foi eficiente mantendo a estrutura sólida sem excessivos rompimentos na matriz, o que determinou um comportamento de liberação da proteína, semelhante ao das cápsulas úmidas. Esse efeito pode ter sido determinado pela presença das gotas de gordura entremeadas na matriz polissacarídica das microcápsulas.

Os sistemas (AL, CA, PE e GE), compostos de caseína e gordura produziram microcápsulas com densidade próxima a da água o que acarretou uma dispersão das cápsulas por toda a coluna de água por um tempo superior a quatro horas, apresentando assim características de flutuabilidade adequadas aos requerimentos das larvas de peixe.

A observação da morfologia das microcápsulas através de microscopia de varredura laser confocal permitiu identificar a localização da gordura, da proteína e do polímero, permitindo o acesso a informações importantes para modular a liberação através das microcápsulas.

Embora existam diferenças nos valores de digestibilidade entre os diferentes métodos utilizados foi possível confirmar que a proteína encapsulada com polissacarídeos e gelificação iônica foi digerida em níveis consideráveis, mostrando potencialidade para os testes *in vivo*.

7. SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO

Considerando que esse projeto de tese faz parte de um projeto mais amplo, direcionado ao desenvolvimento de dietas microencapsuladas para alimentação de peixes em seus diversos estágios de crescimento, a continuidade do trabalho com o sistema microencapsulado produzido por gelificação iônica prevê novos trabalhos nos seguintes tópicos:

1. Aprofundar a caracterização físico-química dos polissacarídeos fornecendo maior sensibilidade aos diagramas de fase ($R \times$ concentração, $R = \text{COO}^- / \text{Ca}^{2+}$). Correlacionar a superfície gel do diagrama de fases com características de dureza instrumental, com a medida de liberação do recheio e a porosidade da microcápsula.
2. Além de proteínas de diferentes características moleculares ou com atividades fisiológicas específicas, introduzir outros compostos marcadores como peptídeos, vitaminas, aminoácidos e micronutrientes, associando-os às características de porosidade de cada sistema.
3. Desenvolver um planejamento experimental para estudar em profundidade diferentes formas de secagem e posterior caracterização das microcápsulas secas, incluindo perfil de liberação, estabilidade na amaranagem e capacidade de reidratação das mesmas.
4. Intensificar os teste *in vivo* com novas formulações de recheio e correlacionar com testes *in vitro*.
5. Produzir recheios modificados quimicamente, associados a marcadores fluorescentes ou radioativos e acompanhar as curvas de liberação e a ingestão *in vivo*, através dos compostos marcados .

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-HAMID, A.; BAKAR, J.; BEE, G. H. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*), **Food Chemistry**, Oxford, v.78, n.1, p.69-74, 2002.

AKESON, W. R. ; STAHMANN, M. A. Pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.83, n.3, p. 257-264, 1964.

ALARCÓN, F. J.; MOYANO, F. J.; DÍAZ, M.; FERNANDEZ-DÍAZ, C. YÚFERA, M. Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feeding of marine fish larvae using *in vitro* digestibility techniques. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, n.2, v.5, p.107-113, 1999.

ALARCON-LOPEZ, F. J.; Díaz-López, M.; Moyano-López, F. J.;García-Carreño, F. L.; Navarrete, M. A. Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. **Comparative Biochemistry And Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, New York,v.121, n.4, p. 369-377, 1998.

ALLAN, G. L.; PARKINSON, S. , BOOTH, M. A. , STONE, D. A. J. , ROWLAND, S. J. , FRANCES, J.; WARNER-SMITH, R. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: digestibility of alternative ingredients. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 186, n.3-4, p. 293-310, 2000.

ANDERSON, J.S.; LALL, S. P.; ANDERSON, D. M.; MCNIVEN, M. A. Evaluation of protein-quality in fish meals by chemical and biological assays. **Aquaculture**, Amsterdam, n.3-4, v.115, p. 305-325, 1993.

ANGER, H.; DONGOWSKI, G. Amidated pectins – characterization and enzymatic degradation, **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.2, n.5, p.371-379, 1988.

AOAC (Association of Official Analytical Chemistry), **Official methods of analysis**, 16th ed., Arlington, 1998, v.1-2.

BARRIE, J. A. **Diffusion in Polymers**. New York: ed by J. Crank and G. S. Park. Academic Press. p. 280-283, 1968.

BASSOMPIERRE, M.; KRISTIENSEN, H.R.; MCLEAN, E. Influence of weight upon in vitro protein digestion in rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, London, v.52, n.1, p. 213-216, 1998.

BAYLEY, S. T. X-ray and infrared studies of κ -carragenan. **Biochemical Biophysical Acta**, v.17, n.2 p. 194-205, 1955.

BLAKESLEY, R. W.; BOEZI, J. A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using brilliant blue G-250. **Analytical Biochemistry**, New York, v.82, n.2 p.580-582, 1977.

BOBBIO, P. A; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2ª ed. São Paulo: Varela, 1992. 143p.

BRUNSON, J.; ROMAIRE, R.; REIGH, R. Apparent digestibility of selected ingredients in diets for white shrimp *Penaeus setiferus* L. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, n.1, v.3, p. 9-16, 1997.

BUCHAL, M., LEVIN, J. E., LANGDON, C. Dulse *Palmaria mollis* as a settlement substrate and food for the red abalone *Haliotis rufescens*. **Aquaculture**, Amsterdam, v.165, n.3-4, p.246-260, 1998.

CABRAL, F. A. **Estudo cinético da invertase livre e imobilizada em alginato de cálcio**. Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1990. 164p.

CAHU, C. L.; ZAMBONINO INFANTE, J. L. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology**, New York, n.2, v. 109, p. 213–222, 1994.

CAIRNS P.; MILES, M. J.; MORRIS, V. J.; BROWNSEY, G. J. X-ray fiber-diffraction studies of synergistic, binary polysaccharide gels. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, n.15, v.160, p.411-423, 1987.

CARDOSO, F.S.N. **Produção de microencapsulados de amido com recobrimento em leite fluidizado**. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas. Campinas –SP, 2000. 55p.

CARTER, C. G. ; BRANSDEN, M. P. ; VAN BARNEVELD, R. J.; CLARKE, S. M. Alternative methods for nutrition research on the southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*: *in vitro* digestibility. **Aquaculture**, Amsterdam, n.1-4, v. 179, p. 57-70, 1999.

CHANDRASEKARAN, R.; RADHA, A.; THAILAMBAL, V. G. Roles of potassium-ions, acetyl and l-glyceryl groups in native gellan double helix - an x-ray study. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, n. 7, v.224, p.1-17, 1992.

CHARLIER, A; LECLERC, B; COUARRAZE, G. Release of mifepristone from biodegradable matrices: experimental and theoretical evaluations. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, n.1, v.200, p.115-120, 2000.

CHONG, A. S. C.; HASHIM, R.; ALI, A. B.; Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifazciata*) using *in vivo* and *in vitro* methods, **Aquaculture Nutrition**, Oxford, n.3, v.8, p. 229-238, 2002.

COPELAND, R. A. **Methods for protein analysis : a practical guide to laboratory protocols**. New York : Chapman & Hall. 228p, 1994.

COPPI, G.; IANNUCELLI, V.; LEO, E.; BERNABEI, M. T.; CAMERONI, R.; Protein immobilization in crosslinked alginate microparticles. **Journal Microencapsulation**, Oxon, v. 19, n. 19, p.37-44, 2002.

COTTRELL, I. W.; KOVACS, P. In: **Handbook of Water Soluble Gums and Resins**. New York: Ed. McGrawHill, 1980.

- CRANK, J. **The mathematics of diffusion**, Oxford: Claredon, 2thed, 414p. 1975.
- DAY, O. J. ;HOWELL, B. R. ; JONES, D. A. The effect of dietary hydrolysed fish protein concentrate on the survival and growth of juvenile Dover sole *Solea solea* L. during and after weaning. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 28, n.12, p. 911-921, 1997.
- DEA, I. C. M.; CLARK, A. H.; MCCLEARY, B. V. Effect of galactose-substitution-patterns on the interaction properties of galactomannans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.147, n.2, p.275-294, 1986.
- DIMES, L. E; HAARD, N. F. Estimation of protein digestibility .1. development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*salmo-gairdneri*). **Comparative Biochemistry And Physiology A-Physiology**, New York, n.2-3, v.108, p.349-362, 1994.
- DOUGLAS, J. A.; SEFTON, M. V. Permeability of EUDRAGIT and HEMA-MMA microcapsules to glucose and inuli. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, n.7, v.36, p.653-664, 1990.
- DREVETON, E.; MONOT, F.; LECOURTIER, J.; BALLERINI, D.; CHOPLIN, L. Influence of fermentation hydrodynamics on gellan gum physico-chemical characteristics. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.82, n.3, p.272-276, 1996.
- DUPUY, B.; GIN, H.; DUCASSOU, D.; AUBERTIN, J. *In situ* polymerization of a microencapsulating medium round living cells. **Journal Biomedical Materials Research**, New York, n.11, v.22, p.1061-1070, 1988.
- EZQUERRA, J. M.; GARCÍA-CARREÑO, F. L.; CARRILLO, O. *In vitro* digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 163, n.1-2, p.123-136, 1998.

EZQUERRA, J. M.; GARCÍA-CARREÑO, F. L.; CIVERA, R.; HAARD, N. F. pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture**, Amsterdam, n.3-4, v.157, p.251-262, 1997

FAISANT, N.; SIEPMANN, J. ; BERNOIT, J. P. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, n. 4, v.15, p.355-366, 2002.

FARKYE, N. Y.; KIELYY, L. J.; ALLSHOUSE, R. D.; KINDSTEDT, P. S. Proteolysis in mozzarella cheese during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.: n.74, p. 1433-1438, 1991.

FATTAH, E. A.; GRANT, D. J. W.; GABR, K. E.; MESHALI, M. M. Physical characteristics and release behaviour of salbutamol sulfate beads prepared with different ionic polysaccharides. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, n.6, v. 24, p.541-547, 1998.

FERNANDEZ, M. L.; SUN, D. M. ; TOSCA, M. A. ; NAMARA, D. J. Citrus pectin and cholesterol interact to regulate hepatic cholesterol homeostasis and lipoprotein metabolism: A dose response study in guinea pigs. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 59, n.4, p. 869-878, 1994.

FLYNN, G. L.; YALKOWSKY, S. H. ; ROSEMAN, T. Y. Mass-transport Phenomena and Models-theoretical Concepts. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 63, n.4, p. 479-510, 1974.

FOX, P. F. **Dairy Chemistry and Biochemistry**, Edrs P. F. Fox and L. H. McSweeney, London: Blackie Academic and Professional, 1998, 478p.

GARCIA-ORTEGA, A.; KOUSSOULAKI, A.; BOER, H.; VERRETH, J. *In vitro* protein digestibility of *Artemia* decapsulated cysts and nauplii, and of microbound diets for larval fish. **Aquaculture Research**, Oxford, v.31, n.5, p.475-477, 2000.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GARCIA-ORTEGA, A.; VERRETH, J. A. J.; COUTTEAU, P.; SEGNER, H.; HUISMAN, E. A.; SORGELOOS, P. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages, **Aquaculture**, Amsterdam, v. 161, n. 1-4, p. 501-514, 1998.

GIBSON, W; SANSELDON, G. R. Gellan gum. In: **Thickening and gelling agents for food**. 2nd edition. London. UK: Ed. Alan Imeson. 1997. 320p.

GLICKSMAN, M. Functional Properties of Hydrocolloids. In: **Food Hydrocolloids**. Florida, CRC Press, v. 1, p. 219, 1982.

GLICKSMAN, M. Gelling Hydrocolloids in Food Product Applications **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal- Journal de L Institut Canadien de Science et Technologie Alimentaires**, Ottawa, n. 1, v.12, p. A16, 1979.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F.; Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 31, n.3, p. 267-285, 1998.

GOMBOTZ, W.R, PETTIT, D.K. Biodegradable Polymers for Protein and Peptide Drug Delivery. **Bioconjugate Chemistry**, Washington, v.6, n.4, p.332-351, 1995.

GÖPFERICH, A. Bioerodible implants with programmable drug release. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.44, n.2-3, p.271-281, 1997.

GRABNER, M.; HOFER. An *in vitro* method for measuring protein digestibility of fish feed components. **Aquaculture**, Amsterdam, n. 2, v. 48, p. 97-110, 1985.

GRANT, G. T.; MORRIS, E. R.; REES, D. A.; SMITH, P. J. C.; THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the Egg-box Model. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.32, n.1, p.195-198, 1973.

GRASDALEN, H.; SMIDSROD, O. Gelation of gellan gum. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.7, n.5, p.371-391, 1987.

GRAY, C.J. e DOWSETT, J. Retention of insulin in alginate gel beads. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.31, n.6, p.607-612, 1988.

GRULKE, E. A.; SMITH, P. B.; DELASSUS, P. T.; ELLABOUDY, A. S.; DIEDERING, D. E.; LANDES, B. G.; ANDERSON, S. L. Solid-state NMR investigation of antiplasticization of polystyrene by mineral-oil. **Macromolecular Symposia**, Heidelberg, v.86, p.193-211, 1994.

GUNNING, A. P, MORRIS, V. J. Light-Scattering-Studies of Tetramethyl Ammonium Gellan **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v.12, n. 6, p. 338-341, 1990.

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**, Oxford, v.6, n.3, p. 153-158, 2000.

HAARD, N. F. Control of chemical-composition and food quality attributes of cultured fish. **Food Research International**, Essex, n.4, v.25, p. 289-307, 1992.

HANNOUN, B. J. M.; STEPHANOPOULOS, G. Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginates membranes. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.28, n.6, p.829-835, 1986.

HARDING, S. E. Dilute solution viscometry of food biopolymers, in **Functional Properties of Food Macromolecules**, Edrs. Hill, S. E.; Ledward, D. A. & Mitchell, J. R., Aspen Publishers, p.1-49, 1998.

HERNANDEZ, T. M. D. L. C. M. Morfofisiologia de los peces teleosteos de agua dulce. [http:// www.isch.edu.cu/biblioteca/anuario02](http://www.isch.edu.cu/biblioteca/anuario02), 15/10/2003.

HERMANSSON, A. M. Starch – A phase-separated biopolymer system in **Food Macromolecules and Colloids**, eds. S. E. Harding, S. E. Hill e Mitchell, ch.12, p.225-245, Nottingham, Nottingham University Press, 1995.

HSU, H.W.; VAVAK, D. L.; SATTERLEE, L. D.; MILLER, G. A. Multienzyme technique for estimating protein digestibility. **Journal of Food Science**, Chicago, n. 5, v.42, p. 1269-1273, 1977.

IKEGAMI, A; IMAI, N. Precipitation of polyelectrolytes by salts. **Journal of Polymer Science**, New York, v.56, n.163, p.133-142, 1962.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and the food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**. Londres, v.24, n.4, p.289-297, 1991.

JONES, D. A.; KAMARUDIM, N. M. S.; VAY, L. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. **Journal of World Aquaculture Society**, Banton, v.24, n.2, p.199-210, 1993.

KANG, K. S.; VEEDER, G. T.; MIRASSOUL, P. J.; KANEKO, T.; COTTRELL, I. W. Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v.43, n.5, p.1086-1091, 1982.

KIERSTAN M.; DARCY G.; REILLY J.; Studies on the characteristics of alginate gels in relation to their use in separation and immobilization Applications **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 24, n. 7, p. 1507-1517, 1982.

KIM, C. K.; LEE, E. J. The controlled release of blue dextran from alginate beads. **International Journal Pharmaceutical**, Amsterdam, v.79, n.1, p.11-19, 1992.

KING, A. H. Flavour encapsulation with alginates. In: **Flavour encapsulation**, Washington (DC): RISCH S. J. and Reineccius G. A. American Chemical Society , ch.13, p.122-125, 1988.

KOHN, R. Ion binding on polyuronates – Alginate and pectin. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 42, n.3, p. 371-397, 1975.

KOIDA, Y. ; TAKAHATA, H. ; KOBAYASHI, M. ; SAMEJIMA, M. Studies on dissolution mechanism of drug from ethylcellulose microcapsules. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 35, n.4, p. 1538-49, 1987.

KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v.200, n.1-2, p. 181-201, 2001.

KOLKOVSKI, S.; ARIELI, A.; TANDLER, A. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae **Aquaculture International**, London, v. 5 n. 6, p. 527-536,1997.

KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A. Why microdiets are still inadequate as a viable alternative to live zooplankters for developing marine fish larvae. In Lavens, P., Jaspers, E., Roelants, I. (Eds.), LAVI 95 – Fish and Shellfish Symp. Europ. **Aquaculture Socitey Special Publication.**, Gent, Begium, v. 24, p. 265-267, 1995.

KRISE, W. F.; MEADE, J. W. Review of the Intensive Culture of Walleye Fry **Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v. 48, n. 2, p. 81-89, 1986.

KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. The edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n.2, p.61-74. 1997.

KUBITZA, F. Preparo de rações e estratégias de alimentação no cultivo intensivo de peixes carnívoros. **Anais: Simpósio Internacional sobre Nutrição de Peixes e Crustáceos**, p. 91-115, 1995, Campos de Jordão – SP, Brasil.

KUROKAWA, T.; TANAKA, H.; KAGAWA, H.; OHTA, H. Absorption of protein molecules by the rectal cells in eel larvae *Anguilla japonica*. **Fisheries Science**, Tokyo, v.62, n.5, p. 832–833, 1996.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, 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**, London, v. 49, n.1, p. 1-9, 2000.

LANGDON, C. J.; LEVINE, D. M. & JONES, D. A. Microparticulate feeds for marine suspension-feeders. **Journal Microencapsulation**, Oxon, v.2, n.1, p.1-11, 1985.

LAZO, J. P.; ROMAIRE, R. P.; REIGH, R. C. Evaluation of three *in vitro* enzyme assays for estimating protein digestibility in the pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Banton, v.29, n.4, p.441-450, 1998.

LIMA, H. O. S. **Estudo da encapsulação de fármacos de primeira linha no tratamento da tuberculose em ciclodextrinas e lipossomas**. Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Campinas. Campinas –SP, 2001, 173p.

LIU, L-S.; LIU, S-Q.; NG, S.Y.; FROIX, OHNO, T. and HELLER, J. Controlled release of interleukin-2 for tumor immunotherapy using alginate/chitosan porous microspheres. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.43, n.1, p.65-74, 1997.

LOPEZ-ALVARADO, J., LANGDON, C. J., TESHIMA, S., KANAZAWA, A. Effects of coating and encapsulation of crystalline amino acids on leaching in larval feeds. **Aquaculture**, Amsterdam, n.122, n.4, p.335-346, 1994.

MADEKA, H. and KOKINI, J. L. Effect of glass transition and cross-linking on rheological properties of zein: development of a preliminary state diagram. **Cereal Chemistry**, Saint Paul; v.73, n.4, p.433-438, 1996.

MARTINSEN, A.; SKJÄK-BRAEK, G.; SMIDSRØD, O.; Alginate as Immobilization Material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 33, n.1, p. 79-89, 1989.

MARTINSEN, A.; STRØD, I. ; SKJÄK-BRAEK, G. Alginate as immobilization material: II. Diffusion Properties. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 39, n.2, p. 186-194, 1992.

MAY, C. D. Pectins In: **Thickening and gelling agents for food**. 2nd edition. London. UK: Ed. Alan Imeson. 1997. 320p.

McGOOGAN, B. B.; REIGH, R. C. Apparent digestibility of selectd ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 141, n.3-4, p. 233-244, 1996.

MESTDAGH, M. M.; AXELOS, M. A. V. Physico-chemical properties of polycarboxylate gel phase and their incidence on the retention/release of solutes. **Biopolymer Science: Food and Non-food Applications**, Montpellier, p.303-314. 1998,.

MORRIS, E. R.; REES, D. A.; ROBINSON, G. Cation-specific aggregation of carrageenan helices - domain model of polymer gel structure. **Journal of Molecular Biology**, London, v.138, n.2, p.349-362, 1980.

MORRIS, V. J. Gelation of polysaccharides. In **Functional Properties of Food Macromolecules**, Maryland: HILL, S. E.; LEDWARD, D. A.; MITCHELL, J. R, Aspen publication 2th ed, ch. 4, p. 143-226, 1998.

MORRIS, V. J. Synergistic interactions with galactomannans and glucomannans in **Functional Properties of Food Macromolecules**, Edrs. S. E. Hill, S.E. Harding e J.R. Mitchell, Nottingham, Nottingham University Press, ch.14, p.289-314, 1995.

MOYANO, F. J.; SAVOIE, L. Comparison of in vitro systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v.128, n.2, p. 359-368. 2001.

NAKAMURA, S.; TAKO, M. Synergistic interaction between kappa-carrageenan and locust-bean gum in aqueous-media. **Agricultural And Biological Chemistry**, Tokyo, v. 50, n.11, p.2817-2822. 1986.

NETO, B. B.; SCARMINIO, S. I.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2001. 401p.

NICKUM, J.G.; SHEAFFER, W.A. Backwater areas as nursery habitats for fishes in pool-13 of the upper Mississippi river. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 136, n.6, p. 131-139, 1986.

NUSSINOVITCH, A. Pectins. In: **Hydrocolloid applications – Gum technology in the food and other industries**. First edition. London. UK : Ed. Chapman & Hall, 2-6 Boundary row. 1997. 354p.

OKHAMAFE, A. O.; AMSDEN, B.; CHU, W.; GOOSEN, M. F. A. Modulation of protein release from chitosan-alginate microcapsules using the pH-sensitive polymer hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate. **Journal of Microencapsulation**, Oxon, v.13, n.5, p.497-508, 1996.

ONSOYEN, E. Alginates In: **Thickening and gelling agents for food**. Second edition. London: Ed. Alan Imeson. 1997. 320p.

OSTBERG, T. & GRAFFNER, C. Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration. III. Influence of calcium concentration, amount of drug added and alginate characteristics on drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.111, n.3, p. 271-282, 1994.

PAPADOKOSTAKI, K. G.; AMARANTOS, S. G.; PETROPOULOS, J. H. Kinetics of release of particulate solutes incorporated in cellulosic polymer matrices as a function of solute solubility and polymer swellability. I. Sparingly soluble solutes **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v.67, n.2, p.277-287, 1998.

PEDROSA-ISLAS, R.; Alimentos microencapsulados: Particularidades de los Procesos para la Microencapsulación de Alimentos para Larvas de Especies Acuícolas. **Memórias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola**. p.438-447, 2002, Cancún - Quintana Roo, México.

- PEDROZA-ISLAS R., ALVAREZ-RAMÍREZ, J., VERNON-CARTER, E. J. Using biopolymer blends for shrimp feed-stuff microencapsulation. II. Dissolution and floatability kinetics as selection criteria. **Food Research International**, Essex, v.33, n.2, p.119-124, 2000.
- PEDROZA-ISLAS, VERNON-CARTER, E. J.; DURAN-DOMINGUEZ, C. Using biopolymer blends for shrimp feed-stuff microencapsulation. I. Particle size, morphology and microstructure of microcapsules. **Food Research International**, Essex, v.32, n.5, p.367-374, 1999.
- PERSON-LE RUYET, J. Early weaning of marine fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. **Advances in Tropical Aquaculture**, v.9, p.625-642, 1989
- PERSON-LE RUYET, J. , ALEXANDRE, J. C. , THEBAUD, U., MUGNIER, C. Marine fish larvae feeding formulated diets or live prey **Journal of World Aquaculture Society**, Banton, v. 24, n.2, p. 211-224, 1993.
- 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 Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.32 , n. 7, p. 731-737, 1997.
- PICULELL, L.; NILSON, S.; STROM, P. On the specificity of the binding of cations to carrageenans - counterion nmr-spectroscopy in mixed carrageenan systems. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, n. 1, v.188, p.121-135, 1989.
- POLK, A.; AMSDEN, B.; DE YAO, K.; PENG, T.; GOOSEN, M. F. A.; Controlled Release of Albumin from Chitosan-Alginate Microcapsules. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.83 n.2, p.178-185, 1994.
- RAO, M. V. R. M.; YASEEN, M. Determination of intrinsic-viscosity by single specific viscosity measurement. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v.31, n.8, p.2501-2508, 1986.

REES, D. A. Polysaccharide conformation in solutions and gels – recent results on pectins. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.2, n.4, p.254-263, 1982.

REID, W. A.; BRANCH, T.; THOMPSON, W. D.; KAY, J. The effect of diffusion on the immunolocalization of antigen. **Histopathology**, Oxford, v.11, n.12, p.1277-1284, 1987.

REINECCIUS, G. A. Controlled release techniques in food industry, in Encapsulation and controlled release of food ingredients, Reineccius, G.A., Risch, S.J., EDS. Acs Symposium series n° 590. **Journal of American Chemical Society**, Washington, DC, 1995.

RHA, C.; PRADIPASENA, P. Viscosity of proteins, in **Functional Properties of Food Macromolecules**, London, EDR. J.R. Mitchell e D. A. Ledward, Elsevier Applied Science Publishers, ch.2, p.79-120, 1986.

RICH, N.; SATTERLEE, L. D; SMITH, J. L. Comparison of *in vivo* apparent protein digestibility in man and rat to *in vitro* protein digestibility as determined using human and rat pancreatins and commercially available proteases. **Nutrition Reports International**, Los Altos, v.21, n.2, p.285-300, 1980.

ROCHA, W. S. **Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose**. Dissertação - Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2001, 104p.

ROCHAS, C. & RINAUDO, M. Mechanism of gel formation in kappa-carrageenan. **Biopolymers**, New York, n.4, v.23, p.735-745, 1984.

RODRIGUES. F. Viscous Flow, in **Principles of polymers**. New York: Hemisphere, third edition, 575p, 1982.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, Oxford , v. 38, n.5, p.1288-1294, 1990.

ROSENBERG, M.; YOUNG, S. L. Whey proteins as microencapsulation agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat – structure evaluation. **Food Structure**, Chicago, v.12, n.1, p.31-41, 1993.

ROZAN, P.; LAMGHARI, R.; LINDER, M.; VILLAUME, C.; FANNI, J.; PARMENTIER, M.; MEJEAN, L.; et al. *In vivo* and *in vitro* digestibility of soybean, lupine, and rapeseed meal proteins after various technological processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 5, v.45, p.1762-1769, 1997.

SAKAMOTO, M.; HOLLAND, D. L.; JONES, D. A. Modification of the nutritional composition of *Artemia* by incorporation of polyunsaturated fatty acids using microcapsulated diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v.28, p.311-320, 1992.

SANDERSON, G. R.; BELL, V. L.; ORTEGA, D. A comparison of gellan gum, agar, K-carragenan and algin. **Cereal Foods World**, Mineapolis, v.34, n.12, p.991-1033, 1989.

SATTERLEE, L. D.; MARSHALL, H. F.; WALLACE, G. W. Prediction of protein digestibility by an *in vitro* procedure using human, porcine, and rat pancreatin preparations. **Nutrition Reports International**, Los Altos, n.6, v.19, p. 901-913, 1979.

SCHREIBER, A. B.; HAIMOVICH, J. Quantitative fluorometric assay for detection and characterization of FC-receptors. **Methods In Enzymology**, New York, v.93, part F, p.147-155, 1983.

SEDMAK, J. J.; GROSSBERG, S. E. Rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**, New York, , v.79, n.1-2, p.544-552, 1977.

SEGNER, H.; ROSCH, R.; SCHIDT, H.; VON POEPPINGHAUSEN, K. J. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. **Journal of Fish Biology**, London, v, 35, n.2, p. 249-263, 1989.

SEZER, A. D.; AKBUGA, J. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: I. Sustained release of a macromolecular drug from chitosan treated alginate beads. **Journal of Microencapsulation**, Oxon, v.16, n.2, p.195-203, 1999.

SLADE, L.; LEVINE, H.; FINLEY J.W. **Protein-water interactions: water as plasticizer of gluten and other protein polymers** In: Protein quality and the effects of processing. D.Phillips, Finley, Marcell Dekker :NY. p. 9-124, 1989.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.33, n.6, p. 501-547, 1993.

SHALABI, S. I.; FOX, P. F. Eletrophoretic analysis of cheese: Comparison of methods. **Journal of Food Science and Technology**, Chicago, v.11, n.2, p.135-151, 1987.

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T. Microentrapment of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.3, p.557-561, 1993.

SHIPTON, T. A. & BRITZ, P. J. Evaluation of an *in vitro* digestibility technique for the prediction of protein digestibility in the South African abalone, *Haliotis midae* L. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, n. 1, v.8, p. 15-21, 2002.

SMIDSROD, O & HAUG, A. Estimation of relative stiffness of molecular chain in polyelectrolytes from measurements of viscosity at different ionic strengths **Biopolymers**, n.7, v.10, p. 1213, 1971.

SMIDSROD, O. The relative extension of alginates having different chemical composition. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.27, n.1, p.107-118, 1973.

SMIDSROD, O. Solution properties of alginate. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.13, n.3, p.359. 1970.

SMIDSROD, O.; GRANSDALEN, H. Gelation of gellan gum. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.7, n.4, p.371-393, 1987.

SMIDSROD, O.; HAUG, A. A light scattering study of alginate. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, v.22, n.3, p.797-802, 1968.

SOUTHWEST RESEARCH INSTITUTE. **A capability statement for microencapsulation**. San Antonio. 31p, 1991.

SPIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, n.2-3, v.48, p.139-157, 2001.

SRIVASTAVA, S. A.; KUROKAWA, T.; SUZUKI, T. mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v.132, n.3, p. 629-635, 2002.

STANLEY, D. W. ; XU, S.Y.; GOFF, H. D.; DAVIDSON, V. J.; LEMAGUER, M. Hydrocolloid milk gel formation and properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.1, p.96-102, 1992.

STOSCHECK, C. M. Quantitation of protein. **Methods In Enzymology**, New York, v,182, p.50-68, 1990.

TANAKA, H.; MATSUMURA, M.; VELIKY, I. A. Diffusion characteristics of substrates in ca-alginate gel beads. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.26, p.53-58, 1984.

THIES, C A survey of Microencapsulation processes. In **Microencapsulation**. (ed. Por S. Benita), Marcel Dekker, New York, p. 1-20, 1996.

THIES, C. A. Gelation. How to make microcapsules combined lecture and laboratory manual. In: **Thies Technology**, ch.8, Saint Louis. Missiouri, 1995.

THOM, D.; DEA, I. C. M.; MORRIS, E. R.; POWELL, D. A. Interchain associations of alginate and pectins. **Progress In Food and Nutrition Science**, Oxford, v.6, n.1-6, p.97-108, 1982.

THOMAS, W. R. Carragenan. In: **Thickening and gelling agents for food**. 2nd edition. London, UK.: By Alan Imeson. 1997. 320p.

TOMIDA, H.; NAKAMURA, C.; YOSHITOMI, H. KIRYU, S. Preparation of theophylline- Loaded calcium alginate gel capsules and evaluation of drug release characteristics. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.41 , n. 12, p.2161-2165, 1993.

TREVISAN, H. C. **Imobilização de glicose oxidase em suportes sílicos**. Campinas. Dissertação - Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. p. 1990. 111p.

VEELKEN, M., PAPE, H. Production of nikkomycin by immobilized streptomyces cells – Physiological Properties. **Applied Microbiology. Biotechnology.**, v.19, n.3, p. 146-152, 1984.

VELINGS, N.M.e MESTDAGH, M.M. Physico-chemical properties of alginate gel beads. **Polymer Gels and Network**, v.3, n.3, p.311-330, 1995.

VERRETH, J. ; TOREELE, E. ; SPAZIER, E. ; SLUISZEN, A. V. D. ; ROMBOUT, J. ; BOOMS, R. ; SEGNER, H. Development of a functional digestive system in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). **Journal Aquaculture Society**, n.3, v.23, p. 286- 298, 1992.

VILLAMAR, D. F.; LANGDON, C. J.; Delivery of dietary components to larval shrimps (*Penaeus vannamei*) by means of complex microcapsules. **Marine Biology**, New York, v.115, n.4, p. 635-642, 1993.

- WALFORD J.; LAM, T. J. Development of digestive-tract and proteolytic-enzyme activity in sea-bass (*Lates-calcarifer*) larvae and juveniles. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 109, n. 2, p.187-205, 1992.
- WHISTLER, R. L., BEMILLER, J. N., **Industrial gums**, 3rd ed., Academic Press, New York, 1993.
- WILLAERT, R. G.; BARON, G. V. Gel entrapment and micro-encapsulation: Methods, applications and engineering principles. **Reviews in Chemical Engineering**, London, v. 12, n. 1-2, p. 5-205, 1996.
- WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. In **Food Polysaccharides and Their Applications**, New York, Eds. A. M. Stephen e M. Dekker, ch.14., p.463, 1995.
- WONG, T .W. et al. Release characteristics of pectin microspheres prepared by an emulsification technique. **Journal Microencapsulation**, Oxon, v.19, n.4, p. 511-522, 2002.
- YUGUCHI, Y.; THUY, T. T. T.; URAKAWA, H.; KAJIWARA, K. Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentration dependence. **Food Hydrocoloids**, Oxford, v.16, n.6, p. 515-522, 2002.
- YÚFERA, M., SARASQUETE, M. C. & FERNÁNDEZ-DÍAZ, C. Testing protein-walled microcapsules for the rearing of first-feeding gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). **Larvae Marine and Freshwater Research**, Victoria, v.47, n.2, p. 211-216. 1996.
- YÚFERA, M.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C. .; PASCUAL, E.; SARASQUETE, M. C.; MOYANO, F. J.; DÍAZ, M.; ALARCÓN, F. L.; GARCIA-GALLEGO, M. & PARRA, G. Towards an inert diet for first-feeding gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v.6, n.3, p.143-152, 2000.
- YÚFERA, M.; KOLKOVSKI, S.; FERNANDEZ-DIAZ, C.; DABROWSKI, K.; THIES, C. Microencapsulated diets for fish larvae – current “State of the art”.

Biocapsulation VII and Mini Symposium on microencapsulation - Eanston, Maryland, USA 1998.

YÚFERA, M.; PASCUAL, E.; FERNÁNDEZ-DIAZ, C. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v.117, n.1-4, p. 249-256, 1999.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J.; Determinação de Proteínas Totais via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes. **Química Nova**, São Paulo, v.21, n.6, p.787-793, 1998.

ZYGOURAKIS K. Development and temporal evolution of erosion fronts in bioerodible controlled release devices **Chemical Engineering Science**, New York, v. 45, n.8, p. 2359-2366, 1990.

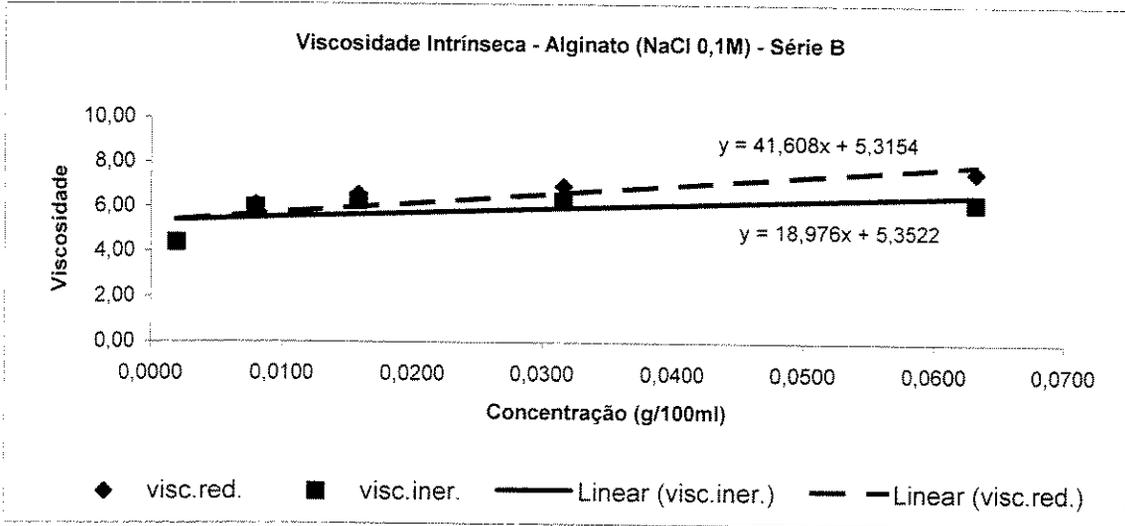
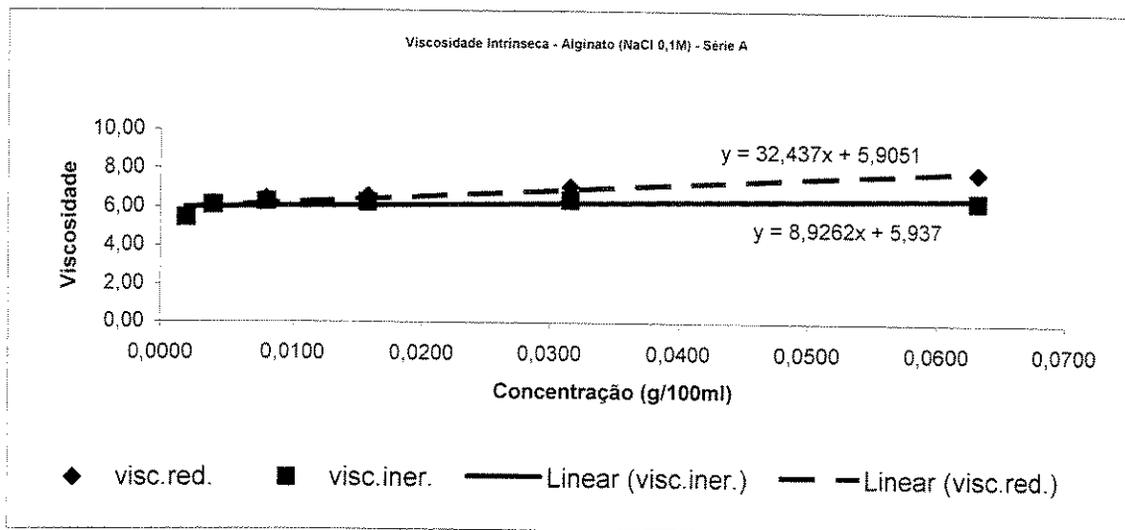
ANEXO 1

**VISCOSIDADE INTRÍNSECA E MASSAS MOLECULARES DO ALGINATO, DA
PECTINA E DA GOMA GELANA.**

ALGINATO - MASSA MOLECULAR

Série A		
conc.	visc.red.	visc.iner.
0,0020	5,47	5,44
0,0039	6,15	6,07
0,0079	6,40	6,24
0,0158	6,56	6,24
0,0316	7,06	6,37
0,0631	7,83	6,36

Série B		
conc.	visc.red.	visc.iner.
0,0020	4,40	4,38
0,0079	6,09	5,94
0,0158	6,54	6,22
0,0316	6,93	6,27
0,0631	7,62	6,22



	[η] (100ml/g)	
Série A	5,91	5,92
Série B	5,32	5,33

Para o alginato a massa molecular pode ser calculada pela fórmula: $[\eta] = 2 \times 10^{-5} \times Mw^{1,0}$

Mw =	296,05 kDa	para Série A
	266,69 kDa	para Série B

VISCOSIDADE INTRÍSECA - ALGINATO EM SOL. NaCl 0,1M **SÉRIE A**

Tempos de escoamento e densidade das soluções

SOLUÇÃO 1				pic+am	pic vazio	massa	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)					
1	32	29	92,29	54,6551	21,9580	32,6971	32,4837	1,0066
1	32	18	92,18	54,6568	21,9580	32,6988	32,4837	1,0066
1	32	18	92,18	54,6528	21,9580	32,6948	32,4837	1,0065
1	32	18	92,18	54,6557	21,9580	32,6977	32,4837	1,0066
1	32	23	92,23	54,6534	21,9580	32,6954	32,4837	1,0065
1	32	22	92,22					
1	32	22	92,22					
				média				
				92,22				
				d.pad				
				0,04	média	32,6968		1,0066
					d.pad	0,0016		0,0001

SOLUÇÃO 2				pic+am	pic vazio	massa	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)					
1	15	47	75,47	54,6495	21,9580	32,6915	32,4837	1,0064
1	15	53	75,53	54,6528	21,9580	32,6948	32,4837	1,0065
1	15	34	75,34	54,6501	21,9580	32,6921	32,4837	1,0064
1	15	34	75,34	54,6511	21,9580	32,6931	32,4837	1,0064
1	15	44	75,44	54,6524	21,9580	32,6944	32,4837	1,0065
1	15	54	75,54					
1	15	47	75,47					
				média				
				75,47				
				d.pad				
				0,07	média	32,6932		1,0064
					d.pad	0,0014		0,0000

SOLUÇÃO 3				pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)					
1	8	3	68,03	54,6478	21,9580	32,6898	32,4837	1,0063
1	8	15	68,15	54,6484	21,9580	32,6904	32,4837	1,0064
1	8	15	68,15	54,6488	21,9580	32,6908	32,4837	1,0064
1	8	15	68,15	54,6493	21,9580	32,6913	32,4837	1,0064
1	8	15	68,15	54,6484	21,9580	32,6904	32,4837	1,0064
1	8	12	68,12					
1	8	8	68,08					
				média				
				68,11				
				d.pad				
				0,05	média	32,6905		1,0064
					d.pad	0,0006		0,0000

SOLUÇÃO 4				pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)					
1	4	73	64,73	54,6496	21,9580	32,6916	32,4837	1,0064
1	4	81	64,81	54,6488	21,9580	32,6908	32,4837	1,0064
1	4	81	64,81	54,6487	21,9580	32,6907	32,4837	1,0064
1	4	84	64,84	54,6469	21,9580	32,6889	32,4837	1,0063
1	4	88	64,88	54,6477	21,9580	32,6897	32,4837	1,0063
1	4	81	64,81					
1	5	0	65,00					
				média				
				64,85				
				d.pad				
				0,09	média	32,6903		1,0064
					d.pad	0,0011		0,0000

SOLUÇÃO 5				pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)					
1	3	19	63,19	54,6435	21,9580	32,6855	32,4837	1,0062
1	3	21	63,21	54,6429	21,9580	32,6849	32,4837	1,0062
1	3	21	63,21	54,6442	21,9580	32,6862	32,4837	1,0062
1	3	28	63,28	54,6423	21,9580	32,6843	32,4837	1,0062
1	3	25	63,25	54,6436	21,9580	32,6856	32,4837	1,0062
1	3	23	63,23					
1	3	25	63,25					
				média				
				63,24				
				d.pad				
				0,03	média	32,6853		1,0062
					d.pad	0,0007		0,0000

SOLUÇÃO 6					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	2	50	62,50	média 62,41	54,6426	21,9580	32,6846	32,4837	1,0062
1	2	35	62,35		54,6421	21,9580	32,6841	32,4837	1,0062
1	2	47	62,47		54,644	21,9580	32,6860	32,4837	1,0062
1	2	29	62,29		54,6422	21,9580	32,6842	32,4837	1,0062
1	2	43	62,43		54,6428	21,9580	32,6848	32,4837	1,0062
1	2	39	62,39		d.pad 0,08		média 32,6847		1,0062
						d.pad 0,0008			0,0000

SOLUÇÃO SALINA (NaCl 0,1M)					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	1	51	61,51	média 61,57	54,6451	21,9580	32,6871	32,4837	1,0063
1	1	57	61,57		54,6434	21,9580	32,6854	32,4837	1,0062
1	1	67	61,67		54,6428	21,9580	32,6848	32,4837	1,0062
1	1	47	61,47		54,6438	21,9580	32,6858	32,4837	1,0062
1	1	60	61,60		54,6429	21,9580	32,6849	32,4837	1,0062
1	1	58	61,58		d.pad 0,07		média 32,6856		1,0062
						d.pad 0,0009			0,0000

AGUA					pic+am	pic vazio	amostra	densid*	vol. Pic
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	1	17	61,17	média 61,22	54,5085	21,9580	32,5505	0,9980	32,4855
1	1	32	61,32		54,5073	21,9580	32,5493	0,9980	32,4843
1	1	29	61,29		54,5061	21,9580	32,5481	0,9980	32,4831
1	1	19	61,19		54,506	21,9580	32,5480	0,9980	32,4830
1	1	19	61,19		54,5056	21,9580	32,5476	0,9980	32,4826
1	1	17	61,17		d.pad 0,07		média 32,5487		32,4837
						d.pad 0,0012			0,0012

VISCOSIDADE INTRÍSECA - ALGINATO EM SOL. NaCl 0,1M **SÉRIE B**

Tempos de escoamento e densidade das soluções

SOLUÇÃO 1					pic+am	pic vazio	massa	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	31	37	91,37	média 91,41	54,6538	21,9580	32,6958	32,4837	1,0065
1	31	50	91,50		54,6551	21,9580	32,6971	32,4837	1,0066
1	31	54	91,54		54,6535	21,9580	32,6955	32,4837	1,0065
1	31	29	91,29		54,6557	21,9580	32,6977	32,4837	1,0066
1	31	40	91,40		54,6546	21,9580	32,6966	32,4837	1,0066
1	31	36	91,36		d.pad 0,09		média 32,6965		1,0066
						d.pad 0,0009			0,0000

SOLUÇÃO 2					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	15	22	75,22	média 75,22	54,6511	21,9580	32,6931	32,4837	1,0064
1	15	14	75,14		54,6519	21,9580	32,6939	32,4837	1,0065
1	15	21	75,21		54,6529	21,9580	32,6949	32,4837	1,0065
1	15	30	75,30		54,6501	21,9580	32,6921	32,4837	1,0064
1	15	24	75,24		54,6500	21,9580	32,6920	32,4837	1,0064
1	15	22	75,22		d.pad 0,05		média 32,6932		1,0064
						d.pad 0,0012			0,0000

SOLUÇÃO 3					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	8	13	68,13	média 68,10 d.pad 0,05	54,6497	21,9580	32,6917	32,4837	1,0064
1	8	2	68,02		54,6499	21,9580	32,6919	32,4837	1,0064
1	8	13	68,13		54,6498	21,9580	32,6918	32,4837	1,0064
1	8	8	68,08		54,6502	21,9580	32,6922	32,4837	1,0064
1	8	16	68,16		54,6476	21,9580	32,6896	32,4837	1,0063
1	8	5	68,05			média	32,6914		1,0064
						d.pad	0,0010		0,0000

SOLUÇÃO 4					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	4	65	64,65	média 64,70 d.pad 0,07	54,6449	21,9580	32,6869	32,4837	1,0063
1	4	72	64,72		54,6446	21,9580	32,6866	32,4837	1,0062
1	4	79	64,79		54,6424	21,9580	32,6844	32,4837	1,0062
1	4	69	64,69		54,6445	21,9580	32,6865	32,4837	1,0062
1	4	60	64,60		54,6459	21,9580	32,6879	32,4837	1,0063
1	4	75	64,75			média	32,6865		1,0062
						d.pad	0,0013		0,0000

SOLUÇÃO 5					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	3	74	63,74	média 63,85 d.pad 0,10	54,6419	21,9580	32,6839	32,4837	1,0062
1	3	88	63,88		54,6429	21,9580	32,6849	32,4837	1,0062
1	3	90	63,90		54,6442	21,9580	32,6862	32,4837	1,0062
1	3	73	63,73		54,6435	21,9580	32,6855	32,4837	1,0062
1	3	87	63,87		54,6435	21,9580	32,6855	32,4837	1,0062
1	3	87	63,87			média	32,6852		1,0062
1	4	0	64,00			d.pad	0,0009		0,0000

SOLUÇÃO 6					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	2	31	62,31	média 62,28 d.pad 0,09	54,6423	21,9580	32,6843	32,4837	1,0062
1	2	39	62,39		54,6442	21,9580	32,6862	32,4837	1,0062
1	2	35	62,35		54,6406	21,9580	32,6826	32,4837	1,0061
1	2	19	62,19		54,6455	21,9580	32,6875	32,4837	1,0063
1	2	19	62,19		54,6439	21,9580	32,6859	32,4837	1,0062
1	2	15	62,15			média	32,6853		1,0062
1	2	26	62,26			d.pad	0,0019		0,0001

SOLUÇÃO SALINA (NaCl 0,1M)					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	1	86	61,86	média 61,91 d.pad 0,07	54,6451	21,9580	32,6871	32,4837	1,0063
1	1	95	61,95		54,6434	21,9580	32,6854	32,4837	1,0062
1	1	84	61,84		54,6428	21,9580	32,6848	32,4837	1,0062
1	1	96	61,96		54,6438	21,9580	32,6858	32,4837	1,0062
1	1	87	61,87		54,6429	21,9580	32,6849	32,4837	1,0062
1	1	87	61,87			média	32,6856		1,0062
1	2	0	62,00			d.pad	0,0009		0,0000

AGUA					pic+am	pic vazio	amostra	densid*	vol. Pic
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	1	84	61,84		54,5085	21,9580	32,5505	0,9980	32,4855
1	1	81	61,81		54,5073	21,9580	32,5493	0,9980	32,4843
1	1	73	61,73		54,5061	21,9580	32,5481	0,9980	32,4831
1	1	86	61,86	média	54,506	21,9580	32,5480	0,9980	32,4830
1	1	68	61,68	61,80	54,5056	21,9580	32,5476	0,9980	32,4826
1	1	89	61,89	d.pad		média	32,5487		32,4837
				0,08		d.pad	0,0012		0,0012

* densidade obtida da tab.de propriedades termodinâmicas da água saturada a 22oC (Incropera, 1992)

ALGINATO

Cálculo da viscosidade reduzida e inerente para determinação da viscosidade intrínseca

Série A				η rel		η sp		η red		η iner	
conc.	Esc. (seg)	dens (g/ml)	η	H2O	salina	H2O	salina	H2O	salina	H2O	salina
ÁGUA	61,51	0,9980	0,9208								
SALINA	61,74	1,0062	0,9318								
0,0020	62,41	1,0062	0,9419	1,02	1,0108	0,02	0,0108	11,59	5,47	11,46	5,44
0,0039	63,24	1,0062	0,9544	1,04	1,0242	0,04	0,0242	9,25	6,15	9,08	6,07
0,0079	64,85	1,0064	0,9789	1,06	1,0505	0,06	0,0505	7,99	6,40	7,75	6,24
0,0158	68,11	1,0064	1,0282	1,12	1,1034	0,12	0,1034	7,39	6,56	6,99	6,24
0,0316	75,47	1,0064	1,1393	1,24	1,2226	0,24	0,2226	7,52	7,06	6,75	6,37
0,0631	92,22	1,0066	1,3924	1,50	1,4942	0,50	0,4942	7,89	7,83	6,40	6,36

Série B				η rel		η sp		η red		η iner	
conc.	Esc. (seg)	dens (g/ml)	η	H2O	salina	H2O	salina	H2O	salina	H2O	salina
ÁGUA	61,51	0,9980	0,9208								
SALINA	61,74	1,0062	0,9318								
0,0020	62,28	1,0062	0,9399	1,02	1,0087	0,02	0,0087	10,51	4,40	10,40	4,38
0,0039	63,85	1,0062	0,9638	1,05	1,0342	0,05	0,0342	11,82	8,68	11,55	8,54
0,0079	64,70	1,0062	0,9766	1,06	1,0480	0,06	0,0480	7,67	6,08	7,45	5,94
0,0158	68,10	1,0064	1,0280	1,12	1,1031	0,12	0,1031	7,37	6,54	6,98	6,22
0,0316	75,22	1,0064	1,1356	1,23	1,2187	0,23	0,2187	7,39	6,93	6,64	6,27
0,0631	91,41	1,0066	1,3801	1,50	1,4811	0,50	0,4811	7,90	7,62	6,41	6,22

ALGINATO

Concentração das Soluções

Série A	
Massa de Alginato	0,5008
Massa da Solução	100,04
Densidade da sol.	1,0085
Volume da solução	99,20
Concentração da solução inicial g/100ml sol	0,5048
	g/100g sol
sol 8	0,00197
sol 7	0,00394
sol 6	0,00789
sol 5	0,01578
sol 4	0,03155
sol 3	0,06310
sol 2	0,12620
sol 1	0,25241

Série B	
Massa de Alginato	0,5009
Massa da Solução	100,07
Densidade da sol.	1,0085
Volume da solução	99,22
Concentração da solução inicial g/100ml sol	0,5048
	g/100g sol
sol 8	0,00197
sol 7	0,00394
sol 6	0,00789
sol 5	0,01578
sol 4	0,03155
sol 3	0,06310
sol 2	0,12621
sol 1	0,25242

densidade	g/ml
H ₂ O 22°C	0,998004

Densidade das soluções iniciais

Série A

pic+am	pic vazio	massa	volume	densidade
54,7154	21,9580	32,7574	32,4837	1,0084
54,7162	21,9580	32,7582	32,4837	1,0084
54,7185	21,9580	32,7605	32,4837	1,0085
54,7163	21,9580	32,7583	32,4837	1,0085
54,7154	21,9580	32,7574	32,4837	1,0084
	média	32,7584		1,0085
	d.pad	0,0013		0,0000

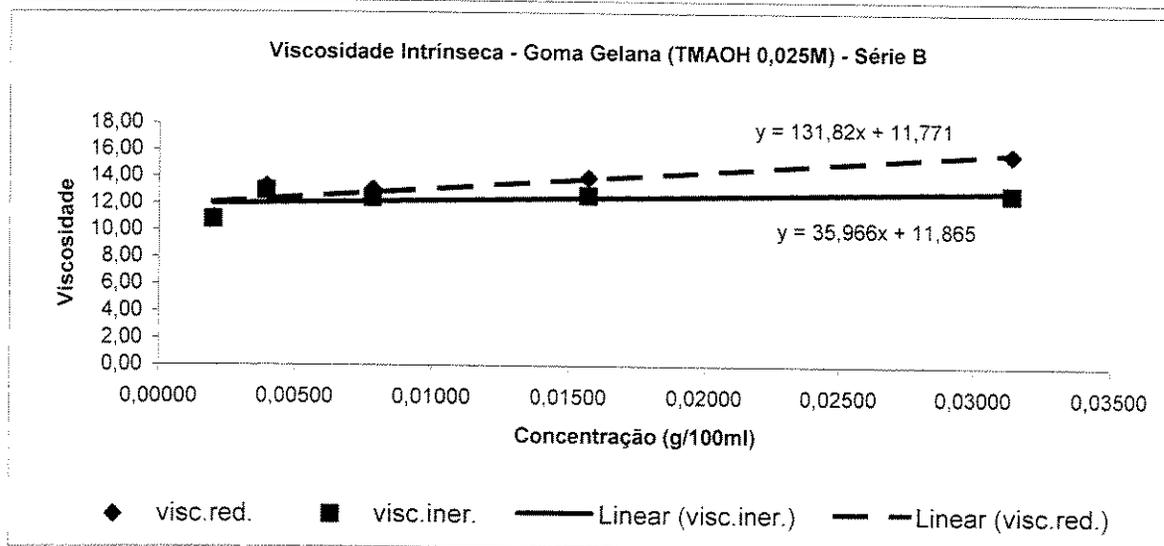
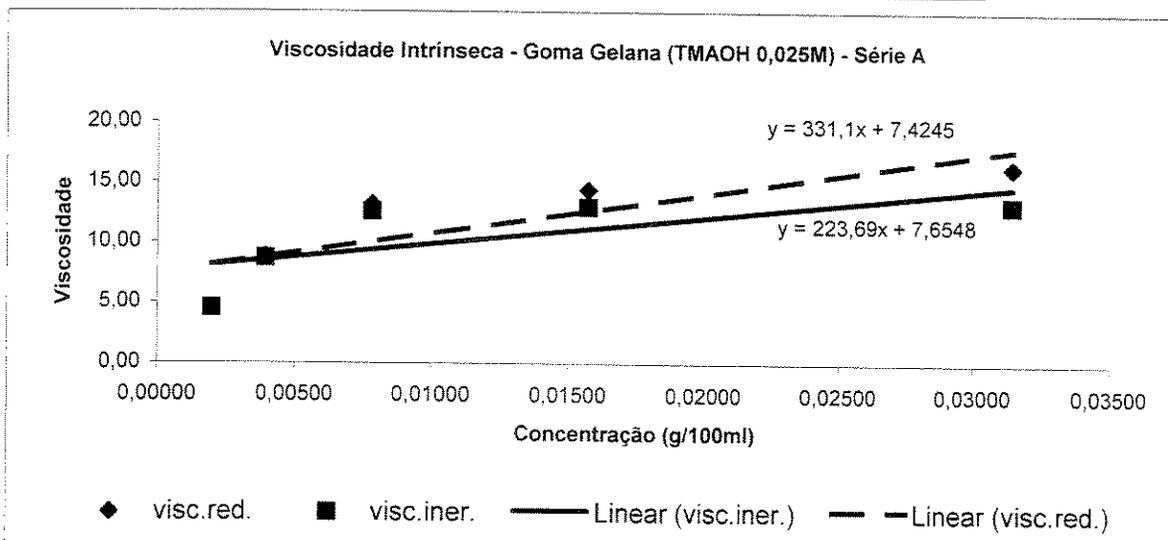
Série B

pic+am	pic vazio	massa	volume	densidade
54,7181	21,9580	32,7601	32,4837	1,0085
54,7198	21,9580	32,7618	32,4837	1,0086
54,7184	21,9580	32,7604	32,4837	1,0085
54,7196	21,9580	32,7616	32,4837	1,0086
54,7188	21,9580	32,7608	32,4837	1,0085
	média	32,7609		1,0085
	d.pad	0,0007		0,0000

GOMA GELANA - MASSA MOLECULAR

Série A		
conc.	visc.red.	visc.iner.
0,00196	4,53	4,51
0,00393	8,79	8,64
0,00786	13,20	12,56
0,01572	14,41	12,99
0,03143	16,36	13,20

Série B		
conc.	visc.red.	visc.iner.
0,00196	10,89	10,78
0,00393	13,26	12,92
0,00785	13,04	12,42
0,01570	13,93	12,60
0,03140	15,76	12,80



	[η] (100ml/g)	
Série A	7,42	7,54
Série B	11,77	11,82

Para goma gelana a massa molecular pode ser calculada pela formula: $[\eta] = 7,48 \times 10^{-5} M_w^{0,91}$

Mw =	199,75 kDa	para Série A
	327,33 kDa	para Série B

VISCOSIDADE INTRISECA - GOMA GELANA EM SOL. TMAOH 0,25M
SÉRIE A

Tempos de escoamento e densidade das soluções

SOLUÇÃO 1					pic+am	pic vazio	massa	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	34	37	94,37		54,5253	21,9580	32,5673	32,4880	1,0024
1	34	38	94,38		54,5268	21,9580	32,5688	32,4880	1,0025
1	34	24	94,24		54,5284	21,9580	32,5704	32,4880	1,0025
1	34	29	94,29	média	54,5264	21,9580	32,5684	32,4880	1,0025
1	34	37	94,37	94,35	54,5283	21,9580	32,5703	32,4880	1,0025
1	34	47	94,47	d.pad		média	32,5690		1,0025
				0,08		d.pad	0,0013		0,0000

SOLUÇÃO 2					pic+am	pic vazio	massa	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	16	57	76,57		54,5246	21,9580	32,5666	32,4880	1,0024
1	16	34	76,34		54,5251	21,9580	32,5671	32,4880	1,0024
1	16	40	76,40		54,5257	21,9580	32,5677	32,4880	1,0025
1	16	35	76,35	média	54,5254	21,9580	32,5674	32,4880	1,0024
1	16	47	76,47	76,42	54,5245	21,9580	32,5665	32,4880	1,0024
1	16	38	76,38	d.pad		média	32,5671		1,0024
				0,09		d.pad	0,0005		0,0000

SOLUÇÃO 3					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	8	77	68,77		54,5256	21,9580	32,5676	32,4880	1,0025
1	8	79	68,79		54,5231	21,9580	32,5651	32,4880	1,0024
1	8	76	68,76		54,5231	21,9580	32,5651	32,4880	1,0024
1	8	86	68,86	média	54,5234	21,9580	32,5654	32,4880	1,0024
1	8	75	68,75	68,78	54,5242	21,9580	32,5662	32,4880	1,0024
1	8	72	68,72	d.pad		média	32,5659		1,0024
				0,05		d.pad	0,0011		0,0000

SOLUÇÃO 4					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	4	39	64,39		54,5222	21,9580	32,5642	32,4880	1,0023
1	4	54	64,54		54,5217	21,9580	32,5637	32,4880	1,0023
1	4	53	64,53		54,5228	21,9580	32,5648	32,4880	1,0024
1	4	57	64,57	média	54,5219	21,9580	32,5639	32,4880	1,0023
1	4	41	64,41	64,47	54,5227	21,9580	32,5647	32,4880	1,0024
1	4	37	64,37	d.pad		média	32,5643		1,0023
				0,09		d.pad	0,0005		0,0000

SOLUÇÃO 5					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	2	83	62,83		54,5205	21,9580	32,5625	32,4880	1,0023
1	2	82	62,82		54,5201	21,9580	32,5621	32,4880	1,0023
1	2	88	62,88		54,5203	21,9580	32,5623	32,4880	1,0023
1	2	86	62,86	média	54,5184	21,9580	32,5604	32,4880	1,0022
1	2	90	62,90	62,88	54,5183	21,9580	32,5603	32,4880	1,0022
1	2	97	62,97	d.pad		média	32,5615		1,0023
				0,05		d.pad	0,0011		0,0000

SOLUÇÃO TMAOH (NaCl 0,025M)					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	2	39	62,39	média 62,33 d.pad 0,05	54,5195	21,9580	32,5615	32,4880	1,0023
1	2	33	62,33		54,5182	21,9580	32,5602	32,4880	1,0022
1	2	35	62,35		54,5174	21,9580	32,5594	32,4880	1,0022
1	2	23	62,23		54,5165	21,9580	32,5585	32,4880	1,0022
1	2	31	62,31		54,5178	21,9580	32,5598	32,4880	1,0022
1	2	34	62,34				média 32,5599		1,0022
AGUA									
min	seg	dec.sec	tempo (seg)		pic+am	pic vazio	amostra	densid*	vol. Pic
1	2	38	62,38	média 62,32 d.pad 0,06	54,5118	21,9580	32,5538	0,9980	32,4888
1	2	28	62,28		54,5105	21,9580	32,5525	0,9980	32,4875
1	2	38	62,38		54,5118	21,9580	32,5538	0,9980	32,4888
1	2	22	62,22		54,5099	21,9580	32,5519	0,9980	32,4869
1	2	36	62,36		54,5107	21,9580	32,5527	0,9980	32,4877
1	2	31	62,31				média 32,5529		32,4880
						d.pad 0,0008		0,0008	

VISCOSIDADE INTRÍSECA - GOMA GELANA EM SOL. TMAOH 0,25M SÉRIE B

Tempos de escoamento e densidade das soluções

SOLUÇÃO 1					pic+am	pic vazio	massa	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	31	96	91,96	média 91,91 d.pad 0,07	54,5305	21,9580	32,5725	32,4880	1,0026
1	31	89	91,89		54,531	21,9580	32,5730	32,4880	1,0026
1	31	93	91,93		54,5305	21,9580	32,5725	32,4880	1,0026
1	31	79	91,79		54,5309	21,9580	32,5729	32,4880	1,0026
1	31	90	91,90		54,5304	21,9580	32,5724	32,4880	1,0026
1	32	1	92,01				média 32,5727		1,0026
						d.pad 0,0003		0,0000	

SOLUÇÃO 2					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	14	81	74,81	média 74,94 d.pad 0,09	54,5285	21,9580	32,5705	32,4880	1,0025
1	14	97	74,97		54,5297	21,9580	32,5717	32,4880	1,0026
1	14	96	74,96		54,5274	21,9580	32,5694	32,4880	1,0025
1	14	84	74,84		54,5267	21,9580	32,5687	32,4880	1,0025
1	15	1	75,01		54,5301	21,9580	32,5721	32,4880	1,0026
1	15	2	75,02				média 32,5705		1,0025
						d.pad 0,0015		0,0000	

SOLUÇÃO 3					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	7	83	67,83	média 67,80 d.pad 0,04	54,5251	21,9580	32,5671	32,4880	1,0024
1	7	81	67,81		54,5246	21,9580	32,5666	32,4880	1,0024
1	7	83	67,83		54,5230	21,9580	32,5650	32,4880	1,0024
1	7	74	67,74		54,5225	21,9580	32,5645	32,4880	1,0024
1	7	75	67,75		54,5228	21,9580	32,5648	32,4880	1,0024
1	7	81	67,81				média 32,5656		1,0024
						d.pad 0,0012		0,0000	

SOLUÇÃO 4					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	4	65	64,65	média 64,70 d.pad 0,07	54,5222	21,9580	32,5642	32,4880	1,0023
1	4	72	64,72		54,5224	21,9580	32,5644	32,4880	1,0024
1	4	79	64,79		54,5241	21,9580	32,5661	32,4880	1,0024
1	4	69	64,69		54,5224	21,9580	32,5644	32,4880	1,0024
1	4	60	64,60		54,522	21,9580	32,5640	32,4880	1,0023
1	4	75	64,75						
							média	32,5646	
						d.pad	0,0008		0,0000

SOLUÇÃO 5					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	2	72	62,72	média 62,82 d.pad 0,10	54,5218	21,9580	32,5638	32,4880	1,0023
1	2	75	62,75		54,521	21,9580	32,5630	32,4880	1,0023
1	2	85	62,85		54,5209	21,9580	32,5629	32,4880	1,0023
1	2	72	62,72		54,521	21,9580	32,5630	32,4880	1,0023
1	2	89	62,89		54,5215	21,9580	32,5635	32,4880	1,0023
1	2	97	62,97						
							média	32,5632	
						d.pad	0,0004		0,0000

SOLUÇÃO TMAOH (NaCl 0.025M)					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	1	52	61,52	média 61,51 d.pad 0,04	54,5195	21,9580	32,5615	32,4880	1,0023
1	1	58	61,58		54,5182	21,9580	32,5602	32,4880	1,0022
1	1	46	61,46		54,5174	21,9580	32,5594	32,4880	1,0022
1	1	52	61,52		54,5165	21,9580	32,5585	32,4880	1,0022
1	1	49	61,49		54,5178	21,9580	32,5598	32,4880	1,0022
1	1	48	61,48						
							média	32,5599	
						d.pad	0,0011		0,0000

ÁGUA					pic+am	pic vazio	amostra	densid*	vol. Pic
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	1	11	61,11	média 61,09 d.pad 0,05	54,5118	21,9580	32,5538	0,9980	32,4888
1	1	10	61,10		54,5105	21,9580	32,5525	0,9980	32,4875
1	1	15	61,15		54,5118	21,9580	32,5538	0,9980	32,4888
1	1	0	61,00		54,5099	21,9580	32,5519	0,9980	32,4869
1	1	7	61,07		54,5107	21,9580	32,5527	0,9980	32,4877
1	1	13	61,13						
							média	32,5529	
						d.pad	0,0008		0,0008

* densidade obtida da tab.de propriedades termodinâmicas da água saturada a 22oC (Incropera, 1992)

GOMA GELANA

Cálculo da viscosidade reduzida e inerente para determinação da viscosidade intrínseca

Série A				η rel		η sp		η red		η iner	
conc.	Esc. (seg)	dens (g/ml)	η	H2O	TMAOH	H2O	TMAOH	H2O	TMAOH	H2O	TMAOH
AGUA	62,32	0,9980	0,9330								
TMAOH	62,33	1,0022	0,9369								
0,0020	62,88	1,0023	0,9453	1,01	1,0089	0,01	0,0089	6,73	4,53	6,68	4,51
0,0039	64,47	1,0023	0,9693	1,04	1,0345	0,04	0,0345	9,91	8,79	9,73	8,64
0,0079	68,78	1,0024	1,0341	1,11	1,1037	0,11	0,1037	13,80	13,20	13,10	12,56
0,0157	76,42	1,0024	1,1491	1,23	1,2264	0,23	0,2264	14,74	14,41	13,26	12,99
0,0314	94,35	1,0025	1,4188	1,52	1,5143	0,52	0,5143	16,57	16,36	13,34	13,20

Série B				η rel		η sp		η red		η iner	
conc.	Esc. (seg)	dens (g/ml)	η	H2O	TMAOH	H2O	TMAOH	H2O	TMAOH	H2O	TMAOH
AGUA	61,09	0,9980	0,9146								
TMAOH	61,51	1,0022	0,9247								
0,0020	62,82	1,0023	0,9444	1,03	1,0214	0,03	0,0214	16,64	10,89	16,37	10,78
0,0039	64,70	1,0024	0,9728	1,06	1,0520	0,06	0,0520	16,22	13,26	15,72	12,92
0,0079	67,80	1,0024	1,0194	1,11	1,1024	0,11	0,1024	14,59	13,04	13,82	12,42
0,0157	74,94	1,0025	1,1269	1,23	1,2187	0,23	0,2187	14,78	13,93	13,29	12,60
0,0314	91,91	1,0026	1,3823	1,51	1,4949	0,51	0,4949	16,28	15,76	13,15	12,80

GOMA GELANA

Concentração das Soluções

Série A	
Massa de Alginato	0,2506
Massa da Solução	100,00
Densidade da sol.	1,0034
Volume da solução	99,66
Concentração da solução inicial	
g/100ml sol	0,2514
	g/100g sol
sol 6	0,00196
sol 5	0,00393
sol 4	0,00786
sol 3	0,01572
sol 2	0,03143
	0,06286
	0,12572

Série B	
Massa de Alginato	0,2504
Massa da Solução	100,02
Densidade da sol.	1,0035
Volume da solução	99,67
Concentração da solução inicial	
g/100ml sol	0,2512
	g/100g sol
sol 6	0,00196
sol 5	0,00393
sol 4	0,00785
sol 3	0,01570
sol 2	0,03140
	0,06281
	0,12562

densidade	g/ml
H ₂ O 22°C	0,998004

Densidade das soluções iniciais

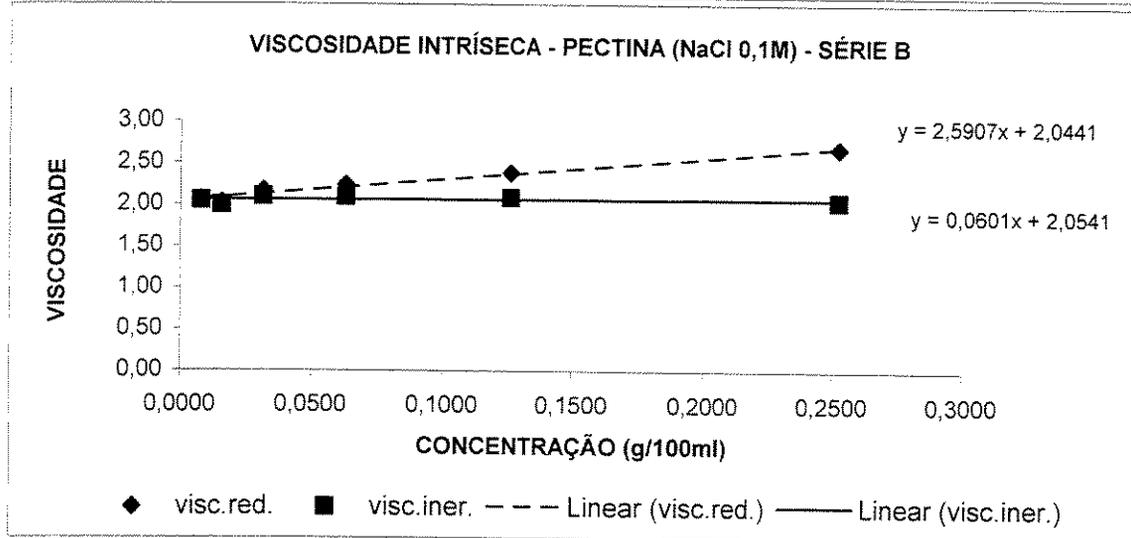
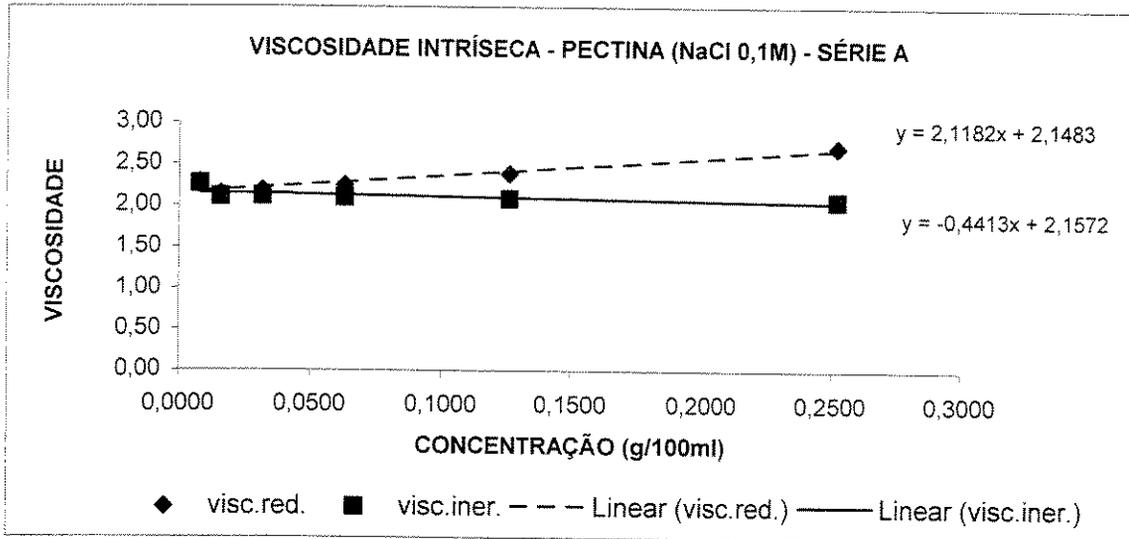
Série A				
pic+am	pic vazio	massa	volume	densidade
54,5559	21,9580	32,5979	32,4880	1,0034
54,5575	21,9580	32,5995	32,4880	1,0034
54,5582	21,9580	32,6002	32,4880	1,0035
54,5567	21,9580	32,5987	32,4880	1,0034
54,5555	21,9580	32,5975	32,4880	1,0034
dens	média	32,5988		1,0034
série A	d.pad	0,0011		0,0000

Série B				
pic+am	pic vazio	massa	volume	densidade
54,5615	21,9580	32,6035	32,4880	1,0036
54,5604	21,9580	32,6024	32,4880	1,0035
54,5607	21,9580	32,6027	32,4880	1,0035
54,5621	21,9580	32,6041	32,4880	1,0036
54,5596	21,9580	32,6016	32,4880	1,0035
dens	média	32,6029		1,0035
série B	d.pad	0,0010		0,0000

PECTINA - MASSA MOLECULAR

SÉRIE A		SALINA	
conc.	visc.red.	visc.iner.	
0,0079	2,28	2,26	
0,0158	2,14	2,11	
0,0316	2,18	2,11	
0,0631	2,24	2,10	
0,1262	2,39	2,09	
0,2524	2,71	2,07	

SÉRIE B		SALINA	
conc.	visc.red.	visc.iner.	
0,0079	2,06	2,05	
0,0158	2,02	1,99	
0,0316	2,16	2,09	
0,0631	2,24	2,09	
0,1262	2,39	2,09	
0,2525	2,68	2,05	



	[η] (100ml/g)	
Série A	2,15	
	2,16	2,15
Série B	2,04	
	2,05	2,05

Para pectina a massa molecular pode ser calculada pela formula: $[\eta] = 0,0955 M_w^{0,73}$

Mw =	71,35 kDa	para Série A
	66,69 kDa	para Série B

VISCOSIDADE INTRÍSECA - PECTINA EM SOL. NaCl 0,1M **SÉRIE A**

Tempos de escoamento e densidade das soluções

SOLUÇÃO 1				pic+am	pic vazio	massa	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)					
1	44	32	104,32	54,6922	21,9580	32,7342	32,4997	1,0072
1	44	34	104,34	54,6912	21,9580	32,7332	32,4997	1,0072
1	44	31	104,31	54,6905	21,9580	32,7325	32,4997	1,0072
1	44	46	104,46	54,6921	21,9580	32,7341	32,4997	1,0072
1	44	40	104,40	54,6902	21,9580	32,7322	32,4997	1,0072
1	44	44	104,44					
				média				
				104,38				
				d.pad		média	32,7332	1,0072
				0,06		d.pad	0,0009	0,0000

SOLUÇÃO 2				pic+am	pic vazio	massa	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)					
1	20	61	80,61	54,6789	21,9580	32,7209	32,4997	1,0068
1	20	68	80,68	54,6797	21,9580	32,7217	32,4997	1,0068
1	20	79	80,79	54,6778	21,9580	32,7198	32,4997	1,0068
1	20	64	80,64	54,6797	21,9580	32,7217	32,4997	1,0068
1	20	70	80,70	54,6778	21,9580	32,7198	32,4997	1,0068
1	20	63	80,63					
				média				
				80,68				
				d.pad		média	32,7208	1,0068
				0,07		d.pad	0,0010	0,0000

SOLUÇÃO 3				pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)					
1	10	78	70,78	54,6712	21,9580	32,7132	32,4997	1,0066
1	10	83	70,83	54,6717	21,9580	32,7137	32,4997	1,0066
1	10	84	70,84	54,6731	21,9580	32,7151	32,4997	1,0066
1	10	76	70,76	54,6718	21,9580	32,7138	32,4997	1,0066
1	10	82	70,82	54,6723	21,9580	32,7143	32,4997	1,0066
1	10	73	70,73					
				média				
				70,79				
				d.pad		média	32,7140	1,0066
				0,04		d.pad	0,0007	0,0000

SOLUÇÃO 4				pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)					
1	6	21	66,21	54,6705	21,9580	32,7125	32,4997	1,0065
1	6	32	66,32	54,6713	21,9580	32,7133	32,4997	1,0066
1	6	30	66,30	54,6694	21,9580	32,7114	32,4997	1,0065
1	6	19	66,19	54,6698	21,9580	32,7118	32,4997	1,0065
1	6	35	66,35	54,6700	21,9580	32,7120	32,4997	1,0065
1	6	33	66,33					
				média				
				66,28				
				d.pad		média	32,7122	1,0065
				0,07		d.pad	0,0007	0,0000

SOLUÇÃO 5				pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)					
1	4	8	64,08	54,6656	21,9580	32,7076	32,4997	1,0064
1	4	6	64,06	54,667	21,9580	32,7090	32,4997	1,0064
1	4	14	64,14	54,6674	21,9580	32,7094	32,4997	1,0065
1	4	11	64,11	54,6667	21,9580	32,7087	32,4997	1,0064
1	4	17	64,17	54,6663	21,9580	32,7083	32,4997	1,0064
1	4	15	64,15					
				média				
				64,12				
				d.pad		média	32,7086	1,0064
				0,04		d.pad	0,0007	0,0000

SOLUÇÃO 6					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	3	20	63,20	média 63,15 d.pad 0,06	54,6625	21,9580	32,7045	32,4997	1,0063
1	3	15	63,15		54,6627	21,9580	32,7047	32,4997	1,0063
1	3	10	63,10		54,6616	21,9580	32,7036	32,4997	1,0063
1	3	19	63,19		54,6626	21,9580	32,7046	32,4997	1,0063
1	3	5	63,05		54,6636	21,9580	32,7056	32,4997	1,0063
1	3	19	63,19			média		32,7046	
					d.pad		0,0007		0,0000

SOLUÇÃO SALINA (NaCl 0,1M)					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	2	10	62,10	média 62,08 d.pad 0,05	54,6575	21,9580	32,6995	32,4997	1,0061
1	2	11	62,11		54,6568	21,9580	32,6988	32,4997	1,0061
1	2	4	62,04		54,6583	21,9580	32,7003	32,4997	1,0062
1	2	12	62,12		54,6576	21,9580	32,6996	32,4997	1,0062
1	2	0	62,00		54,5578	21,9580	32,5998	32,4997	1,0031
1	2	10	62,10			média		32,6796	
					d.pad		0,0446		0,0014

ÁGUA					pic+am	pic vazio	amostra	densid*	vol. Pic
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	2	10	62,10	média 62,11 d.pad 0,05	54,5222	21,9580	32,5642	0,9980	32,4992
1	2	13	62,13		54,5236	21,9580	32,5656	0,9980	32,5006
1	2	8	62,08		54,5227	21,9580	32,5647	0,9980	32,4997
1	2	3	62,03		54,5216	21,9580	32,5636	0,9980	32,4986
1	2	15	62,15		54,5232	21,9580	32,5652	0,9980	32,5002
1	2	15	62,15			média		32,5647	
					d.pad		0,0008		0,0008

VISCOSIDADE INTRÍSECA - PECTINA EM SOL. NaCl 0,1M SÉRIE B

Tempos de escoamento e densidade das soluções

SOLUÇÃO 1					pic+am	pic vazio	massa	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	43	91	103,91	média 103,88 d.pad 0,07	54,7027	21,9580	32,7447	32,4998	1,0075
1	43	81	103,81		54,7033	21,9580	32,7453	32,4998	1,0076
1	43	95	103,95		54,7024	21,9580	32,7444	32,4998	1,0075
1	43	81	103,81		54,702	21,9580	32,7440	32,4998	1,0075
1	43	83	103,83		54,7046	21,9580	32,7466	32,4998	1,0076
1	43	94	103,94			média		32,7450	
					d.pad		0,0010		0,0000

SOLUÇÃO 2					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	20	57	80,57	média 80,63 d.pad 0,06	54,6803	21,9580	32,7223	32,4998	1,0068
1	20	63	80,63		54,6808	21,9580	32,7228	32,4998	1,0069
1	20	59	80,59		54,6798	21,9580	32,7218	32,4998	1,0068
1	20	66	80,66		54,6791	21,9580	32,7211	32,4998	1,0068
1	20	74	80,74		54,6808	21,9580	32,7228	32,4998	1,0069
1	20	59	80,59			média		32,7222	
					d.pad		0,0007		0,0000

SOLUÇÃO 3					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	10	66	70,66	média 70,72 d.pad 0,09	54,675	21,9580	32,7170	32,4998	1,0067
1	10	65	70,65		54,6735	21,9580	32,7155	32,4998	1,0066
1	10	70	70,70		54,6742	21,9580	32,7162	32,4998	1,0067
1	10	64	70,64		54,6738	21,9580	32,7158	32,4998	1,0066
1	10	83	70,83		54,6745	21,9580	32,7165	32,4998	1,0067
1	10	85	70,85						
							média	32,7162	
						d.pad	0,0006		0,0000

SOLUÇÃO 4					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	6	17	66,17	média 66,23 d.pad 0,07	54,6633	21,9580	32,7053	32,4998	1,0063
1	6	22	66,22		54,6617	21,9580	32,7037	32,4998	1,0063
1	6	19	66,19		54,6633	21,9580	32,7053	32,4998	1,0063
1	6	20	66,20		54,6631	21,9580	32,7051	32,4998	1,0063
1	6	35	66,35		54,6624	21,9580	32,7044	32,4998	1,0063
1	6	26	66,26						
							média	32,7048	
						d.pad	0,0007		0,0000

SOLUÇÃO 5					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	4	3	64,03	média 63,99 d.pad 0,04	54,6586	21,9580	32,7006	32,4998	1,0062
1	4	1	64,01		54,6585	21,9580	32,7005	32,4998	1,0062
1	4	0	64,00		54,6584	21,9580	32,7004	32,4998	1,0062
1	3	98	63,98		54,6593	21,9580	32,7013	32,4998	1,0062
1	3	97	63,97		54,6598	21,9580	32,7018	32,4998	1,0062
1	3	92	63,92						
							média	32,7009	
						d.pad	0,0006		0,0000

SOLUÇÃO 6					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	3	0	63,00	média 63,01 d.pad 0,08	54,6605	21,9580	32,7025	32,4998	1,0062
1	3	13	63,13		54,6615	21,9580	32,7035	32,4998	1,0063
1	3	6	63,06		54,6597	21,9580	32,7017	32,4998	1,0062
1	2	91	62,91		54,6594	21,9580	32,7014	32,4998	1,0062
1	2	95	62,95		54,6607	21,9580	32,7027	32,4998	1,0062
1	3	2	63,02						
							média	32,7024	
						d.pad	0,0008		0,0000

SOLUÇÃO SALINA (NaCl 0,1M)					pic+am	pic vazio	amostra	volume	densidade
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	2	9	62,09	média 62,01 d.pad 0,05	54,6575	21,9580	32,6995	32,4998	1,0061
1	2	0	62,00		54,6568	21,9580	32,6988	32,4998	1,0061
1	2	0	62,00		54,6583	21,9580	32,7003	32,4998	1,0062
1	1	96	61,96		54,6576	21,9580	32,6996	32,4998	1,0061
1	1	96	61,96		54,6578	21,9580	32,6998	32,4998	1,0062
1	2	4	62,04						
							média	32,6996	
						d.pad	0,0005		0,0000

ÁGUA					pic+am	pic vazio	amostra	densid*	vol. Pic
min	seg	dec.sec	tempo (seg)						
1	1	93	61,93		54,5225	21,9580	32,5645	0,9980	32,4995
1	1	88	61,88		54,5232	21,9580	32,5652	0,9980	32,5002
1	1	97	61,97	média	54,5227	21,9580	32,5647	0,9980	32,4997
1	1	97	61,97	61,95	54,5228	21,9580	32,5648	0,9980	32,4998
1	2	5	62,05	d.pad	54,5229	21,9580	32,5649	0,9980	32,4999
1	1	90	61,90	0,06		média	32,5648		32,4998
						d.pad	0,0003		0,0003

* densidade obtida da tab.de propriedades termodinâmicas da água saturada a 22oC (Incropera, 1992)

PECTINA

Cálculo da viscosidade reduzida e inerente para determinação da viscosidade intrínseca

Série A				η rel		η sp		η red		η iner	
conc.	Esc. (seg)	dens (g/ml)	η	H2O	salina	H2O	salina	H2O	salina	H2O	salina
AGUA	62,11	0,9980	0,93								
SALINA	62,08	1,0055	0,94								
0,00789	63,15	1,0063	0,95	1,025	1,018	0,025	0,018	3,195	2,280	3,155	2,260
0,01578	64,12	1,0064	0,97	1,041	1,034	0,041	0,034	2,605	2,141	2,553	2,106
0,03155	66,28	1,0065	1,00	1,076	1,069	0,076	0,069	2,421	2,181	2,333	2,109
0,06311	70,79	1,0066	1,07	1,150	1,142	0,150	0,142	2,372	2,244	2,210	2,098
0,12621	80,68	1,0068	1,22	1,310	1,301	0,310	0,301	2,460	2,387	2,142	2,086
0,25242	104,38	1,0072	1,58	1,696	1,684	0,696	0,684	2,758	2,710	2,093	2,065

Série B				η rel		η sp		η red		η iner	
conc.	Esc. (seg)	dens (g/ml)	η	H2O	salina	H2O	salina	H2O	salina	H2O	salina
AGUA	61,95	0,9980	0,93								
SALINA	62,01	1,0061	0,94								
0,00789	63,01	1,0062	0,95	1,026	1,016	0,026	0,016	3,234	2,062	3,193	2,045
0,01578	63,99	1,0062	0,97	1,041	1,032	0,041	0,032	2,618	2,023	2,565	1,991
0,03156	66,23	1,0063	1,00	1,078	1,068	0,078	0,068	2,471	2,163	2,380	2,093
0,06312	70,72	1,0067	1,07	1,151	1,141	0,151	0,141	2,400	2,235	2,235	2,091
0,12625	80,63	1,0068	1,22	1,313	1,301	0,313	0,301	2,480	2,386	2,157	2,086
0,25249	103,88	1,0075	1,57	1,693	1,678	0,693	0,678	2,744	2,683	2,085	2,049

PECTINA

Concentração das Soluções

Série A	
Massa de Pectina	0,5008
Massa da Solução	100,06
Densidade da sol.	1,0087
Volume da solução	99,20
Concentração da solução inicial g/100ml sol	0,5048
	g/100g sol
sol 1	0,2524
sol 2	0,1262
sol 3	0,0631
sol 4	0,0316
sol 5	0,0158
sol 6	0,0079

Série B	
Massa de Pectina	0,5008
Massa da Solução	100,02
Densidade da sol.	1,0085
Volume da solução	99,17
Concentração da solução inicial g/100ml sol	0,5050
	g/100g sol
sol 1	0,25249
sol 2	0,12625
sol 3	0,06312
sol 4	0,03156
sol 5	0,01578
sol 6	0,00789

densidade	g/ml
H ₂ O 22°C	0,998004

Densidade das soluções iniciais

Série A

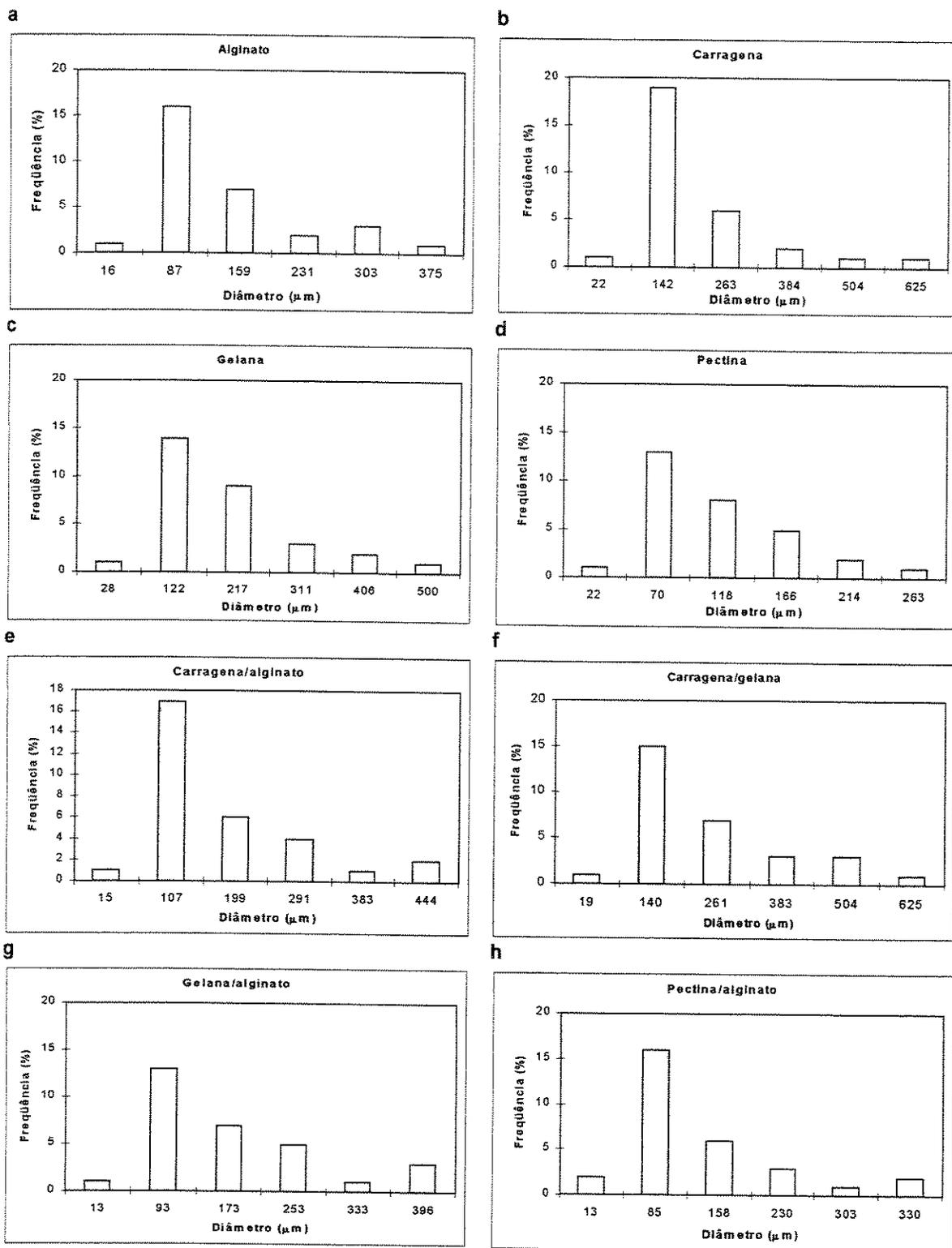
pic+am	pic vazio	massa	volume	densidade
54,7408	21,9580	32,7828	32,4998	1,0087
54,7403	21,9580	32,7823	32,4998	1,0087
54,7392	21,9580	32,7812	32,4998	1,0087
54,7402	21,9580	32,7822	32,4998	1,0087
54,7416	21,9580	32,7836	32,4998	1,0087
dens	média	32,7824		1,0087
série A	d.pad	0,0009		0,0000

Série B

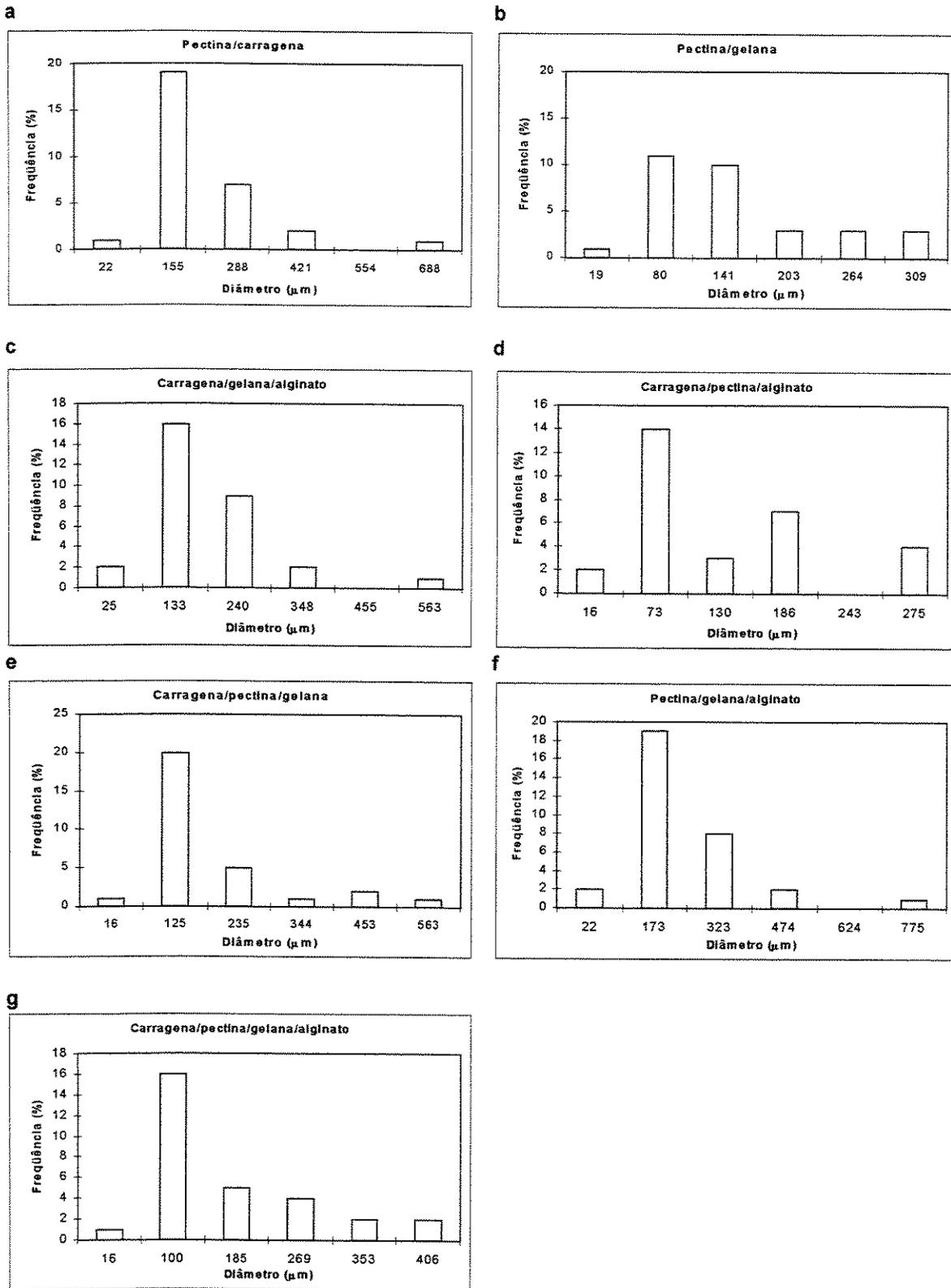
pic+am	pic vazio	massa	volume	densidade
54,7346	21,9580	32,7766	32,4998	1,0085
54,7339	21,9580	32,7759	32,4998	1,0085
54,7349	21,9580	32,7769	32,4998	1,0085
54,7347	21,9580	32,7767	32,4998	1,0085
54,7334	21,9580	32,7754	32,4998	1,0085
dens	média	32,7763		1,0085
série B	d.pad	0,0006		0,0000

ANEXO 2

HISTOGRAMAS DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DAS DIFERENTES MICROCÁPSULAS OBTIDAS



Distribuição de tamanho das microcápsulas medidas por microscopia ótica. a. AL; b. CA; c. GE; d. PE; e. CA-AL; f. CA-GE; g. GE-AL; h. PE-AL.



Distribuição de tamanho das microcápsulas medidas por microscopia ótica. a. PE-CA; b. PE-GE; c. CA-GE-AL; d. CA-PE-AL; e. CA-PE-GE; f. PE-GE-AL; g. CA-PE-GE-AL.