



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO  
*Lactobacillus acidophilus* PARA ALIMENTAÇÃO DE LARVAS DE PACU  
(*Piaractus mesopotamicus*)**

Autora: Juliana Bürger Rodrigues

Orientador: Carlos Raimundo Ferreira Grosso

**CAMPINAS, 2012**





**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**JULIANA BÜRGER RODRIGUES**

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO  
*Lactobacillus acidophilus* PARA ALIMENTAÇÃO DE LARVAS DE PACU  
(*Piaractus mesopotamicus*)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO  
TÍTULO DE MESTRE EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, NA  
ÁREA DE NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL E APLICADA À  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**Carlos Raimundo Ferreira Grosso**

**ORIENTADOR**

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Juliana Bürger Rodrigues, aprovada pela comissão julgadora em \_\_/\_\_/\_\_ e orientada pelo Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso.

---

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

**CAMPINAS, 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Rodrigues, Juliana Bürger, 1988-

R618d          Desenvolvimento de micropartículas contendo *Lactobacillus acidophilus* para alimentação de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) / Juliana Bürger Rodrigues. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Carlos Raimundo Ferreira Grosso.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Microencapsulação. 2. *Lactobacillus acidophilus*. 3. Larvas de peixe. 4. Gelificação iônica. 5. Interação eletrostática. I. Grosso, Carlos Raimundo Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título

Título em inglês: Use of microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* for feeding pacu larvae (*Piaractus mesopotamicus*)

Palavras-chave em inglês (Keywords): Microencapsulation, *Lactobacillus acidophilus*, Fish larvae, Ionic gelation, Electrostatic interaction

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Valdemiro Carlos Sgarbieri [Orientador]

Maria Célia Portella

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Programa de Pós Graduação: Alimentos e Nutrição

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso  
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri  
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP  
(Membro)

---

Prof. Dra. Maria Célia Portella  
Centro de Aquicultura – UNESP  
(Membro)

---

Prof. Dra. Ana Sílvia Prata  
Faculdade de Ciências Aplicadas – UNICAMP  
(Membro)

---

Prof. Dra. Mirna Lucia Gigante  
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP  
(Membro)

*“...Viver e não ter a vergonha de ser feliz,  
Cantar e cantar e cantar a beleza de ser um ETERNO APRENDIZ...”*

*Gonzaguinha*

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas e de forma particular:

– a Deus, por sempre iluminar minha vida e colocar nela pessoas maravilhosas;

– ao meu orientador, Carlos Raimundo Ferreira Grosso, pela oportunidade, por ter acreditado em mim e no meu potencial, por ser mais que um orientador, por me mostrar como é o “mundo da pesquisa”, por ser uma pessoa correta, um amigo, chamar minha atenção quando necessário e saber elogiar nos momentos corretos. Saiba que sempre serei grata ao senhor;

– à banca examinadora, Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, Profª. Dra. Mirna Lúcia Gigante, Profª. Dra. Ana Silvia Prata e a Profª. Dra. Maria Célia Portella, por terem despendido seus tempos para fazerem a leitura do meu trabalho e terem apresentado sugestões para que este fosse melhorado. Gostaria de agradecer, especialmente, à Prof. Dra. Maria Célia Portella, pois, além das contribuições científicas ao trabalho, disponibilizou seu laboratório, atenção e também me apresentou a seus alunos. Sem a colaboração destes, a realização deste trabalho não seria possível;

– aos meus avôs, José Ernesto Bürger e Afonso do Amaral Rodrigues, por serem meus anjos e terem iluminado esta minha trajetória, e às minhas avós, Dalva e Ana Edithe, por sempre me acolherem a cada ida a Santa Maria;

– aos meus pais, Nilton e Maristela, e ao meu irmão, Matheus, por serem meus primeiros e eternos amores. Por sempre estarem ao meu lado, por investirem em mim, por entenderem meus momentos de ausência, meu afastamento, por cada sorriso, beijo e abraço que eu recebo ao chegar a casa, além do churrasco sagrado de todo domingo. Agradeço, especialmente, à minha mãe, por além de tudo isso, ser também minha melhor amiga. Amo muito vocês;

– às minhas cunhadas, Cíntia e Valéria, pela acolhida ao visita-las e pela amizade;

– ao meu amor, Rogério de Assis Brasil, por ser simplesmente um companheiro em todas as minhas decisões. Por entender que o meu afastamento físico é necessário para o

nosso futuro, por me fazer feliz e acreditar que todo sacrifício será recompensado e que a distância é um obstáculo pequeno quando se tem um verdadeiro amor;

– às minhas amigas, Mariana Beltrame, Tayne, Camila, Shally, Carol e Ju, por manterem esta amizade verdadeira que trazemos desde o colégio, por me fazerem sentir em casa mesmo estando longe, pelas conversas, jantares, caminhadas, mateada, enfim por serem minhas irmãs;

– à minha eterna “coleguinha” Vanessa Viera, pela amizade e companheirismo, por apoiar minhas decisões e estar sempre disponível quando preciso. À Louise, Andréia, Gabriela, Litiane e Tiane, pela amizade;

– à minha “família campineira”: Geina, Flávia, Erick, Fernanda, Célia, Carol, Elisa e Grasiela, por fazerem a minha estada em Campinas mais fácil. À Geina gostaria de agradecer por ter dividido um lar comigo, pela confiança, por ser, como ela mesma diz, uma verdadeira mana, por compartilhar momentos tristes e felizes, por sempre me fazer companhia. À Flávia, por ter me acolhido no laboratório, por ser muito, mas muito mais que uma colega de trabalho, por ter construído comigo uma amizade que vamos levar para toda a vida, independente de onde estivermos fazendo as nossas “bolinhas”. À Fernanda e ao Erick, pela mais profunda amizade, por me fazerem rir o tempo inteiro, por serem amigos megadedicados e muito companheiros, por manterem a parceria no nosso doutorado. À Célia, Carol, Elisa e Gra, por todos momentos compartilhados, pela ajuda, pelo sorriso de cada dia;

– ao pessoal do DTA: Cecília, Karina, Clarice, Guilherme e Bia, por toda ajuda e amizade, sem o trabalho de vocês o meu trabalho não seria possível;

– ao pessoal de Jaboticabal: Natalia, Tomomi, Taxinha, Thiago, Rodrigo, Gimbo, Amanda, Pedro, Avatar, Larissa, Camila, por toda a ajuda durante o experimento biológico, pois sem vocês seria quase impossível. Agradeço, especialmente, à Amanda e à Natalia, pela acolhida em sua casa; ao Pedro e ao Gustavo, por me acolherem em suas famílias no Natal e Ano Novo; à Natalia, por ter me ensinado muita coisa, por ser uma maravilhosa amiga, uma pessoa muito dedicada, inteligente e esforçada, por ser uma guerreira e um exemplo a ser seguido;

– ao pessoal do DEPAN, por ter me ajudado das mais diversas maneiras. Agradeço, especialmente, à Yara, pela amizade, cobrança e organização, e ao Chico, por ter encarado o desafio do cromatógrafo comigo;

– ao departamento de Óleos e Gorduras da UNICAMP, principalmente à Marcella e ao Renato, pela constante ajuda;

– aos companheiros de laboratório: Fernando, Talita, Joelma, Gislaine, Carol e Andrea, por todos momentos compartilhados;

– ao CNPq, pelo financiamento da bolsa de mestrado.

## RESUMO GERAL

Este estudo teve como objetivo produzir micropartículas por gelificação iônica associada à interação eletrostática, contendo constituintes nutricionalmente importantes para a alimentação de larvas de peixes. Na primeira parte deste estudo, foram desenvolvidas micropartículas por gelificação iônica, utilizando-se pectina e cloreto de cálcio para a formação das matrizes. O recheio das micropartículas era constituído de proteínas do soro de leite, na sua forma não-desnaturada ou desnaturada, e óleo de soja adicionado de oleoresina de páprica. Nas partículas em que o recheio era constituído somente de óleo, a proteína de soro de leite foi incluída por meio da interação eletrostática na superfície da micropartícula. Além disto, avaliou-se a influência do teor de cálcio e do grau de amidação da pectina na incorporação proteica, nos teores de umidade e na morfologia das micropartículas. As micropartículas produzidas por gelificação iônica, seguidas de recobrimento com proteínas do soro de leite (WPC) por interação eletrostática, foram as que apresentaram os melhores teores de umidade e proteína. Na segunda parte do estudo, partículas produzidas por gelificação iônica, utilizando pectina de baixo grau de esterificação amidada, foram recobertas com proteínas de soro de leite por interação eletrostática na tentativa de mimetizar a composição centesimal encontrada em náuplios de *Artemia*, alimento vivo comumente utilizado na criação intensiva de larvas de peixes. Após a produção, as partículas foram caracterizadas em relação à composição centesimal, tamanho médio e distribuição de tamanho, morfologia e comportamento de reidratação após secagem por liofilização. As matérias-primas utilizadas para a produção das partículas foram também caracterizadas quanto à composição centesimal e ao potencial zeta quando em solução. Adicionalmente, partículas otimizadas quanto à composição centesimal foram utilizadas em experimento de crescimento de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Lactobacillus acidophilus* foram acrescentados a uma das dietas e seu efeito avaliado no experimento biológico. Os teores de proteína, lipídio e umidade das partículas foram semelhantes aos dos náuplios de *Artemia*, com valores médios de 50, 23 e 85%, respectivamente. Partículas apresentaram forma esférica quando úmidas ou reidratadas, com uma distribuição de tamanho de 75-619  $\mu\text{m}$  e aglomeração após secagem. A reidratação das partículas secas foi instantânea, sem diferença de tamanho médio entre

partículas úmidas ou reidratadas. O experimento biológico mostrou que as larvas alimentadas com as dietas experimentais não apresentaram crescimento quanto ao peso e tamanho, em relação aos resultados observados para as larvas alimentadas com os náuplios de *Artemia* ou para uma dieta comercial usada como controle. As dietas testadas, incluindo as experimentais, náuplios de *Artemia* e dieta microencapsulada comercial, apresentaram elevada taxa de ingestão (>90%). As taxas de sobrevivência obtidas foram de 83,6%, 43,6%, 30,7% e 34,5%, para larvas alimentadas com náuplios de *Artemia*, dieta microencapsulada comercial, dieta experimental contendo o probiótico e dieta experimental, respectivamente, após 28 dias de experimento. No teste de estresse provocado pela exposição ao ar, larvas que receberam a dieta contendo o probiótico por 21 dias apresentaram menor porcentagem de mortalidade quando comparado à dieta comercial, porém ainda superior à observada com larvas alimentadas com *Artemia*. A possível inadequação nutricional das dietas experimentais, a baixa quantidade mineral e vitamínica presentes nas dietas experimentais e a possível indisponibilidade de nutrientes devido à associação forte desses nutrientes com o polissacarídeo utilizado poderiam ter produzido as taxas de crescimento nulas obtidas, indicando a necessidade de novos experimentos.

**Palavras-chave:** Microencapsulação, *Lactobacillus acidophilus*, larvas de peixe, gelificação iônica, interação eletrostática.

## ABSTRACT

The aim of this study was to produce microparticles by ionic gelation associated with electrostatic interaction containing important nutritionally constituents for fish larvae. In the first part of this study, microparticles were developed by pectin using ionic gelation and calcium chloride to form the matrices. The filling of the microparticles consisted of non-denatured or denatured whey proteins and soybean oil with paprika oleoresin. Filling particles consisting only of oil and whey protein was included through the electrostatic interaction on the surface of the microparticle. In addition, the influence of calcium and the amidation of pectin in the protein incorporation, moisture content and the morphology of the microparticles were evaluated. The microparticles produced by ionic gelation followed by coating with whey proteins (WPC) by electrostatic interaction were the ones that contained the best levels of moisture and protein. In the second part of the study, particles produced by ionic gelation using low methoxyl amidated pectin were coated with milk whey proteins by electrostatic interaction in an attempt to mimic the proximate composition found in *Artemia*, commonly used in the intensive rearing of fish larvae. The particles after production were characterized with respect to their chemical composition, average size and size distribution, morphology and rehydration behavior after freeze dried. The raw materials used for the production of particles were also characterized as its chemical composition and zeta potential in solution. Additionally, optimized particles as to chemical composition were used in an experiment of growth with larvae of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Lactobacillus acidophilus* has been added in one of the diets and its effect evaluated in this assay. The levels of protein, lipid and moisture of the particles were similar to those of *Artemia*, with mean values of 50, 23 and 85% respectively. Particles had spherical shape when wet or rehydrated with a size distribution from 75 to 619 mM and agglomeration after drying. Rehydration of the dry particles was instantaneous without difference in the average size between wet or rehydrated particles. The biological experiment showed that larvae fed the experimental diets showed no growth in weight and size, in relation to the results observed for larvae fed *Artemia* or with the commercial diet used as control. The diets tested, including the experimental diets, *Artemia* and the commercial diet showed a high rate of intake (> 90%). Survival rates were 83.6%, 43.6%,

30.7% and 34.5% for larvae fed with *Artemia*, commercial microencapsulated diet, experimental diet containing the probiotic and experimental diet, respectively, after 28 days of experiment. Larvae fed the diet containing the probiotic for 21 days showed a lower percentage of mortality in relation to the commercial diet, but still higher than that observed with larvae fed with *Artemia*. The possible nutritional inadequacy of the experimental diets, low ash content present in the experimental diets and possible lack of nutrients due to the strong association with the polysaccharide used in the diets may have produced low growth, indicating that more experiments are needed.

**Keywords:** Microencapsulation, *Lactobacillus acidophilus*, fish larvae, ionic gelation, electrostatic interaction.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE TABELAS .....	xvii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	4
1 Objetivo geral .....	4
2 Objetivos específicos .....	4
ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO .....	5
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
1 Microencapsulação .....	7
2 Pectina.....	10
3 Gelificação iônica .....	14
4 Coacervação complexa .....	15
5 Concentrado proteico de soro de leite.....	17
6 Larvicultura.....	18
7 Dietas inertes.....	21
7.1 Tamanho.....	22
7.2 Ingestão .....	23
8 Digestão .....	23
9 Probiótico.....	26
9.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	27
10 Probióticos e aquicultura.....	28
11 Concentrado proteico de peixe.....	31
12 Óleo de salmão.....	32
CAPÍTULO 2 - ESTUDO PRELIMINAR DA RETENÇÃO PROTEICA DE SORO DE LEITE EM PARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA.....	36
1 INTRODUÇÃO.....	36
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 Materiais .....	37
2.2 Caracterização físico-química dos materiais .....	37

2.2.1 Composição centesimal.....	37
2.2.2 Caracterização da pectina.....	38
2.2.3 Potencial zeta .....	38
2.3 Produção das microcápsulas .....	38
2.4 Preparo das microcápsulas.....	39
2.4.1 Microcápsulas contendo proteína no seu interior.....	39
2.4.2 Microcápsulas contendo proteína como material de cobertura.....	40
2.5 Secagem das microcápsulas.....	41
2.6 Caracterização físico-química.....	41
2.6.1 Composição centesimal.....	41
2.6.2 Morfologia e microestrutura .....	42
2.7 Análise estatística .....	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
3.1 Caracterização dos materiais.....	43
3.1.1 Caracterização das pectinas.....	44
3.1.2 Potencial zeta .....	45
3.2 Influência do processo térmico da proteína em emulsão e do teor de CaCl <sub>2</sub> na retenção proteica .....	47
3.3 Influência do teor de amidação da pectina na retenção proteica .....	49
3.4 Influência do tratamento térmico da proteína na retenção proteica.....	51
3.5 Morfologia e microestrutura das micropartículas .....	54
4 CONCLUSÕES .....	58
CAPÍTULO 3 - UTILIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> PARA ALIMENTAÇÃO DE LARVAS DE PACU ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) .....	61
1 INTRODUÇÃO.....	61
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
2.1 Materiais .....	63
2.2 Caracterização físico-química dos materiais .....	63
2.2.1 Composição centesimal.....	63
2.2.2 Caracterização da pectina.....	64
2.2.3 Potencial zeta .....	64

2.3 Dietas microencapsuladas.....	64
2.3.1 Produção.....	64
2.4 Caracterização físico-química das dietas microencapsuladas.....	65
2.4.1 Composição centesimal.....	65
2.4.2 Tamanho médio e distribuição de tamanho.....	66
2.4.3 Morfologia e microestrutura .....	67
2.5 Manutenção e preparo dos micro-organismos probióticos .....	67
2.6 Ensaio <i>in vivo</i> .....	68
2.6.4 Taxa de ingestão.....	69
2.6.5 Teste de exposição ao ar.....	70
2.6.6 Análise estatística.....	70
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	71
3.1 Caracterização das matérias-primas.....	71
3.2 Caracterização das partículas e adsorção proteica .....	73
3.3 Caracterização das dietas .....	74
3.4 Quantificação dos <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	79
3.5.1 Crescimento e taxa de ingestão .....	79
3.5.2 Taxa de crescimento específico e sobrevivência.....	83
3.5.3 Teste de exposição ao ar.....	86
4 CONCLUSÕES .....	87
CONCLUSÕES GERAIS .....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89
ANEXO I.....	107
ANEXO II .....	108
ANEXO IIa.....	109
ANEXO IIb .....	110
ANEXO III -.....	111
ANEXO IV .....	112

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Distribuição de recheio de uma microcápsula e de uma micropartícula.....09
- Figura 2** – Estrutura geral da pectina.....12
- Figura 3** – Estrutura “caixa de ovo” formada entre a pectina e os íons cálcio.....13

### CAPÍTULO 2

- Figura 1** – Potencial zeta das pectinas amidada e não-amidada.....45
- Figura 2** – Potencial zeta das soluções de proteína de soro de leite submetidas a diferentes tratamentos térmicos utilizados na elaboração das micropartículas.....46
- Figura 3** – Microscopia ótica e eletrônica de varredura das micropartículas contendo proteína do soro de leite (WPC) como constituinte da emulsão.....56
- Figura 4** – Microscopia ótica das micropartículas produzidas por gelificação iônica seguidas de interação eletrostática com o concentrado proteico de soro de leite (WPC) não-desnaturado.....57
- Figura 5** – Microscopia ótica das micropartículas produzidas por gelificação iônica seguidas de interação eletrostática com o concentrado proteico de soro de leite (WPC) desnaturado.....58

### CAPÍTULO 3

- Figura 1** – Influência do pH na carga elétrica (Potencial  $\zeta$ ) das soluções (0,5% p/p) de pectina e WPC não-desnaturado.....72
- Figura 2** – Microscopias das dietas utilizadas no ensaio biológico.....78
- Figura 3** – Desempenho de crescimento em comprimento total (mm) das larvas de pacu durante o período experimental .....80
- Figura 4** – Desempenho de crescimento em peso (mg) das larvas de pacu durante o período experimental.....81

<b>Figura 5</b> – Taxa de crescimento específico (%) das larvas de pacu durante o período experimental.....	83
<b>Figura 6</b> – Sobrevivência (%) das larvas de pacu durante o período experimental.....	84
<b>Figura 7</b> – Canibalismo (%) das larvas de pacu durante o período experimental.....	86

## **ANEXOS**

<b>ANEXO III</b> - Microscopia eletrônica de varreduras das dietas testadas.....	111
<b>ANEXO IV</b> - Fotografias das larvas de pacu nas diferentes fases de desenvolvimento durante as quatro semanas de experimento biológico.....	112

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1</b> – Composição centesimal (%) em base seca dos produtos utilizados para elaboração das micropartículas por gelificação iônica.....	43
<b>Tabela 2</b> – Teores de proteína nas microcápsulas produzidas por gelificação iônica contendo proteínas do soro de leite como constituintes da emulsão.....	47
<b>Tabela 3</b> – Teores de umidade das microcápsulas produzidas por gelificação iônica contendo proteínas do soro de leite como constituintes da emulsão.....	48
<b>Tabela 4</b> – Teores de proteína e umidade das micropartículas produzidas por gelificação iônica seguidas da coacervação complexa com WPC não-desnaturado.....	49
<b>Tabela 5</b> – Teores de proteína para cápsulas produzidas por gelificação iônica seguida de coacervação complexa.....	52

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1</b> – Composição centesimal (%) em base seca dos produtos utilizados, exceto para % de umidade.....	71
<b>Tabela 2</b> – Teores de proteína, umidade e tamanho médio das partículas úmidas produzidas a pH 4,0 com diferentes concentrações de WPC não-desnaturado.....	74
<b>Tabela 3</b> – Composição centesimal (%) em base seca das dietas experimentais, comercial e <i>Artemia</i> , exceto umidade.....	75
<b>Tabela 4</b> – Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ) das dietas úmidas e reidratadas.....	76
<b>Tabela 5</b> – Valores médios de taxa de ingestão (%) das dietas microencapsuladas pelas larvas de pacu no início e no final do experimento.....	82
<b>Tabela 6</b> – Mortalidade (%) das larvas de pacu após exposição ao ar ao 21º dia de alimentação.....	87

## **ANEXOS**

<b>ANEXO I</b> – Perfil de aminoácidos do WPC e dos náuplios de <i>Artemia</i> . Resultados em g/100g de amostra em base seca.....	107
<b>ANEXO IIa</b> – Perfil de ácidos graxos da dieta OS e do óleo de salmão utilizado para a elaboração da dieta.....	109
<b>ANEXO IIb</b> – Perfil de ácidos graxos da dieta DOSPro e do óleo de salmão utilizado para a elaboração da dieta.....	110

## INTRODUÇÃO

A microencapsulação pode ser considerada como um recobrimento de ingredientes de tamanho reduzido, com diferentes tipos de materiais. A escolha do material depende das funções que a micropartícula deva possuir como, por exemplo, resistir ao impacto causado pelas adversidades do meio em que a partícula será aplicada (luz, oxigênio, umidade, temperatura etc.), liberação específica do conteúdo em algum meio e melhora no manuseio do material encapsulado (SHAHIDI; HAN, 1993).

Essa liberação específica do recheio pode ocorrer por ruptura mecânica, temperatura, pH ou solubilidade do meio, biodegradação ou por difusão (REINECCIUS, 1995) e permite a variação de diversos fatores (ingredientes e procedimentos) que influenciam nas características finais do produto. A microcápsula pode ser formada por várias técnicas, e a escolha do método em particular é determinada, em grande parte, pela solubilidade dos componentes ativos e dos materiais carreados (ROSENBERG; YOUNG, 1993).

A gelificação iônica, ou ligação iônica de polieletrólitos, ocorre em condições brandas, é simples, rápida e de baixo custo. Envolve uma solução polimérica aquosa que, em contato com íons de baixa massa molar, interage formando um complexo. Alginato e pectina de baixo teor de metoxilação são muito usados como material de parede, sendo o íon cálcio o agente de reticulação mais utilizado. As características eletrostáticas e a formação de géis conferem às pectinas ótimas propriedades para serem utilizadas como material de parede para formação de microcápsulas (MESTDAGH; AXELOS, 1998).

A dependência do fornecimento de alimento vivo (rotíferos, náuplios de *Artemia*) como alimento inicial é o fator mais importante na larvicultura intensiva de peixes, em que os custos de produção destes contabilizam uma proporção significativa dos custos operacionais totais na larvicultura (LANGDON, 2003; JOMORI *et al.*, 2005). Assim, a substituição total ou parcial desses organismos vivos por dietas inertes torna-se crucial para a redução dos custos de produção, bem como para manter a qualidade e a produção constante das larvas. Pesquisas vêm sendo direcionadas para o desenvolvimento de dietas inertes que satisfaçam as necessidades nutricionais das larvas cultivadas, em substituição ao

alimento vivo, como dietas microencapsuladas (ÖNAL; LANDGON, 2000; YÚFERA *et al.*, 2002, 2003).

Rotíferos e *Artemia* são usados intensivamente como o alimento vivo dominante para estágios larvais de espécies de peixes de água doce e marinha. O fornecimento inconstante e a ocorrência de mudanças na composição bioquímica desses organismos (que variam de acordo com o local de coleta) levam, muitas vezes, a uma nutrição subótima das larvas (TESSER; PORTELLA, 2003).

As dietas microencapsuladas apresentam características muito interessantes, como a possibilidade de fornecer a dieta íntegra à larva, evitando a perda de nutrientes e da deterioração da qualidade de água dos tanques, entre outras. No entanto, o uso delas nem sempre apresenta bons resultados. Muitos autores relacionam este fato à baixa aceitação, assimilação e digestão dessas dietas, sendo ambos ligados diretamente à natureza intrínseca da partícula, como a textura, paladar, cor, formulação, tamanho, densidade e estabilidade em água (KOLKOVSKI, 2001; CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 2001).

No decorrer dos anos, várias estratégias foram adotadas a fim de modular a composição da microbiota intestinal, para obter um melhor crescimento, digestão, imunidade e resistência a doenças. Conseguir isso por meio de uma suplementação dietética de probióticos pode melhorar a parte nutricional para o peixe e também atuar como uma terapia contra os efeitos adversos dos antibióticos e outros medicamentos (NAYAK, 2010). Bairagi *et al.* (2002) determinaram que alguns micro-organismos, quando ingeridos pelos peixes, produzem enzimas digestivas, facilitando, assim, a utilização do alimento e a digestão. Esses efeitos benéficos dos probióticos adicionados na dieta também foram relatados por Bairagi *et al.* (2004) e Wang (2007).

Tendo em vista os benefícios potenciais de dietas microencapsuladas para alimentação de larvas de peixes, o seu desenvolvimento poderá contribuir para um bom crescimento das larvas, com custo reduzido. Portanto, é necessário produzir uma microcápsula com as características similares à *Artemia*, buscando maior desenvolvimento das larvas, assim como a adição de um probiótico para avaliar a sua influência em larvas de peixe. Este trabalho teve como objetivo desenvolver micropartículas para alimentação de larvas de peixe pela técnica de gelificação iônica, que possuam teores de proteína e

umidade similares ao alimento vivo, *Artemia*, para posterior ensaio de desenvolvimento *in vivo* com larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Adicionalmente, verificou-se a influência da adição do micro-organismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* à dieta microencapsulada no desenvolvimento, sobrevivência e resistência ao estresse das larvas.

## OBJETIVOS

### 1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi produzir micropartículas que mimetizem a composição centesimal dos náuplios de *Artemia* por meio da técnica de gelificação iônica e/ou interação eletrostática, utilizando proteínas do soro de leite como fonte proteica. Após a otimização, será incluído o probiótico *Lactobacillus acidophilus*. Partículas otimizadas contendo probiótico e óleo de salmão serão testadas em ensaio de desempenho com larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

### 2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos, pretende-se:

- Caracterizar as micropartículas produzidas em relação à capacidade de hidratação, tamanho e morfologia;
- Avaliar o efeito de pectina de baixo teor de esterificação amidada e não-amidada, diferentes quantidades de cálcio e diferentes concentrações das proteínas do soro do leite sobre a quantidade de sólidos totais, umidade e quantidade de proteína adsorvida pela micropartícula;
- Avaliar o potencial das micropartículas como substitutas parciais/integrais do alimento vivo por meio de ensaio *in vivo* com larvas de pacu (*P. mesopotamicus*);
- Avaliar o potencial do probiótico no desenvolvimento e resistência das larvas de pacu (*P. mesopotamicus*).

## ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

O trabalho foi dividido em capítulos, conforme descrito a seguir.

No Capítulo 1, “Revisão Bibliográfica”, são apresentados os fundamentos teóricos sobre microencapsulação, técnicas de gelificação iônica e coacervação complexa, matérias-primas utilizadas na elaboração das micropartículas, como o concentrado proteico de soro de leite e a pectina, larvicultura, dietas inertes e utilização de probióticos na aquicultura.

O Capítulo 2, “Estudo preliminar da retenção proteica de soro de leite em partículas obtidas por gelificação iônica”, apresenta os ensaios preliminares realizados para o desenvolvimento de uma partícula com teores de proteína e umidade semelhantes ao alimento vivo *Artemia*.

No Capítulo 3, “Utilização de micropartículas contendo *Lactobacillus acidophilus* para alimentação de larvas de pacu”, apresentam-se as composições centesimais das dietas elaboradas, assim como as suas morfologias, tamanho médio, capacidade de hidratação e resultados do ensaio *in vivo*, como desenvolvimento, sobrevivência, taxa de ingestão e resistência ao estresse.

**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1 Microencapsulação

A adição de ingredientes a alimentos, a fim de se obter uma melhora dos valores nutricionais, além de comprometer o sabor, a textura, a cor e o aroma, também pode fazer com que o alimento perca a sua viabilidade por provocar reações de oxidação. Uma das maneiras de amenizar ou evitar essas características indesejáveis é o uso da técnica de microencapsulação (DUBEY; SHAMI; BASHKER RAO, 2009).

A microencapsulação originou-se a partir da idealização de um modelo celular, sendo o núcleo envolvido por uma membrana semipermeável, que o protege do meio externo e, simultaneamente, controla a entrada e a saída de substâncias na célula. A microencapsulação em si, de maneira similar, tem uma parede que isola o material ativo e controla a liberação sob estímulo específico. Portanto, tem o propósito de proteger seu conteúdo do ambiente, que pode ser adverso, permitindo trocas pela membrana (JIZOMOTO *et al.*, 1993).

As primeiras aplicações de microencapsulação datam da década de 1950, quando foram produzidas microcápsulas por coacervação complexa. Foram adicionadas gelatina e goma arábica a papéis de cópia sem carbono, que levavam, em suas folhas de papel comum, a tinta microencapsulada. Ao serem pressionadas, as microcápsulas rompiam-se, liberando a tinta contida em seu interior (RÉ, 2000; DUBEY; SHAMI; BASHKER RAO, 2009).

A microencapsulação é uma técnica capaz de embalar sólidos, líquidos ou substâncias gasosas em escala de tamanho micro. A técnica permite que as cápsulas liberem gradualmente seu conteúdo de recheio com taxas controladas, sob influência de condições específicas, incluindo quebra por calor, hidratação excessiva, difusão e pressão (PEPPAS; BRANNON-PEPPAS, 1996; ANAL; STEVENS, 2005; KAILASAPATHY; MASONDOLE, 2005).

A microcápsula apresenta, geralmente, uma forma esférica, constitui-se por uma membrana semipermeável fina, porém resistente, ao redor de um núcleo sólido ou líquido, e pode possuir um diâmetro que varia de alguns microns até 1 milímetro (ANAL; SINGH, 2007). As microcápsulas podem liberar, gradualmente, seus ingredientes ativos, sendo rompidas por diversos meios, incluindo o calor, a hidratação excessiva, a difusão e a pressão (PEPPAS; BRANNON-PEPPAS, 1996).

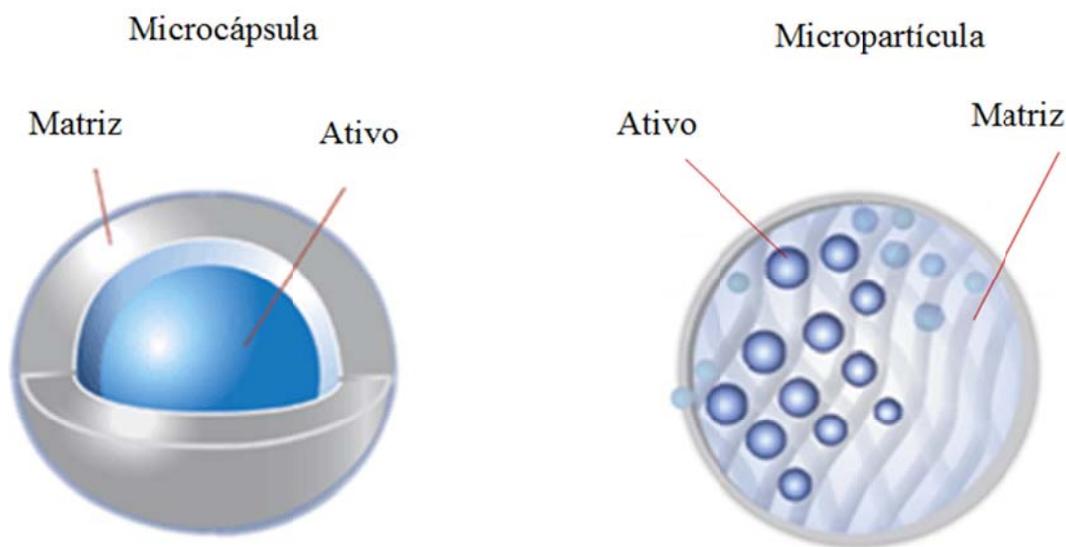
Atualmente, esta tecnologia é utilizada em diferentes áreas, como, por exemplo, indústria farmacêutica, tintas e indústria de alimentos. Dentro da área de alimentos, ela é utilizada na proteção contra adversidades do meio (temperatura, umidade), na melhoria da estabilidade de flavorizantes, enzimas, micro-organismos, vitaminas, ácidos graxos, minerais e peptídeos, além de ser utilizada também para melhorar o sabor e a estabilidade de medicamentos e como barreira contra mau odor e sabor (DZIEZAK, 1988; LISERRE; RÉ; FRANCO, 2007). Além disso, também pode atuar na transformação do estado físico do material encapsulado (líquido para sólido), diminuir características indesejáveis que o produto possa apresentar (pH, cor, aroma, sabor) e preservar a qualidade nutricional desse produto (SHAHIDI; HAN, 1993; RÉ, 1998). No caso de fármacos em que a liberação deve ocorrer no estômago ou intestino, a microencapsulação permite uma máxima absorção dos compostos com um mínimo de reações adversas (VILLENA *et al.*, 2009).

A composição das cápsulas varia conforme a aplicação a que se destinam, podendo mudar de comestíveis (carboidratos, proteínas) a polímeros biodegradáveis ou sintéticos. Diversos polímeros de grau alimentício, como alginato, quitosana, carboximetilcelulose, carragena, gelatina e pectina, são utilizados na indústria de alimentos para a formação de microcápsulas por meio de técnicas distintas (ANAL; SINGH, 2007). As propriedades de liberação do material de parede também devem ser consideradas e influencia a estabilidade dos compostos contra a oxidação (ARSHADY, 1993; SINKO; KHON, 1993).

A escolha do método para encapsulação depende do tamanho da partícula desejada, propriedades físicas e químicas da parede e do recheio e aplicação do produto final (AZEREDO, 2005). Os métodos para realizar a encapsulação podem ser divididos em: químicos, por meio de inclusão molecular ou polimerização interfacial; físicos, como o *spray drying*, *spray chilling*, *spray colling*, extrusão, cocristalização e liofilização; e os físico-químicos, que incluem a coacervação, separação por fase orgânica e formação de

lipossomas (JACKSON; LEE, 1991). Além dessas características, as partículas produzidas pelos diferentes métodos de encapsulação possuem características diversas entre si de retenção do recheio e também podem apresentar comportamento de liberação diferenciado (ALVIM, 2005).

Dois tipos básicos de estruturas são formados pelo processo de microencapsulação, diferenciando-se entre si pela distribuição do recheio. A estrutura formada pode ser do tipo “reservatório”, no qual se nota que o núcleo está visivelmente concentrado na região central, mononucleado com o conteúdo (recheio), envolvido por uma parede (filme) definida e contínua, que recebe o nome de microcápsula (Figura 1). Quando o conteúdo se distribui uniformemente em uma estrutura tipo “esponja” ou matriz, observa-se uma partícula multinucleada, que recebe o nome de microesfera ou micropartícula (Figura 1). O tipo de estrutura formada influi na quantidade e no comportamento da liberação do conteúdo (THIES, 1995; AZEREDO, 2005).



**Figura 1** – Distribuição de recheio de uma microcápsula e de uma micropartícula Fonte: Alvim (2010, p. 4).

As microcápsulas podem variar de tamanho, indo de micrômetros até milímetros, ficando, normalmente, entre 0,2 e 500µm. A forma das microcápsulas também é bastante variável em razão do método e agente encapsulante utilizado para o seu preparo (JACKSON; LEE, 1991). Esses fatores podem ser modificados para que se ajustem às características desejadas à aplicação das microcápsulas, tais como: composição, mecanismo de liberação, tamanho da partícula, morfologia e custo (DESAI; PARK, 2005).

Diversos materiais de parede são utilizados para a encapsulação, como, por exemplo, as gomas (goma arábica, ágar, alginato, carragena), os carboidratos (amidos, pectina, dextrinas, xarope de milho, sacarose), as celuloses (carboximetilcelulose, etil, metil, acetil e nitro-celulose), os lipídeos (cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, mono e diglicerídeos, óleos e gorduras hidrogenadas) e as proteínas (glúten, caseína, isolado proteico de soro de leite, gelatina e albumina) (SHAHIDI; HAN, 1993).

Ao selecionar o material de parede a ser utilizado é preciso levar em consideração alguns aspectos importantes para obter a cápsula com as características desejadas, tais como: as propriedades mecânicas das cápsulas, a resistência ao ataque químico e microbiano, a forma física e o tamanho das partículas, as características de superfície (carga, hidrofobicidade, absorção de outras substâncias) e sua permeabilidade (TREVISAN, 1990). Além disso, é necessário observar que os materiais de parede e recheio não devem reagir e nem serem solúveis entre si e, preferencialmente, devem apresentar polaridades opostas (CARDOSO, 2000).

## **2 Pectina**

Os carboidratos estão distribuídos pela natureza nos mais diversos alimentos e englobam substâncias com estruturas e propriedades funcionais diversas. Devido a diferenças em relação ao seu peso molecular, os carboidratos são divididos em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

As gomas podem ser chamadas de hidrocoloides ou biopolímeros e são classificadas como polissacarídeos. Quando adicionadas a alimentos processados, atuam como espessantes, agentes modificadores de textura, estabilizantes de emulsões e espumas,

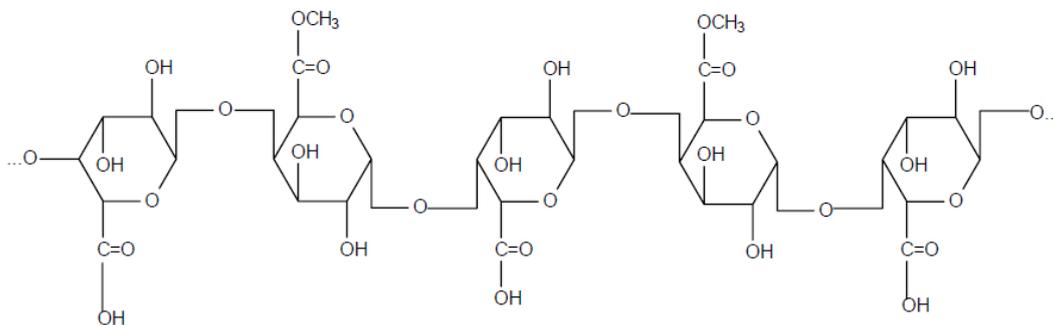
gelificantes na suspensão de outros componentes entre outros fins. Entre os principais agentes gelificantes encontram-se: gelatina, alginato, pectina, carragena, ágar, amido e metil-celulose (BEMILLER; WHISTLER, 1996).

A pectina possui um caráter hidrofílico em razão da presença de grupos polares, possuindo a capacidade de envolver grande quantidade de água e, pelo fato de ser um coloide, ao ligar-se com a água, produz uma solução viscosa. Em razão disso, ela é comumente utilizada no preparo de geleias, doces, sucos etc. (BOWERS, 1992).

A pectina é um polímero natural, uma vez que é encontrada na maioria das plantas. A maior fonte desse polissacarídeo são as cascas de frutas cítricas e o bagaço de maçãs. Existem diversas fontes como, por exemplo, a beterraba e a cenoura, porém algumas podem apresentar propriedades estruturais indesejáveis. A pectina é produzida durante os estágios iniciais do desenvolvimento das plantas e continua presente durante o desenvolvimento do fruto (THAKUR; SINGH; HANDA, 1997; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006; MESBAHI; JAMALIAN; FARAHAHNAKY, 2005).

A pectina é uma fibra insolúvel presente em frutas e vegetais e, em razão disso, é benéfica para a saúde, uma vez que uma dieta rica em fibras possui benefícios comprovados para a saúde. Existem evidências claras que a pectina pode ajudar na diminuição dos níveis de colesterol, glicose e, ainda, possuir propriedades anticancerígenas (YAMADA, 1996; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

As pectinas podem apresentar algumas diferenças entre si, porém esse polímero é rico em ácidos galacturônicos, sendo estipulado que deve conter, no mínimo, 65% desses (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). A pectina contém, na sua estrutura, unidades carboxílicas esterificadas do ácido galacturônico com grupos metoxílicos através de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, formando cadeias lineares interrompidas pela presença do açúcar ramnose a intervalos periódicos, como pode ser visto na Figura 2 (BOBBIO; BOBBIO, 1989; MAY, 2000).



**Figura 2** – Estrutura geral da pectina. Fonte: Bobbio e Bobbio (1989).

Além disso, é um poliácido e seu  $pK_a$  aproximado é 2,9 (RALET *et al.*, 2001), apresentando pouca carga negativa em pH baixo e alta em pHs elevados. A associação da pectina (poliânion) com um policátion forma um produto insolúvel (NUSSINOVITCH, 1997).

O grau de esterificação possui um profundo impacto nas propriedades funcionais das pectinas (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). A esterificação pode ser feita parcialmente, utilizando-se métodos químicos ou enzimáticos. No processo químico, há a utilização de ácidos, álcalis ou amônia, gerando pectinas convencionais ou amidadas (BARRERA *et al.*, 2002).

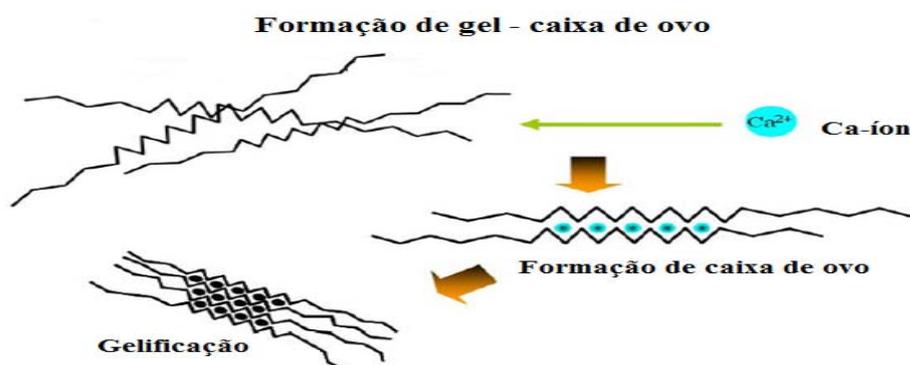
Pectinas usualmente são classificadas em pectinas de baixo e alto teor de esterificação (MAY, 2000), sendo que o grau de esterificação é a porcentagem de ácidos galacturônicos que são metilesterificados (DZIEZAK, 1988). O grau de metoxilação de 50% é o parâmetro de referência. Aquelas que apresentam um teor inferior a este são classificadas como pectinas de baixo teor de esterificação, e as que apresentam um teor superior, pectinas de alto teor de esterificação (TURQUOIS *et al.*, 1999).

A gelificação da pectina de baixo teor de esterificação ocorre por meio da formação de ligações entre íons carboxílicos da pectina e íons bivalentes (geralmente cálcio) ou tetravalentes para alto teor, que atuam como ligantes entre as cadeias de pectina. Elas envolvem ligações quelantes intermoleculares do cátion, induzindo à formação de macromoléculas agregadas (KOHN, 1975).

Pectinas amidadas possuem boas propriedades de gelificação em condições com baixos teores de açúcares. O método mais comum para amidagem da pectina é por meio da amidagem dos grupos metil esterificados em reações heterogêneas com amônia e metanol (SINITSYA *et al.*, 2000). A pectina amidada apresenta algumas vantagens em relação à pectina não-amidada, uma vez que há formação de géis mais firmes, necessitando, portanto, de uma menor concentração de cálcio para gelificar (BOBBIO; BOBBIO, 1989).

A formação de gel entre a pectina e os íons cálcio depende de parâmetros intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos que influenciam as características reológicas do gel incluem a massa molar média do polímero e as características estruturais dos domínios lineares e ramificados (FRAEYE *et al.*, 2010). O gel de pectina de baixo teor de esterificação apresenta uma estrutura tridimensional, na qual existem dois ácidos galacturônicos dispostos paralelamente, formando a ponte entre íons cálcio e as carboxilas livres (BRAUDO, 1991).

Um dos modelos propostos para esta ligação é o de “caixa de ovo” (Figura 3), elaborado por Rees (1972), uma vez que, segundo este modelo, seriam necessárias duas cadeias de quatorze ou mais unidades de ácido galacturônico, alinhadas simetricamente, paralelas e de forma oposta. Os íons cálcio atuam como estabilizantes dessa conformação, pois formam ligações quelantes com os átomos de oxigênio das duas cadeias galacturônicas, resultando em uma estrutura de cavidades. Isso implica que, de todos os elementos estruturais da pectina, somente as porções não-metilesterificadas estejam envolvidas na dimerização das ligações com o cálcio (NGOUÉMAZONG *et al.*, 2011).



**Figura 3** – Estrutura “caixa de ovo” formada entre a pectina e os íons cálcio. Fonte: Rees (1972).

Pectinas de baixo teor de esterificação formam géis na presença do íon cálcio à temperatura ambiente e a um pH próximo a 3,5. A sensibilidade ao  $\text{CaCl}_2$  diminui abaixo do pH 3,5 e torna-se insignificante abaixo do pH 2. Em um pH intermediário entre essas faixas, a gelificação ocorre normalmente. A amidação da pectina não influencia na sensibilidade ao  $\text{CaCl}_2$ , porém favorece a gelificação ácida induzida (CAPEL *et al.*, 2006).

### 3 Gelificação iônica

A formação de partículas de géis a partir de polissacarídeos vem sendo estudada, uma vez que este sistema é capaz de formar partículas com textura suave, ser processado de forma fluida e possuir a capacidade de adequar as propriedades moleculares, assim como o tamanho e a forma. Os hidrocoloides são compatíveis com essas características, além de possuírem a vantagem de serem fontes naturais de polissacarídeos (BUREY *et al.*, 2008).

A gelificação pode ocorrer quando alguns polímeros entram em contato com íons, havendo, geralmente, uma ligação entre os cátions dos íons bivalentes e as cargas negativas do polissacarídeo. A preparação de microcápsulas utilizando a técnica de gelificação iônica envolve uma solução polimérica aquosa, com íons de baixa massa molar. Dessa maneira, polieletrólitos de cargas opostas interagem, formando um complexo. Para que a gelificação iônica seja eficiente, deve ocorrer a formação de uma estrutura que resulte em uma matriz impermeável para certos compostos orgânicos, bem como para o oxigênio (THIES, 1995; BUREY *et al.*, 2008).

A formação do gel, o volume, a estabilidade e a porosidade das cápsulas podem ser influenciados pela concentração de polissacarídeo e dos cátions, pela força iônica e pelo pH. Essas características podem influenciar na difusão de solutos para dentro e para fora da matriz polimérica (MESTDAGH; AXELOS, 1998).

Com a gelificação iônica, é possível fabricar cápsulas que mantenham dietas proteicas ricas em carboidratos e incorporar partículas insolúveis em água na sua composição com o uso de hidrocoloides (VILLAMAR; LANGDON, 1993; MUKAI-CORRÊA *et al.*, 2004).

O encapsulamento que utiliza polissacarídeos, como alginato e pectina, é comumente realizado pela dispersão da solução de alginato-pectina em um meio de gelificação, como, por exemplo, o cloreto de cálcio. O contato entre o polissacarídeo e o íon cálcio na solução induz à polimerização interfacial iônica imediata por meio de uma ligação dos resíduos galacturônicos, formando uma partícula polianiônica (DAI; WANG; ZHAO, 2005).

Microcápsulas de alginato de cálcio possuem a vantagem de serem processadas de uma maneira muito branda e manterem a atividade biológica de moléculas, porém são muito porosas e possuem baixa capacidade de retenção quando comparadas a outras técnicas. Ao adicionar um polication (proteína, quitosana) à gelificação, o polication induz a formação de complexo poliônico-polication, estabilizando a rede de gel iônico, reduzindo a permeabilidade do alginato-pectina e melhorando a estabilidade química e mecânica das partículas (HUGUET; DELLACHERIE, 1996; ALLAN-WOJTAS *et al.*, 1999; CHANDRAMOULI *et al.*, 2004; DAI; WANG; ZHAO, 2005).

#### **4 Coacervação complexa**

A combinação de proteínas e polissacarídeos é muito utilizada na indústria de alimentos, e esta mistura pode apresentar comportamentos distintos, tais como, ser completamente miscível, ser incompatível ou formar complexos (TURGEON; LANEUVILLE, 2009).

O processo de coacervação complexa envolve pelo menos dois polímeros de cargas distintas em condições específicas. Na maioria dos casos, os biopolímeros incluem uma proteína e um polissacarídeo (JUN-XIA; HAI-YAN; JIAN, 2011).

As interações eletrostáticas entre os biopolímeros podem ser afetadas por diversos parâmetros físico-químicos, tais como pH, força iônica e temperatura, e estes, por fim, afetam a formação do complexo (WEINBRECK; TROMP; DE KRUIF, 2004; JONES; MCCLEMENTS, 2010a). Sabe-se que o pH exerce uma grande influência na força da interação eletrostática, uma vez que ele determina a densidade de cargas da solução. Essa interação pode levar à formação de complexos insolúveis, principalmente quando o pH

encontra-se acima do ponto isoelétrico da proteína, estando esta carregada negativamente como um polieletrólito (DUBIN; GAO; MATTISON, 1994; DE VRIES WEINBRECK; DE KRUIF, 2003). Já quando o pH se encontra abaixo do ponto isoelétrico da proteína, esta está carregada positivamente, facilitando a interação com as cargas negativas do polissacarídeo (PRATA, 2006).

A situação otimizada ocorre quando existe um equilíbrio entre cargas positivas e negativas, ou seja, em uma faixa de pH na qual o ponto isoelétrico da proteína e o pKa do polissacarídeo estejam com uma quantidade de cargas parecidas, mas de sinais opostos, de modo que a maior parte dos sítios ativos esteja ligada (SCHMITT *et al.*, 2000; PRATA, 2006; LIU *et al.*, 2010).

O ponto isoelétrico da  $\beta$ -lactoglobulina, principal proteína do WPC, é próximo a 4,7, sendo também relatado na faixa de 4,7 a 5,2 (HARNSILAWAT; PONGSAWATMANIT; MCCLEMENTS, 2006; SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008). Como anteriormente mencionado, a pectina é um poliácido, e seu pKa é de cerca de 2,9 (RALET *et al.*, 2001), portanto, para que haja uma melhor interação eletrostática entre a pectina e o WPC, é desejável que o pH esteja na faixa entre 3,0 a 4,5.

Mounsey *et al.* (2008) demonstraram que complexos solúveis e insolúveis de  $\beta$ -lactoglobulina e quitosana podem ser formados dependendo das condições de pH e força iônica. A separação de fases de dois polímeros em água ocorre se existir uma atração eletrostática. A coacervação complexa é causada pela interação de colóides de cargas opostas entre si (DE KRUIF; WEINBRECK; VRIES, 2004).

Essas interações atrativas entre os biopolímeros podem ser de natureza fraca, como ligações iônicas, de hidrogênio ou hidrofóbicas, porém podem ser ligações específicas, nas quais há uma grande intensidade e costumam ser permanentes, como as ligações covalentes (ZUCKERKANDL, 1975). Há evidências de que as principais forças envolvidas nas interações são de natureza eletrostática, nas quais há ligações entre íons (IMESON; LEDWARD; MITCHELL, 1997).

## 5 Concentrado proteico de soro de leite

As proteínas de soro de leite apresentam quase todos os aminoácidos indispensáveis, e estes se encontram em excesso às recomendações para humanos, exceto pelos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina), que não aparecem em excesso, mas atendem às recomendações para todas as faixas etárias. Apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (SGARBIERI, 2004).

As proteínas do soro de leite são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, estimulando a síntese de proteínas sanguíneas e teciduais (SGARBIERI, 2004). Além disso, são utilizadas em produtos alimentícios devido ao seu alto teor nutricional, habilidade de formar géis, emulsões e espumas (BEAULIEU *et al.*, 2002).

Essas proteínas são muito estudadas, não somente devido ao seu valor nutricional superior ao da maioria das proteínas, mas também por possuírem um alto conteúdo de aminoácidos sulfurados que apresentam funções antioxidantes (SINHA *et al.*, 2007).

Quando o soro de leite é seco por atomização, ele apresenta uma composição de, aproximadamente, 10% de cinzas, 1% de gordura, 76% de lactose e 13% de proteínas. O produto obtido após essa última concentração é denominado de concentrado proteico do soro de leite, utilizado na elaboração de diversos produtos, tais como: lacteos, produtos cárneos, fórmulas infantis e produtos de panificação, devido aos seus efeitos emulsificantes, espessantes e antialérgicos (PELEGRINE; GASPARETTO, 2003).

As proteínas do soro de leite representam cerca de 20% das proteínas totais do leite. A  $\alpha$ -lactalbumina e a  $\beta$ -lactoglobulina correspondem a 70-80% das proteínas totais do soro, porém, além destas, são encontradas a soralbumina, imunoglobulinas, proteose-peptonas, lactoferrina, transferrina e enzimas (SGARBIERI, 1996). Essas proteínas são compactas, apresentam moléculas globulares, seus resíduos ácidos/básicos hidrofóbicos/hidrofílicos são distribuídos uniformemente ao longo da cadeia polipeptídica e essas proteínas apresentam inúmeras ligações dissulfídicas (HEELAN; CORRIGAN, 1998).

A  $\beta$ -lactoglobulina é uma proteína pequena, solúvel em solução de sal, como as globulinas, possui 162 resíduos de aminoácidos, é desnaturada com o calor e pode formar

agregados, dependendo do pH e da concentração de cálcio. A um pH neutro, um calor superior a 30°C causa uma forma dissociada de dímero, um monômero. Em pHs muito baixos, a  $\beta$ -lactoglobulina se encontra em posição fechada, inibindo ou impossibilitando ligações. Já em pHs elevados, a sua estrutura encontra-se aberta, permitindo que ligantes penetrem em suas ligações hidrofóbicas (KONTOPIDIS; HOLT; SAWYER, 2004).

O aquecimento do concentrado proteico de soro de leite é crítico, pois pode causar a desnaturação das proteínas, alterando as suas propriedades funcionais. Na temperatura ambiente, as moléculas de  $\beta$ -lactoglobulina nativa encontram-se em diversas estruturas quaternárias, como monômeros, dímeros e octômeros, dependendo do pH da solução e da composição iônica. Quando a  $\beta$ -lactoglobulina é aquecida, os oligômeros tendem a se dissociar a monômeros; quando o aquecimento é superior a 70°C, há uma exposição dos grupos hidrofóbicos e dos resíduos internos de cisteína (MISHRA; MANN; JOSHI, 2001; JONES; MCCLEMENTS, 2010b).

## **6 Larvicultura**

Na América do Sul, a aquicultura vem acompanhando o crescimento da aquicultura mundial, que cresce 11% ao ano na última década. Este crescimento está associado à demanda crescente de pescados para uma população também em ascensão, refletindo, assim, em um aumento do cultivo e pesca de peixes nativos de água doce (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2004).

O Brasil, devido ao seu perfil hidrográfico, possui destaque como um dos países com maior potencial para a expansão da aquicultura, uma vez que a demanda mundial por alimentos de origem aquática vem aumentando não somente devido à expansão populacional, mas também devido à preocupação do aumento da ingestão de alimentos saudáveis (VALENTI *et al.*, 2002; FAO, 2004). Com isso, há necessidade de desenvolver novos métodos que possibilitem a produção de espécies nativas, levando a estudos voltados principalmente à alimentação e nutrição de peixes, uma vez que representam até 60% do custo total da produção (ABIMORAD, 2009). Além disso, houve um crescimento no desenvolvimento de dietas para peixes e crustáceos cultivados em viveiros. Essa tendência

vem sendo particularmente notada nos países em desenvolvimento, com o progresso de sistemas agrícolas intensivos (FAO, 2009).

O Brasil possui um potencial hídrico e climático favorável para o cultivo de diversas espécies de peixes (BEERLI; LOGATO; FREITAS, 2004). O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um peixe de água doce, apresentando grande potencial para a aquicultura, uma vez que a espécie apresenta hábito alimentar onívoro, fácil manejo para criação, rápido crescimento, carne com boa qualidade e uma boa aceitação pelo mercado consumidor (JOMORI, 1999; JOMORI *et al.*, 2003).

O pacu é uma espécie ovulípara, com desova total, e o seu período reprodutivo ocorre nos meses em que há temperaturas mais elevadas. Geralmente a produção dos juvenis de pacu é feita de maneira induzida, e a incubação dos ovos é realizada em temperatura entre 25 e 27°C. Logo após a eclosão, o pacu apresenta um peso médio de 0,12 mg e comprimento total de 4,4 mm (FURAYA, 2001; CEMIG; CETEC, 2000).

Apesar dos aprimoramentos nas técnicas de reprodução, alimentação e manejo, a larvicultura de peixes nativos ainda apresenta problemas que devem ser resolvidos, principalmente em relação aos fatores que interferem na sobrevivência das larvas (condições ambientais inadequadas, falta de alimentação natural em quantidade e qualidade e falta de alimentação formulada que substitua a natural), o que torna a larvicultura um ponto crítico na produção de grandes quantidades de juvenis (BEERLI; LOGATO; FREITAS, 2004; BOCK; PADOVANI, 2000).

A criação da maioria das larvas de pacu, no Brasil, é feita de maneira semi-intensiva em tanques abertos, ou seja, as larvas são transferidas para tanques previamente preparados e fertilizados logo após a abertura da boca. Em geral, a sobrevivência é baixa, dificultando uma produção em grande escala (JOMORI *et al.*, 2003).

O sistema intensivo consiste na criação de larvas em laboratório, onde as larvas são mantidas em tanques livres de predadores, recebendo uma grande oferta de alimento vivo de boa qualidade. Devido a isso, o sistema de larvicultura intensiva é uma boa alternativa para melhorar os níveis de sobrevivência durante o período de desenvolvimento inicial, uma vez que as taxas de sobrevivência são superiores (80-95%) às obtidas em sistemas semi-intensivos (20%) (JOMORI *et al.*, 2003).

O vitelo é uma glicolipofosfoproteína que está incorporada aos ovócitos durante o seu desenvolvimento nas fêmeas e durante todo o período embrionário. É a única fonte de nutrientes para as fases iniciais do desenvolvimento. Mesmo após a eclosão, as larvas ainda utilizam o vitelo embrionário como alimentação endógena por algum tempo, até a sua total exaustão, e esta fase geralmente é concomitante com a abertura da boca das larvas (SANTOS; GODINHO, 1996; HIRAMATSU *et al.*, 2002; HILTON; POORTENAAR; SEWELL, 2008; KAMLER, 2008).

A larva começa a buscar alimentação exógena quando a vesícula gasosa se enche de ar e o saco vitelínico encontra-se com 20 a 30% da sua capacidade (BOCK; PADOVANI, 2000). Ao final da utilização do vitelo, as larvas devem encontrar fontes exógenas de alimento, e esta fase da exaustão do vitelo é um período crítico, no qual ocorrem as mais altas mortalidades nas diversas espécies de peixes (KAMLER, 2008; FERREIRA *et al.*, 2009). Quando não há disponibilidade adequada de alimento, além de taxa de sobrevivência reduzida, pode haver crescimento lento (FERREIRA *et al.*, 2009).

Os alimentos mais utilizados no cultivo de larvas de peixes são alimentos vivos, como microalgas, rotíferos e principalmente *Artemia*. O custo de ofertar às larvas alimento vivo geralmente é alto, devido ao gasto com a parte operacional para eclosão de cistos (LANGDON, 2003).

Além de redução de custos, o desenvolvimento de dietas inertes é positivo por ser mais fácil ao uso, pois não necessita do manejo diário exigido pelo alimento vivo e por possuir composição estável, enquanto a composição do alimento vivo pode variar de acordo com as condições do meio (ENGROLA *et al.*, 2009; MURRAY *et al.*, 2010). Além disso, os altos níveis de bactérias patogênicas associadas com os alimentos vivos podem afetar negativamente a saúde das larvas de peixes (CURNOW *et al.*, 2006).

Diversos processos podem ser empregados para produção de alimentos inertes. Dentre eles, a microencapsulação vem despontando como alternativa potencialmente interessante na obtenção de dieta que apresente boa aceitação e manutenção do crescimento para as larvas de peixe (LANGDON, 2003).

## 7 Dietas inertes

Náuplios de *Artemia* são comumente usados como alimento vivo nos estágios larvais de peixes de água doce e marinha. Na década de 1980, verificou-se que os custos relacionados ao alimento vivo tais como, infraestrutura, mão de obra e energia representavam uma parte significativa dos custos da produção de larvas, o que levou a gerar um grande interesse em elaborar dietas formuladas em tamanho micro como uma alternativa econômica ao alimento vivo (KOLKOVSKI; KOVEN; TANDLER, 1997).

Além disso, o alimento vivo, apesar de promover melhor crescimento e sobrevivência para as larvas, possui desvantagens quando usado extensivamente, como alto custo e variação do perfil nutricional (CHU; OZKIZILCIK, 1999; LU *et al.*, 2008). Ainda na década de 1980, foram desenvolvidas microdietas para peixes de água doce sem a suplementação de alimento vivo, que apresentaram resultados satisfatórios em relação ao tamanho das dietas e desenvolvimento das larvas (KOLKOVSKI; ARIELI; TANDLER, 1996).

Diversas dietas vêm sendo desenvolvidas, porém as razões pelas quais não se obtém sucesso no desenvolvimento e sobrevivência das larvas semelhante ao alimento vivo ainda não são bem elucidadas. Acredita-se que diversos fatores podem influenciar para isso, tais como dificuldade para digestão, tipo de ingredientes utilizado, composição nutricional, atratividade e cor (LANGDON, 2003).

Distintas técnicas foram testadas para a elaboração de microdietas, entre elas encontram-se partículas elaboradas com gelatina, zeína, alginato, carboximetilcelulose ou carragena como materiais de parede. Além destas, também existem partículas de proteínas, lipídicas ou mecanicamente aglomeradas e misturadas (KVALE *et al.*, 2006). Uma das técnicas de produção de partículas é por meio da polimerização interfacial. No entanto, apesar de produzir microcápsulas com boa retenção do material encapsulado, para a sua elaboração, é necessária a utilização de solventes orgânicos, o que acaba tornando o processo oneroso (YÚFERA; PASCUAL; FERNÁNDEZ-DÍAZ, 1999).

A microencapsulação produz micropartículas estáveis em água com forma regular, porém podem apresentar problemas para serem digeridas (CAHU; ZAMBONINO-

INFANTE, 2001). A capacidade de as larvas quebrarem as cápsulas está relacionada com a espessura e com o material de revestimento, sendo que microcápsulas com a parede menos rígida oferecem bom sistema para o desenvolvimento de dieta inerte (FERNÁNDEZ-DÍAZ; YÚFERA, 1995; YÚFERA; FERNÁNDEZ-DÍAZ, PASCUAL, 2005).

Dietas microencapsuladas contendo carragena ou alginato, como material de parede, e cálcio, como agente de reticulação, foram testadas em peixes de água doce e apresentaram taxas de ingestão de aproximadamente 70% (GUTHRIE *et al.*, 2000). Um dos métodos de produção dessas cápsulas é a gelificação iônica, que demonstrou ser efetiva quanto à estabilidade em água, sendo quebradas e digeridas por algumas espécies de peixes de água doce (LÓPEZ-ALVARADO; LANGDON; TESHIMA, 1994; GUTHRIE *et al.*, 2000). Essa técnica de produção de micropartículas é simples, não envolve o uso de solventes orgânicos ou temperatura e pHs drásticos, o que a torna de baixo custo em comparação às demais técnicas e também em relação ao alimento vivo, devido à infraestrutura exigida para a sua produção (VILLAMAR; LANGDON, 1993; MUKAI-CORRÊA, 2008).

Para se obter sucesso na alimentação de larvas, é preciso levar em consideração diversos fatores relacionados à dieta. A partícula deve ser visível e capturável pelas larvas, ou seja, cor, forma, tamanho, velocidade de deposição no fundo do tanque e propriedades de liberação de atrativos são fatores importantes a serem considerados. Além disso, as larvas devem ser capazes de digerir as partículas, de absorver e de assimilar os nutrientes para terem bom crescimento e sobrevivência (KVALE *et al.*, 2006).

## 7.1 Tamanho

As dietas devem ser preparadas como micropartículas, para que o tamanho seja adaptado à boca da larva. Sugere-se a utilização de dietas com faixa variada de tamanhos, como, por exemplo, as dietas utilizadas em experimentos com *sea bass* (*Dicentrarchus labrax*), nas quais os tamanhos foram de 50-125µm em primeira alimentação, seguidas por 125-200µm do dia 14 ao dia 25 e, então, 200-400µm até o dia 40 (CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 1994). Partículas muito pequenas (<50µm) não são facilmente detectadas pelas

larvas, enquanto as maiores são difíceis de serem ingeridas (CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 2001).

Estudo realizado por Fernández-Díaz, Pascual e Yúfera (1994) demonstrou que larvas com menos de 4,5mm de comprimento total selecionam partículas com tamanho entre 50 e 150 $\mu$ m, larvas um pouco maiores selecionam partículas com 150-250 $\mu$ m e larvas com 6,0mm ingerem partículas maiores que 250 $\mu$ m.

## 7.2 Ingestão

A ingestão da dieta é desencadeada por estímulos visuais e químicos. A intensidade da luz e a cor das micropartículas e dos tanques são essenciais para a ingestão. Alguns pigmentos, como astaxantinas, foram incorporados às dietas, visando mais à melhora na visibilidade da partícula do que ao valor nutricional (CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 2001). Aminoácidos, tais como, alanina, glicina, arginina e betaína, foram identificados como eficientes estimuladores químicos para larvas (KOLKOVSKI; KOVEN; TANDLER, 1997; TESSER; PORTELLA, 2011).

Além disso, a idade e o tipo de dieta ofertada à larva podem influenciar na taxa de ingestão, sendo que larvas com 30 dias de vida apresentam maiores taxas de ingestão em relação às com 15 dias de vida (TESSER; PORTELLA, 2011). Estímulos químicos e visuais gerados pela *Artemia* foram capazes de melhorar as taxas de ingestão de dietas inertes ofertadas a larvas de pacu (TESSER; PORTELLA, 2006). Na maioria das espécies, as larvas realizam a captura das dietas e as ingerem. Esse fenômeno é facilmente observado mediante o exame de observação do conteúdo intestinal em microscópio ótico (CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 2001).

## 8 Digestão

Os náuplios de *Artemia* apresentam, em geral, uma quantidade de 9,2% de matéria seca e 55-60% de proteína em base seca. No entanto, a maioria das microdietas

desenvolvidas para o propósito de substituição do alimento vivo, quando apresentaram níveis adequados de proteína, continha também uma alta quantidade de matéria seca (>90%) (BASKERVILLE-BRIDGES; KLING, 2000; GUTHRIE *et al.*, 2000).

Segundo Kolkovski (2001), a dificuldade para a larva digerir as dietas está relacionada à sua elevada quantidade de matéria seca (60 a 90%), muito diferente das características físicas do zooplâncton (apenas 10%), podendo alterar a quantidade de nutrientes e de sua liberação no intestino das larvas. As microcápsulas desenvolvidas por Mukai-Corrêa (2003) apresentaram perfis próximos aos de matéria seca (7-10%) quando comparados aos de rotíferos e *Artemia*. No entanto, os níveis de proteína variaram entre 24,3 e 34,8% (base seca), para sistemas contendo somente proteína, ainda inferiores às quantidades presentes nos alimentos vivos típicos para as larvas.

Alguns estudos com larvas de pacu demonstraram que a substituição do alimento vivo por dieta apresentou resultados insatisfatórios, uma vez que larvas alimentadas com a dieta apresentaram um menor crescimento e sobrevivência (JOMORI, 1999; TESSER; CARNEIRO; PORTELLA, 2005), havendo mortalidade total das larvas quando a dieta foi fornecida exclusivamente desde o início (TESSER; CARNEIRO; PORTELLA, 2005), o que demonstra a importância do uso de alimento vivo nas larvas dessa espécie.

O desenvolvimento de uma formulação de dieta completa e adequada para larvas de peixes não é fácil de ser obtida. Existem dificuldades em estimar as exigências nutricionais para peixes nessa fase do desenvolvimento, pois não é possível utilizar métodos tradicionais de estudo. Assim, dietas formuladas comerciais que sustentem o crescimento desde o início do desenvolvimento larval são altamente desejáveis (CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 2001).

No entanto, larvas de peixes recém-eclodidas, de um modo geral, apresentam baixa assimilação dos alimentos inertes. A dificuldade em introduzir satisfatoriamente a dieta na alimentação das larvas é associada a limitações no trato digestivo, envolvendo seu desenvolvimento insatisfatório e deficiências no perfil enzimático, observados nos primeiros estágios de desenvolvimento (LANGDON, 2003). Estudos com larvas de peixes sobre sua digestão, absorção e assimilação de nutrientes de dietas artificiais são limitados em razão de diversos fatores, como o pequeno tamanho das larvas quando elas iniciam a

alimentação exógena, a necessidade do preparo de uma dieta com tamanhos pequenos e a baixa aceitação das dietas pelas larvas (TESSER; PORTELLA, 2003).

Muitos autores relacionam este fato à pouca aceitação, assimilação e digestão dessas dietas, diretamente ligados à natureza intrínseca da partícula, como: textura, paladar, cor, formulação, tamanho, densidade e estabilidade em água (KOLKOVSKI, 2001; CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 2001). Também existem aqueles autores que acreditam que há uma perda de alguns nutrientes aquossolúveis e que as formulações são inadequadas nutricionalmente, interferindo diretamente na eficiência de substituição do alimento vivo (TESHIMA; ISHIKAWA; KOSHIO, 2000; CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 2001; HAMRE *et al.*, 2001; LANGDON, 2003). Dietas são compostas, geralmente, por proteínas desnaturadas, insolúveis ou ligeiramente solúveis e carboidratos complexos, que resultam em partículas densas e com alto peso molecular, o que pode dificultar a digestão (LANGDON, 2000 a, b).

O conhecimento profundo sobre a fisiologia nutricional das larvas de peixes ainda é limitado, o que dificulta a elaboração de microdietas inertes eficazes na substituição dos organismos vivos (YÚFERA; SARAQUESTE; FERNÁNDEZ-DIÁZ, 1996). Sabe-se que as larvas possuem taxas de crescimento relativas superiores aos outros estágios de desenvolvimento dos peixes (CONCEIÇÃO; DERSJANT-LI; VERRETH, 1998). Este elevado potencial de crescimento implica, no entanto, em exigência muito mais elevada em termos de aminoácidos (AA), ácidos graxos altamente insaturados (HUFA), entre outros nutrientes, o que torna ainda mais importante a compreensão desses fatores (CONCEIÇÃO; MORAES; ARAGÃO, 2007).

O estômago não é diferenciado no momento da eclosão da larva, e o seu desenvolvimento demora semanas para ocorrer. A ausência de estômago funcional nas larvas de peixe afeta sua capacidade de processamento das proteínas alimentares. Estudo desenvolvido por Cahu e Zambonino-Infante (2001) demonstrou que esta limitação está associada, essencialmente, à baixa capacidade proteolítica e não-absortiva do tubo digestivo, pois aminoácidos livres, peptídeos e hidrolisados proteicos foram rapidamente absorvidos pelo sistema digestivo das larvas. Ronnestad, Thorsen e Finn (1999) sugeriram que, na ausência de secreção de HCl e pepsina, a ingestão de proteína não deve ser feita na forma desnaturada, e aminoácidos livres podem ser mais bem absorvidos do que proteínas.

Estudo realizado por Yúfera, Pascual e Fernández-Díaz (1999) demonstrou que as microcápsulas elaboradas com gelatina e lavadas com cicloexano foram imediatamente desintegradas e digeridas no intestino, proporcionando um desenvolvimento intestinal normal. Ao 15º dia de experimento, as larvas apresentaram os órgãos digestivos desenvolvidos e de tamanho similar ao das larvas alimentadas com rotíferos, demonstrando que os nutrientes contidos na dieta podem ser utilizados e absorvidos pela larva, uma vez que há a digestão da microcápsula, o que pode ser verificado no crescimento das larvas, que foi semelhante ao observado com o alimento vivo.

## **9 Probiótico**

Alguns alimentos possuem efeito benéfico à saúde do hospedeiro. Estes alimentos, denominados funcionais, vêm sendo intensamente estudados nos últimos anos (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Consideram-se alimentos funcionais aqueles que além de fornecer uma nutrição básica ainda promovem uma melhora da saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, salientando que esses efeitos restringem-se à melhora da saúde, e não à cura de doenças (SANDERS, 1998).

O termo probiótico originou-se das palavras latina e grega “pro” e “bios”, que significam “em favor de” e “vida” (GISMONDO; DRAGO; LOMBARDI, 1999). A primeira definição geral aceita foi a proposta por Fuller (1989), na qual ele o descreve como um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio microbiano. A FAO/WHO (2001) define probiótico como preparações de células microbianas que, quando administradas em quantidades adequadas, têm efeitos benéficos sobre a saúde e o bem-estar do hospedeiro.

Alguns mecanismos de ação dos probióticos foram esclarecidos. Estudos já demonstraram que eles podem ter ação por exclusão competitiva (OZAWA *et al.*, 1979), como estimuladores de imunidade (INOOKA; UEHARA; KIMURA, 1986) da ativação de macrófagos, por aumento da produção de ácido láctico (FULLER, 1977) e de acetato, reduzindo o pH do meio, tendo, assim, um efeito antibacteriano. Além disso, atribui-se-lhes auxílio na digestão e absorção de nutrientes, inibição do crescimento de micro-organismos

patogênicos, produção de vitaminas do grupo B e recuperação da microbiota intestinal após tratamento com antibiótico (CASTRO, 2003). Os probióticos desempenham um papel terapêutico da modulação da imunidade, diminuição do colesterol, melhoramento da tolerância à lactose e prevenção de alguns tipos de câncer (KAILASAPATHY; CHIN, 2000; SANDERS, 1998).

Diversas espécies de bactérias são encontradas no intestino de um indivíduo sadio, sendo capazes de induzir possíveis variações físicas e químicas no intestino (LEE *et al.*, 1999). Uma vez que está em equilíbrio, impossibilita que os próprios micro-organismos potencialmente patogênicos exerçam seus efeitos. Por outro lado, o desequilíbrio dessa microbiota pode resultar na proliferação de patógenos, com consequente infecção bacteriana (ZIEMER; GIBSON, 1998).

Os probióticos favorecem o equilíbrio microbiano, o que possibilita a redução do pH do trato digestivo e das bactérias enteropatogênicas; consequentemente, há produção de toxinas e melhora da eficiência alimentar (SILVA; TEIXEIRA; BERTECHINI 2001).

### 9.1 *Lactobacillus acidophilus*

As bactérias ácido-láticas possuem algumas características, tais como: são bactérias gram-positivas, possuem forma de bastonetes, não formam esporos, são catalase-negativas, não-aeróbias, porém são aerotolerantes, fermentativas, sendo o ácido lático o principal produto final da fermentação dos açúcares (AXELSSON, 1993).

O gênero *Lactobacillus* pertence ao grande grupo das bactérias ácido-láticas, as quais são todas organismos gram-positivos que produzem ácido lático pela fermentação (KANDLER; WEISS, 1986). Eles são estritamente fermentativos e aerotolerantes, porém apresentam um bom crescimento em condições anaeróbicas (GIRAFFA; CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010).

O gênero *Lactobacillus* contém um grande número de espécies com propriedades bioquímicas e fisiológicas variadas, capazes de crescerem em temperaturas que variam de 2-53°C, embora o crescimento ótimo seja em torno de 35-40°C. Possui uma tolerância a

pHs ácidos, porém o pH ótimo para seu desenvolvimento está entre 5,5 e 6,0 (KANDLER; WEISS, 1986; GOMES; MALCATA, 1999).

Desses micro-organismos, o *L. acidophilus* é o mais utilizado e estudado como probiótico nos últimos anos (O’SULLIVAN, 2006). Algumas linhagens de *L. acidophilus* podem afetar o valor nutricional dos produtos aos quais forem adicionados por serem capazes de sintetizar vitaminas como ácido ascórbico, niacina e vitamina B12 (GOMES; MALCATA, 1999).

De modo geral, *Lactobacillus* podem colaborar na digestão da lactose em indivíduos com intolerância a esse dissacarídeo, reduzir a constipação e a diarreia infantil, ajudar na resistência a infecções por salmonela, prevenir a “diarreia do viajante” e aliviar a síndrome do intestino irritável (NOVIK *et al.*, 2006).

A eficiência de *L. acidophilus*, de vacina específica e também da associação de ambos foi comparada no controle da diarreia causada por *E. coli* enterotoxigênica em leitões e verificou-se que, na associação dos produtos, foram obtidos os melhores resultados (ÁVILA *et al.*, 2001). Além desta qualidade, trabalho realizado por Liao *et al.* (1994) cita que o *L. acidophilus*, entre outras bactérias, é capaz de produzir uma substância denominada Lacidin A, que possui ação bactericida contra o *Staphylococcus aureus*. Esta substância é utilizada como defensivo natural em produtos alimentares, reduzindo o uso de produtos químicos.

## **10 Probióticos e aquicultura**

Por causa do grande crescimento e expansão da aquicultura mundial, houve uma maximização da produção de peixes e sua intensificação. Porém, para que isto ocorresse, foi necessária a utilização de dietas comerciais, promotores de crescimento, antibióticos e outros aditivos (NAYAK, 2010).

O avanço da aquicultura intensiva é acompanhado por diversos problemas de doenças. Em larvicultura intensiva, é comum a utilização de agentes químicos, como os antibióticos, porém o uso contínuo e indiscriminado desses aditivos pode causar danos aos

peixes, uma vez que a sua microflora intestinal é destruída; aumentar os custos de produção e contaminar o meio ambiente (VIJAYAKUMARAN; RADHAKRISHNAN, 2003; GOMEZ-GIL; ROQUE; TURNBULL, 2000).

Como consequência, houve necessidade de se encontrar alternativas viáveis para aquicultura que possibilitassem manter a saúde microbiana dos animais e, ao mesmo tempo, diminuir os custos com medicamentos. Um dos métodos propostos para ajudar no crescimento sem danificar a flora intestinal são os probióticos (AL-DOHAIL; HASHIM; ALIYU-PAIKO, 2009).

No decorrer dos anos, várias estratégias foram adotadas a fim de modular a composição da microbiota intestinal, para obter um melhor crescimento, digestão, imunidade e resistência a doenças. A suplementação dietética de probióticos pode melhorar a parte nutricional para o peixe e também atuar como terapia contra os efeitos adversos dos antibióticos e outros medicamentos (NAYAK, 2010).

Os estudos da aplicação de probióticos na aquicultura começaram na década de 1980 (KOZASA, 1986) e o interesse em ambientes favoráveis para a utilização dos probióticos está aumentando rapidamente. Hoje em dia, preparações com probióticos são comercialmente viáveis e estão sendo inseridas para os peixes como aditivos na alimentação ou incorporados na água (WANG; XU; XIA, 2005).

Ao juntar os conceitos de probiótico com o conceito de probióticos na aquicultura, Merrifield *et al.* (2010) fizeram uma mescla das definições propostas e sugeriram que um probiótico para aquicultura é um componente vivo ou um componente de uma célula microbiana que, administrado na alimentação ou na água, provoca benefícios ao hospedeiro, melhorando a resistência a doenças, estado de saúde, crescimento e desempenho, melhora a utilização do alimento, resposta ao estresse, equilíbrio microbiano do hospedeiro e do ambiente.

Os probióticos devem possuir algumas características básicas para serem utilizados na aquicultura, como, por exemplo, não ser patogênico ao hospedeiro e aos organismos aquáticos em geral; não possuir genes de resistência a antibióticos; ser resistente aos sais biliares e pH baixos; ser capaz de colonizar o intestino do hospedeiro; ser registrado para utilizá-lo como aditivo alimentar, entre outros (MERRIFIELD *et al.*, 2010).

Não existe uma dose estipulada de probióticos para aquicultura. Acredita-se que a dose ideal seja aquela que consiga estimular a proteção do hospedeiro e/ou o seu crescimento. Geralmente a dose em aquicultura varia de  $10^{6-10}$  CFU/g de dieta, havendo estudos que apresentam resultados positivos tanto com doses inferiores quanto superiores a esses valores, pois a dose ideal pode variar conforme a espécie e os parâmetros imunológicos (NAYAK, 2010; CARNEVALI *et al.*, 2006; GALINDO *et al.*, 2009).

Assim como a dosagem, o tempo de administração também é variável, porém, alguns efeitos, como ganho de peso, melhora da imunidade e resistência a doenças, podem ser observados após a administração de dietas contendo probióticos por 1-10 semanas (NAYAK, 2010). A forma de administração também é um fator que deve ser levado em conta, uma vez que pode ser administrado como aditivo na água ou como aditivo alimentar. A administração oral de probióticos na suplementação dietética é mais efetiva na melhoria da imunidade e proteção contra patógenos do que quando ele é utilizado como aditivo na água (NAYAK, 2010; TAOKA *et al.*, 2006).

Bairagi *et al.* (2002) observaram que alguns micro-organismos (isolados do trato digestivo de peixe), quando ingeridos pelos peixes, produzem enzimas digestivas, facilitando a utilização do alimento e a digestão. Esses efeitos benéficos dos probióticos adicionados na dieta também foram relatados por Bairagi *et al.* (2004) e Wang (2007) ao utilizarem *Bacillus subtilis* e *Bacillus circulans*, e *Bacillus* sp, respectivamente. Além disso, foi observado que a microflora do trato digestivo de hidrobiontes desempenhou um papel importante na resistência às doenças infecciosas, pois produz materiais antibacterianos, impedindo a entrada de bactérias patogênicas em um organismo (RINGO *et al.*, 2007).

O objetivo inicial do uso de probióticos é manter ou restabelecer uma relação favorável entre os micro-organismos patogênicos e amigáveis que constituem a flora do trato digestivo ou muco dos hidrobiontes. Além da parte nutricional e de benefícios para a saúde do peixe, alguns probióticos, quando utilizados como aditivos na água, podem ajudar na decomposição da matéria orgânica, redução dos níveis de fósforo e nitrogênio, assim como no controle de amônia e nitrito (BOYD; MASSAUT, 1999; NAYAK, 2010).

Os probióticos utilizados na aquicultura são as bactérias ácido-lácticas (LAB), as bactérias do gênero *Bacillus*, bactérias fotossintéticas e leveduras, apesar de outros gêneros

ou espécies também serem mencionadas (WANG; XU; XIA, 2005; CARNEVALI *et al.*, 2006; WANG, 2007). Estudos já demonstraram que as bactérias ácido-láticas fazem parte da microbiota intestinal dos peixes desde os primeiros dias de vida (RINGO *et al.*, 2007).

Os benefícios dos suplementos incluem o aumento do valor nutricional, a contribuição para a digestão enzimática, a inibição de micro-organismos patogênicos, a atividade antimutagênica e anticarcinogênica, fatores que promovem o crescimento e aumento da resposta imune (MOHANTY; SWAIN; TRIPATHI, 1993; MOHANTY; SWAIN; TRIPATHI, 1996; VERSCHUERE *et al.*, 2000).

Diversos estudos imunológicos têm sido realizados com peixes, utilizando-se diferentes probióticos, e estes vêm demonstrando possuir a capacidade de estimular a imunidade tanto em condições *in vitro* como *in vivo*. A literatura indica que os probióticos isolados ou combinados podem aumentar a imunidade local e sistêmica dos peixes (NAYAK, 2010).

Estudos demonstraram que os probióticos podem favorecer a digestão e melhorar o aporte de nutrientes, uma vez que, ao administrá-los, houve um aumento da concentração dos ácidos graxos no trato gastrointestinal e das vitaminas, assim como da produção de enzimas, como proteases e lipases, o que facilitaria o processo digestivo (BALCAZÁR *et al.*, 2006).

## **11 Concentrado proteico de peixe**

A matéria-prima para produção de concentrados proteicos de peixe depende da aplicação a que se destina o produto. Se este for para alimentação humana, pode-se partir do pescado processado por meio de uma separação mecânica ou filetagem. O produto deve ser submetido a processos de lavagem com solução salina, para eliminação das proteínas sarcoplasmáticas e do sangue, pigmentos e enzimas que podem comprometer o concentrado proteico em termos de sabor, odor e conservação. Quando se destina à alimentação animal, pode-se partir de peixe eviscerado, moído, considerando a cabeça, pele e ossos (CÂNDIDO, 1998).

O *Concentré de Protéine Soluble de Poisson* (CPSP) é o nome comercial de um hidrolisado de proteínas solúveis de peixe, obtido por moagem, hidrólise enzimática, filtração, concentração e desidratação de peixe fresco. Ele é mundialmente utilizado em razão de ser reconhecido por ser a melhor fonte de proteínas marinha. É designado, entre outros fins, para nutrição de larvas desde a abertura da boca até o estado juvenil, demonstrando um aumento de 20% na taxa de sobrevivência de larvas (BIOVONTADE, 2011).

Zambonino-Infante, Cahu e Péres (1997) e Cahu *et al.* (1999) mostraram que a suplementação de proteína hidrolisada em alimentação para larvas aumentou o crescimento, acelerou a maturação do intestino e do pâncreas, diminuiu deformidades na espinha e aumentou os níveis de sobrevivência. Também foi relatada uma correlação positiva entre o nível de proteína hidrolisada na alimentação inicial e a sobrevivência (DAY; HOWELL; JONES, 1997), e em melhor ganho de peso quando foi ofertada a larvas de pacu (MACEDO-VIEGAS; PORTELLA, CARNEIRO, 2003), porém alguns estudos realizados com larvas ou juvenis não encontraram efeitos vantajosos na utilização de proteína hidrolisada (OLIVA-TELES; CERQUEIRA; GONÇALVES, 1999; KOLKOVSKI; TANDLER, 2000; GARCÍA-ORTEGA *et al.*, 2001).

## **12 Óleo de salmão**

O óleo de salmão é uma fonte lipídica que apresenta, na sua composição quantidades de DHA, enquanto o óleo de soja e outros óleos vegetais não possuem nenhuma porcentagem de DHA (ácido docosahexaenoico) e EPA (ácido eicosapentaenoico) (REESE, 2003). Além disso, óleos provenientes de peixes possuem um alto teor de ácidos graxos essenciais  $\omega$ -3 (MARQUEZ-RUIZ *et al.*, 2008). Diversos estudos demonstram que existem efeitos benéficos dos ácidos graxos poli-insaturados para saúde, principalmente os da família  $\omega$ -3, EPA e DHA (MONTERO *et al.*, 2003). Os óleos de peixe, de uma maneira geral, são ricos em EPA e DHA e esses ácidos graxos estão associados a uma diminuição dos fatores de risco associados à arteriosclerose (CALDER, 2004).

Os óleos de peixes são as principais fontes lipídicas na elaboração de dietas para peixes, uma vez que apresentam, além de uma elevada quantidade de ácidos graxos ômega-3 – necessários para resistência ao estresse e desenvolvimento da imunidade para os peixes –, uma quantidade abundante de ácidos graxos monoinsaturados, que são utilizados pelos peixes como uma fonte metabólica de energia (MONTERO *et al.*, 2003).

O DHA, assim como o ácido palmítico, também exerce um papel fundamental na formação das membranas celulares, uma vez que é retido nos lipídios apolares presentes nas membranas (IZQUIERDO, 1996). Uma dieta contendo EPA e DHA pode melhorar a sobrevivência e o crescimento das larvas (SUI *et al.*, 2007). Além disso, o EPA é utilizado na síntese de hormônios eicosanoides, que estão relacionados com a biossíntese de esteroides, a inibição de secreções gástricas e a contração da musculatura lisa (GLENCROSS, 2009).

Peixes requerem alta quantidade de ácidos graxos insaturados (HUFA) para crescimento e desenvolvimento normal, além da manutenção da estrutura e função das membranas celulares e como precursores de eicosanoides (CHEN *et al.*, 2011). Quantidades inadequadas de n-3 HUFA podem afetar o crescimento, a imunidade, a reprodução e a sobrevivência de peixes (ZUO *et al.*, 2011), principalmente os de água marinha, uma vez que estes não possuem a capacidade de alongar o ácido linolênico em n-3 HUFA (ZUO *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2011).

Quando larvas de peixes recebem um aporte inadequado de níveis de n-3 HUFA (*Highly Unsaturated Fatty Acid*) podem apresentar algumas deficiências de crescimento e sobrevivência. Um aumento dos níveis dietéticos de n-3 HUFA pode promover o crescimento das larvas (IZQUIERDO, 1996). Os requerimentos de n-3 HUFA variam muito entre as espécies, mas, de uma maneira geral, as larvas necessitam de um maior aporte do que os juvenis, devido ao metabolismo acelerado, construção de membranas e alta taxa de crescimento (IZQUIERDO, 1996).

Essa necessidade de uma grande oferta dietética de n-3 HUFA, no entanto, dá-se, principalmente, para os peixes de água marinha, pois estes não são capazes de metabolizar e produzi-los, sendo, portanto, ácidos graxos essenciais (EFA). Sabe-se que peixes de água doce são capazes de converter 18-C PUFA das séries n-3 e n-6 em ácidos graxos n-3

HUFA. Em contraste, os peixes marinhos não possuem essa capacidade de conversão e relaciona-se este fato à deficiência na produção da enzima  $\Delta 5$  desaturase (GLENCROSS, 2009). Portanto, para os peixes de água doce, não há uma necessidade fundamental de uma grande oferta de n-3 HUFA, uma vez que estes são capazes de sintetizá-los a partir de outros ácidos graxos (C18:2n-6 e C18:3n-3) (TOCHER, 2003; SUI *et al.*, 2007; SOUZA; ANIDO; TOGNON, 2007).

Quando adicionados diretamente à dieta de peixes, o óleo de peixe pode sofrer oxidação, uma vez que, durante a sua extração e processamento, alguns de seus antioxidantes, como a vitamina E e o corante astaxantina, podem sofrer degradação. Além da microencapsulação se adequar como uma metodologia para elaboração de dietas para larvas de peixes, ela também pode ajudar a diminuir a oxidação lipídica, uma vez que as rações, quando produzidas, ficam armazenadas por longo tempo (SCHULER, 1990; NEWTON, 1996; SHELKE, 2005).

**CAPÍTULO 2**  
**ESTUDO PRELIMINAR DA RETENÇÃO PROTEICA DE**  
**SORO DE LEITE EM PARTÍCULAS OBTIDAS POR**  
**GELIFICAÇÃO IÔNICA**

## **CAPÍTULO 2 - ESTUDO PRELIMINAR DA RETENÇÃO PROTEICA DE SORO DE LEITE EM PARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA**

### **1 INTRODUÇÃO**

A microencapsulação tem como objetivo proteger diferentes materiais das condições adversas do meio, além de melhorar aspectos sensoriais indesejáveis que uma substância possa apresentar e proteger compostos ativos em uma matriz de forma definida (ANAL; STEVENS, 2005; CHANASATTRU *et al.*, 2009). A composição das cápsulas varia conforme a aplicação a que se destinam, sendo utilizados diversos materiais de parede para a formação das microcápsulas (ARSHADY, 1993; SINKO; KHON, 1993).

A pectina de baixo teor de metoxilação é utilizada como material de parede e forma ligações entre as suas cadeias e as de cátions bivalentes, como o cálcio, formando hidrogéis. Microcápsulas produzidas por gelificação iônica são processadas de uma maneira branda, sem o uso de solventes. Polieletrólitos de cargas opostas interagem e formam uma matriz impermeável para alguns compostos orgânicos, podendo apresentarem baixa capacidade de retenção e elevada porosidade, sendo esta minimizada pela adição de um polícatión após a gelificação (THIES, 1995; BUREY *et al.*, 2008; HUGUET; DELLACHERIE, 1996; DAI; WANG; ZHAO, 2005).

A interação eletrostática entre os biopolímeros apresenta situação otimizada quando existe equilíbrio entre cargas positivas e negativas, de modo que a maior parte dos sítios ativos esteja ligada (SCHMITT *et al.*, 2000), ou seja, em faixa de pH em que o pKa da polissacarídeo e o ponto isoelétrico da proteína estejam com quantidade de cargas similares, porém de sinais opostos (LIU *et al.*, 2010).

As proteínas do soro de leite são uma alternativa de polícatión e são compostas basicamente por  $\beta$ -lactoglobulina (SGARBIERI, 1996). A  $\beta$ -lactoglobulina possui 162 resíduos de aminoácidos, é desnaturada com o calor e pode formar agregados, dependendo

do pH e da concentração de cálcio. Ao aquecer o concentrado proteico de soro de leite pode haver a desnaturação das proteínas, alterando as suas propriedades funcionais.

O objetivo deste estudo foi avaliar preliminarmente se a metodologia de incorporação proteica influencia nos teores finais de proteína, se o teor de amidação da pectina, do cloreto de cálcio e desnaturação térmica da proteína de soro de leite exercem alguma influência na retenção proteica e teores de umidade e quais as melhores condições para obter uma micropartícula com teores de umidade e proteína semelhantes aos náuplios de *Artemia* (*Artemia franciscana*).

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

Os materiais utilizados para a elaboração das micropartículas foram os seguintes: pectina cítrica de baixo teor de esterificação amidada - PA (CPKelco, mistura de diferentes lotes, Limeira-SP, Brasil), pectina cítrica de baixo teor de esterificação não-amidada - PNA (CPKelco, tipo LM-22CG, lote GR914012, Limeira-SP, Brasil), concentrado proteico de soro de leite - WPC (Lacprodan, lote Lac804U17601, 76-80% de proteína, máximo de 6% de umidade, 3,5% de cinzas e 9% de lipídeos, Portenã, Província de Córdoba, Argentina), cloreto de cálcio anidro P.A. (Dinâmica, lote 36308, P.M. 110,99), óleo de soja comercial comum, oleoresina de páprica Citromax, ácido clorídrico 0,1N (Merck), hidróxido de sódio a 50% (nuclear, P.M. 40, Diadema-SP), ácido sulfúrico (Synth, P.M. 98,08, Diadema, São Paulo, Brasil).

### **2.2 Caracterização físico-química dos materiais**

#### **2.2.1 Composição centesimal**

Os materiais utilizados – WPC, PA, PNA – foram caracterizados, em triplicata, em relação ao conteúdo total de proteína, umidade e cinzas, de acordo com AOAC (2006), e lipídeos, segundo Bligh e Dyer (1959).

Para a quantificação de proteína, foi utilizada a metodologia de Kjeldahl, utilizando-se os fatores de correção de 6,38 e 6,25 para conversão de nitrogênio em proteína, para o WPC e para os demais materiais proteicos, respectivamente. Em todas as análises foi utilizada, como branco, uma partícula sem cobertura proteica para corrigir o teor de nitrogênio não-proteico presente na PA e PNA.

### 2.2.2 Caracterização da pectina

A PA utilizada foi caracterizada de acordo com FAO (2009) em relação ao seu teor de ácidos galacturônicos (AG), grau de esterificação (GE) e grau de amidação (GA) através de titulometria.

### 2.2.3 Potencial zeta

O potencial zeta, ou seja, a carga elétrica disponível, foi avaliado nas soluções (0,5% p/p) – WPC, LMAP – através do instrumento de distribuição de mobilidade eletroforética de partículas Zetasizer (Malvern, Worcestershire, UK), do pH 3 até o pH 7. As medidas foram feitas para duas amostras, preparadas de forma independente. Para cada amostra, foram feitas duplicatas das leituras. Os resultados estão expressos como médias, seguidas dos seus desvios padrões.

## **2.3 Produção das microcápsulas**

Antes do preparo da dieta microencapsulada experimental, foram feitos testes preliminares na tentativa de ajustar a composição da microcápsula ao perfil nutricional dos náuplios de *Artemia* (*Artemia franciscana*). Os valores de referência buscados foram o teor de proteína em base seca (60%) e sólidos totais (aproximadamente 10%), valores estes usualmente encontrados na composição da *Artemia* (BASKERVILLE-BRIDGES; KLING,

2000). Para obter microcápsulas com os teores aproximados da *Artemia*, foram variados: o tratamento térmico da fonte proteica, a concentração e o modo de incorporação dessa proteína. A fonte proteica utilizada foi o concentrado proteico de soro de leite (WPC), na forma não-desnaturada e na forma desnaturada (90°C por 30 min e 80°C por 15 min) visando a avaliar a incorporação da proteína na partícula.

As cápsulas foram produzidas por gelificação iônica, sendo a inclusão da solução de WPC testada de duas maneiras: a) como constituinte da emulsão (teores variaram de 10 a 40%); b) gelificação iônica seguida do recobrimento com solução de WPC, em que as cápsulas de gelificação iônica foram transferidas para uma solução de soro de leite (concentração variando de 4 a 12%).

Utilizou-se o óleo vegetal de soja com oleoresina de páprica (proporção de 9:1) para todos os testes preliminares, em razão de seu custo ser inferior ao do óleo de salmão, o qual foi utilizado para a elaboração das dietas experimentais. A adição da oleoresina permitiu melhor visualização da formação das micropartículas e distribuição lipídica pela matriz devido a sua coloração laranja.

## **2.4 Preparo das microcápsulas**

### **2.4.1 Microcápsulas contendo proteína no seu interior**

As soluções poliméricas de pectina foram preparadas na concentração de 2% (p/p) e a solução iônica foi testada em duas concentrações (2 e 5%). O recheio constituiu-se de uma solução de WPC, com concentração variando de 10 a 40%, uma vez que concentrações maiores tornavam a emulsão muito viscosa, impedindo a sua aspensão. As diferentes concentrações da solução de WPC foram testadas de duas maneiras distintas:

- não-desnaturada: o pó foi homogeneizado com água destilada;
- desnaturada 90°C por 30 minutos: o pó foi homogeneizado com água destilada, após permaneceu em banho-maria por 30 minutos a uma temperatura de 90°C.

As duas soluções (WPC e pectina) foram misturadas, acrescentando-se-lhes o óleo de soja com oleoresina de páprica (9:1) em uma concentração de 18% em base seca e homogeneizadas em homogeneizador Ultra-Turrax (IKA, Works do Brasil) a 14.000 rpm/3 minutos. Essa solução foi pulverizada por meio de um bico atomizador duplo fluido sobre pressão de ar de 0,125 kgf/cm<sup>2</sup> e altura constante de 12 cm entre o pulverizador e a solução iônica, 2% ou 5% CaCl<sub>2</sub> (p/p), mantida sob agitação lenta e temperatura ambiente (25°C). As cápsulas foram mantidas na solução iônica, para cura, por 30 minutos e, em seguida, foram separadas por peneira (125µm) e lavadas com água deionizada. Após esse procedimento, as cápsulas foram analisadas em relação ao seu teor de proteína e umidade, e o restante foi congelado, liofilizado e armazenado sob refrigeração.

#### 2.4.2 Microcápsulas contendo proteína como material de cobertura

A solução polimérica de pectina foi preparada em uma concentração de 2% (p/p), a qual se acrescentou óleo de soja adicionado de óleo de resina de páprica (9:1) em uma concentração de 18% em base seca e homogeneizada em homogeneizador Ultra-Turrax (IKA, Works do Brasil) a 14.000 rpm/3 minutos. Esta solução foi pulverizada com o auxílio de uma bomba peristáltica através de um bico atomizador duplo fluido sobre pressão de ar de 0,125 kgf/cm<sup>2</sup> e altura constante de 12 cm entre o pulverizador e a solução iônica, 2% em CaCl<sub>2</sub> (p/p) com pH ajustado para 4,0, mantida sob agitação lenta e temperatura ambiente (25°C). As cápsulas foram mantidas na solução iônica, para cura, por 30 minutos, em seguida separadas por peneira (25µm) e lavadas com água deionizada (pH 4,0).

As partículas obtidas foram transferidas para solução de WPC, com pH ajustado para 4,0, mantidas imersas sob agitação constante por 30 minutos. Após esse procedimento, elas foram novamente peneiradas (125µm) e lavadas com água deionizada (pH 4,0). As cápsulas foram analisadas em relação ao seu teor de proteína e umidade, e o restante foi seco em liofilizador.

A concentração da solução de WPC variou em 4, 6, 8 e 12%. As diferentes concentrações da solução de WPC tiveram seu pH ajustado para 4,0 e foram testadas de três maneiras distintas:

- não-desnaturada: o pó foi homogeneizado com água destilada;
- desnaturada 80°C por 15 minutos: o pó foi homogeneizado com água destilada, após ficou em banho-maria por 15 minutos a uma temperatura de 80°C;
- desnaturada 90°C por 30 minutos: o pó foi homogeneizado com água destilada, após ficou em banho-maria por 30 minutos a uma temperatura de 90°C.

Para as cápsulas submetidas ao recobrimento com a proteína desnaturada, foram estudados os níveis de 4, 6 e 8%, uma vez que a concentração de 12% mostrou-se muito espessa, impossibilitando a sua agitação e cobertura homogênea das micropartículas na solução.

## **2.5 Secagem das microcápsulas**

Após a produção, as microcápsulas foram secas em liofilizador (Edwards Pirani 501), conforme condições estabelecidas por Mukai-Corrêa (2003). A temperatura foi reduzida para -40°C, sob uma pressão de 0,1 mmHg. O ponto final de secagem foi estabelecido na temperatura final de 25°C. O material seco foi acondicionado em frascos com tampa e mantidos em refrigeração.

## **2.6 Caracterização físico-química**

### **2.6.1 Composição centesimal**

As micropartículas foram caracterizadas, em triplicata, em relação ao conteúdo total de proteína e umidade, de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists*

(AOAC, 2006). A umidade foi determinada por secagem em estufa a temperatura de 105°C por 12 horas.

Para a quantificação de proteína na cápsula, foi realizada a metodologia de Kjeldahl, utilizando o fator de correção de 6,38 para conversão de nitrogênio em proteína, valor este relativo à proteína do soro de leite. Em todas as análises, foi avaliado também um branco, ou seja, sem cobertura e/ou recheio para corrigir o teor de nitrogênio não-proteico presente na pectina.

### 2.6.2 Morfologia e microestrutura

A morfologia das micropartículas úmidas foi observada por microscopia ótica (Jenaval, Carl Zeiss, Toronto, Canadá) com captação de imagens por câmara digital, usando objetiva 12,5 e optvar 1,25x e o programa EDN-2 – *Microscopy Image Porcessing System*. A microestrutura das partículas liofilizadas foi observada em microscópio eletrônico de varredura (SEM) Jeol (T300, Japão), utilizando-se 15 kV. As amostras foram previamente fixadas em *stubs* com fita metálica dupla face e recobertas com uma fina camada de ouro (40mA/150s) por um evaporador Baltzer SCD50 (Baltec, Liechtensten).

### 2.7 Análise estatística

Para determinar diferenças significativas entre os valores obtidos para proteína em micropartículas de gel, foram aplicadas a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o programa Statistica® 5.5 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) para cada conjunto de experimentos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização dos materiais

A Tabela 1 apresenta os resultados da composição centesimal dos produtos utilizados na elaboração das micropartículas. A caracterização das pectinas mostrou que elas possuem certo teor de nitrogênio e, para a caracterização das microcápsulas, este valor foi considerado no cálculo da quantidade de proteína encapsulada. Em relação às pectinas, pode-se observar que a pectina não-amidada possui valor de nitrogênio inferior aos da pectina amidada como esperado, sendo relacionado à diferença do teor de amidação de ambas.

Para o WPC, a determinação é importante para os cálculos de concentrações do produto, uma vez que a amostra não é 100% constituída de proteína, sendo necessária uma correção. Para a determinação do conteúdo proteico das partículas, foi necessário descontar o teor de nitrogênio da pectina nas cápsulas, obtendo-se, assim, apenas o conteúdo de proteína nas cápsulas proveniente do WPC.

**Tabela 1** – Composição centesimal (%) em base seca dos produtos utilizados para elaboração das micropartículas por gelificação iônica

Produtos	Composição Centesimal % (base seca)			
	Umidade	Proteína	Lipídeo	Cinzas
WPC	6,86 ± 0,12	81,02 ± 1,00	16,21 ± 0,5	2,77 ± 0,06
PA	9,20 ± 0,08	1,05 ± 0,04	0,0	3,30 ± 0,56
PNA	7,77 ± 0,23	0,27 ± 0,05	0,0	2,75 ± 0,59

WPC= concentrado proteico de soro; PA= pectina amidada; PNA= pectina não-amidada.

O WPC apresentou nível elevado em relação ao teor de proteína, resultado também já esperado, uma vez que os concentrados proteicos de soro de leite apresentam, em média, teores de proteína de até 80%.

As proteínas do soro de leite, utilizadas na elaboração dos ensaios preliminares para as dietas experimentais, são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo de mamíferos, estimulando a síntese de proteínas sanguíneas e teciduais (SGARBIERI, 2004). O soro de leite é muito estudado, não somente devido ao seu valor nutricional superior ao da maioria das proteínas, mas também devido ao fato de possuir alto conteúdo de aminoácidos sulfurados que apresentam funções antioxidantes (SINHA *et al.*, 2007).

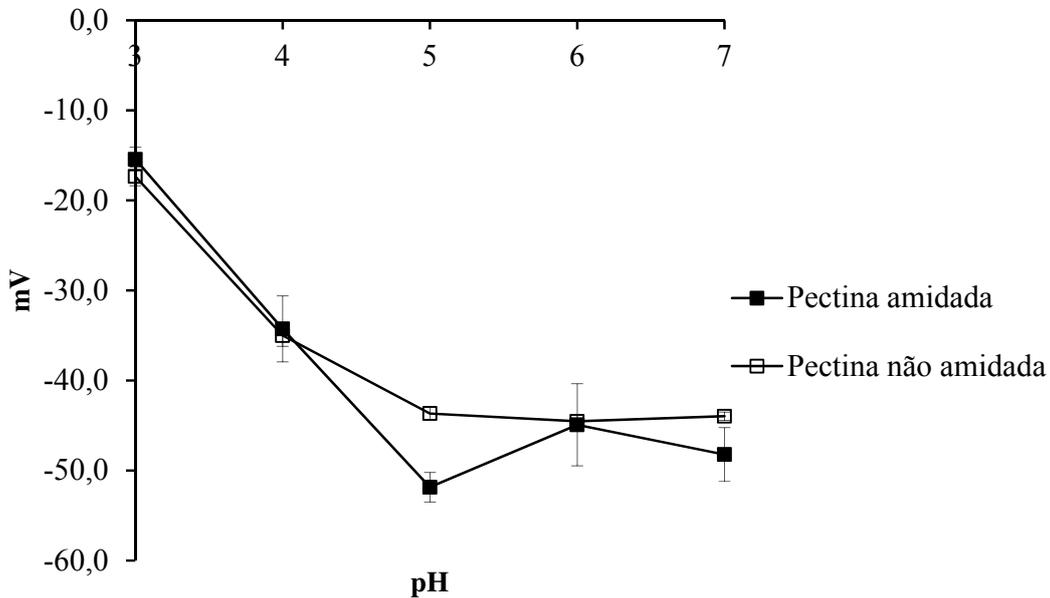
Ao comparar os teores de aminoácidos entre os náuplios de *Artemia* (valor de referência para proteína e umidade) (ARAGÃO *et al.*, 2004) e o WPC (SINHA *et al.*, 2007), disponíveis na literatura, pode-se observar que o WPC apresenta valores superiores para quase todos os aminoácidos, com exceção da arginina, fenilalanina, glicina, alanina e tirosina. Os valores de lisina no WPC são superiores ao reportado na literatura para os náuplios de *Artemia*. A lisina é o principal aminoácido limitante relacionado à síntese de deposição de proteína e, além disso, é o aminoácido limitante em ingredientes comumente utilizados para formular rações de peixe (BICUDO; SADO; CYRINO, 2009), por isso acredita-se que o WPC seja uma boa fonte proteica para a formulação das dietas experimentais.

### 3.1.1 Caracterização das pectinas

A PA e a PNA apresentaram porcentagem de ácidos galacturônicos (AG) de  $85,90 \pm 1,90$  e  $92,64 \pm 1,45$ , respectivamente, adequado, segundo a FAO (1994), que estabelece uma porcentagem mínima de 65% de AG para pectinas comerciais. Em relação ao grau de esterificação, a PA e a PNA apresentaram os valores de  $34,10 \pm 1,30$  e  $40,92 \pm 0,80\%$  sendo classificadas como pectinas de baixo teor de esterificação, uma vez que apresenta menos de 50% dos grupos carboxílicos esterificados (TURQUOIS *et al.*, 1999). Os teores de amidação foram de  $5,50 \pm 0,40$  e  $0,26 \pm 0,01\%$  para PA e PNA, respectivamente, indicando que apenas 5% dos grupos carboxilas estavam amidados na PA e que praticamente não existiam grupos amidados na PNA.

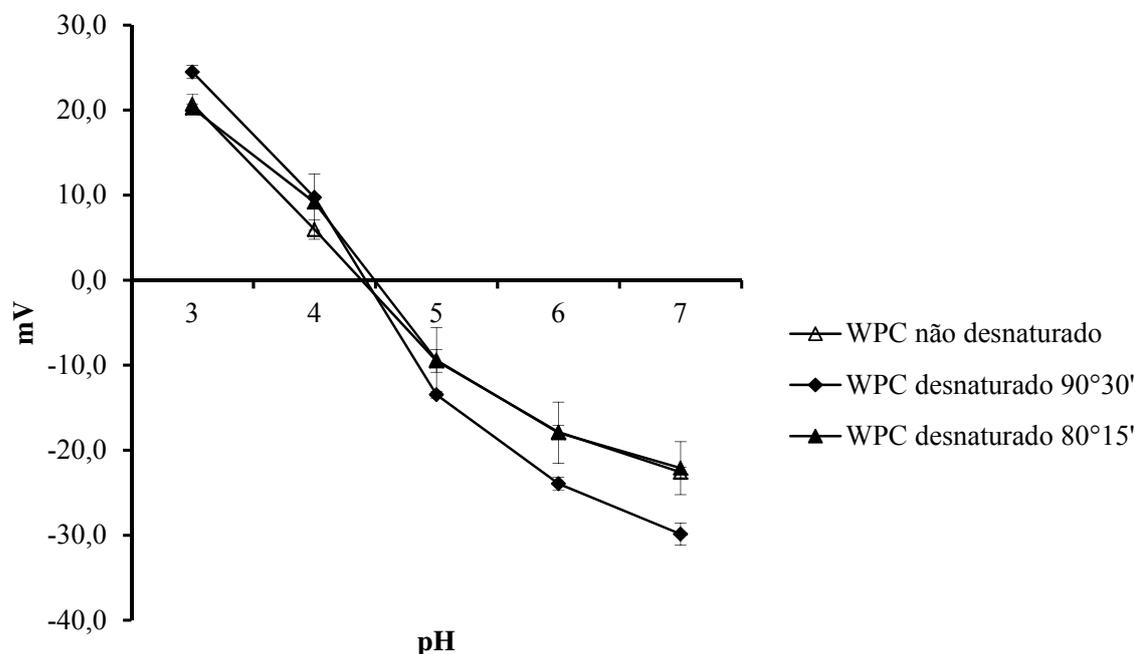
### 3.1.2 Potencial zeta

O potencial zeta permite determinar a quantidade de cargas em solução do polissacarídeo e das proteínas do soro do leite, podendo, assim, ser identificado se existe possibilidade de ocorrer uma interação eletrostática entre os materiais, além de identificar em que faixa de pH pode haver uma maior interação. Ao analisar o potencial zeta das soluções de pectina amidada e não-amidada (Figura 1) observou-se que ambas possuem carga negativa por toda faixa de pH estudada, apresentando, praticamente, os mesmos valores de carga, com exceção dos pHs 5 e 7, nos quais a pectina amidada apresentou maior carga negativa em relação à pectina não-amidada. Estes resultados podem ser explicados devido ao fato de que a pectina de baixo teor de esterificação apresenta um pKa de 2,9 como reportado na literatura (RALET *et al.*, 2001) e acima deste pH a solução do polissacarídeo vai estar carregada negativamente.



**Figura 1** – Potencial zeta das pectinas amidada e não-amidada

O pH escolhido para produção das partículas foi ajustado para 4,0, conforme utilizado anteriormente na literatura, quando pectina proveniente de beterraba e  $\beta$ -lactoglobulina foram utilizadas para produção de nanopartículas por interação eletrostática (SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008). A escolha deste pH é justificada pois o pI, encontrado para as proteínas do soro de leite utilizadas experimentalmente, foi de 4,5 aproximadamente (Figura 2), indicando que em pHs inferiores a 4,5 e superiores a 2,9 é possível a interação eletrostática entre a proteína e o polissacarídeo. Em relação às soluções de WPC (Figura 2), também se observou que não houve diferença entre os valores de carga das soluções independentemente do processamento térmico, com exceção do WPC desnaturado a 90° por 30 minutos, que do pH 5 ao 7 possui um maior valor de carga negativa que os demais. Com relação às proteínas do soro do leite, o ponto isoelétrico (pI) reportado na literatura varia de 4,5 a 5,2 (WALKENSTRÖM; HERMANSSON, 1997; LY *et al.*, 2008) e, em pHs inferiores ao pI, a solução proteica vai estar carregada positivamente.



**Figura 2** – Potencial zeta das soluções de proteína de soro de leite submetidas a diferentes tratamentos térmicos utilizados na elaboração das micropartículas

### 3.2 Influência do processo térmico da proteína em emulsão e do teor de CaCl<sub>2</sub> na retenção proteica

Ao analisar os teores de proteína nas micropartículas produzidas com a proteína como constituinte da emulsão (Tabela 2), constatou-se que há uma maior retenção proteica com o WPC na forma desnaturada para ambas as concentrações de CaCl<sub>2</sub> usadas, com exceção da concentração de 10% de proteína em emulsão, na qual apenas a proteína não-desnaturada no ensaio com 5% de CaCl<sub>2</sub> foi a que apresentou os menores valores, sendo os maiores teores de proteína quando 40% de WPC foi utilizado na emulsão. Esta maior retenção proteica quando a proteína está desnaturada pode estar associada ao fato de a proteína do soro de leite sofrer agregação quando passa por um processo de desnaturação com temperaturas superiores a 65°C, em que esta agregação as tornariam mais fáceis de serem encapsuladas do que as que estariam dispersas na forma não-desnaturada (MORR; HA, 1993).

**Tabela 2** – Teores de proteína nas microcápsulas produzidas por gelificação iônica contendo proteínas do soro de leite como constituintes da emulsão

% WPC na emulsão	Proteína			
	2% CaCl <sub>2</sub>		5% CaCl <sub>2</sub>	
	ND	D	ND	D
10	11,5±2,0 <sup>Ba</sup>	13,0±1,6 <sup>Ca</sup>	5,7±0,3 <sup>Cb</sup>	11,8±0,3 <sup>Ca</sup>
20	9,5±2,3 <sup>Bb</sup>	18,7±1,2 <sup>Ba</sup>	9,4±0,3 <sup>Bb</sup>	16,0±3,5 <sup>Ba</sup>
30	13,8±0,4 <sup>Bb</sup>	21,4±4,9 <sup>Ba</sup>	12,3±0,7 <sup>Ab</sup>	17,3±1,6 <sup>Ba</sup>
40	17,2±1,6 <sup>Ab</sup>	31,2±1,2 <sup>Aa</sup>	14,0±0,3 <sup>Ab</sup>	29,2±2,1 <sup>Aa</sup>

Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey (p>0,05). ND= WPC não-desnaturado; D= WPC desnaturado 90°C por 30 minutos.

Observou-se também que houve diferença significativa na incorporação proteica (Tabela 2) e nos níveis de umidade (Tabela 3) quando se utilizou uma concentração de 2 ou

5% de CaCl<sub>2</sub>, sendo que apenas o ensaio com 10% de WPC adicionado na emulsão não apresentou este comportamento, como citado anteriormente, além de haver o mesmo comportamento de retenção proteica em ambas as concentrações de cálcio. A partir disto, pode-se observar que uma concentração de 2% de CaCl<sub>2</sub> é suficiente para promover a gelificação da emulsão de pectina por meio da ligação dos grupos da pectina com o íon cálcio, favorecendo a formação da matriz que contém a proteína retida.

Todas as micropartículas (Tabela 3) apresentaram elevados teores de umidade (>96,3%), assim como as microcápsulas de gelificação iônica obtidas por Mukai-Corrêa *et al.* (2005), que apresentaram valores superiores a 90% para umidade. Esses valores elevados são característicos de micropartículas produzidas com polissacarídeos formados de géis, devido a sua elevada capacidade de reter água, sendo este teor também adequado para alimentação de larvas de peixes, uma vez que é mais similar ao alimento vivo (BASKERVILLE-BRIDGES; KLING, 2000) do que algumas dietas formuladas já testadas (YÚFERA; PASCUAL; FERNÁNDEZ-DÍAZ, 1999; KVALE *et al.*, 2006). A desvantagem de um alto conteúdo de umidade é uma deterioração mais rápida da partícula, porém todas as micropartículas foram liofilizadas para análises e para posterior oferta da dieta às larvas de pacu, como descrito no Capítulo 3.

**Tabela 3** – Teores de umidade das microcápsulas produzidas por gelificação iônica contendo proteínas do soro de leite como constituintes da emulsão

% WPC na emulsão	Umidade			
	2% CaCl <sub>2</sub>		5% CaCl <sub>2</sub>	
	ND	D	ND	D
10	97,2±1,3 Aa	98,1±0,0 Aa	97,0±0,0 Aa	97,5±0,1 Aa
20	98,4±0,0 Aa	97,5±0,1 Aa	97,5±0,1 Aa	97,4±0,3 Aa
30	97,3±0,2 Aa	97,3±0,1 Aa	97,3±0,0 Aa	96,6±0,0 Aa
40	97,8±0,0 Aa	96,4±0,1 Aa	96,8±0,0 Aa	96,3±0,2 Aa

Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey (p>0,05). ND= WPC não-desnaturado; D= WPC desnaturado 90°C por 30 minutos.

### 3.3 Influência do teor de amidação da pectina na retenção proteica

Ao se verificar que o ensaio no qual se obteve a maior inclusão proteica (40%) foi inferior ao desejado (50-60%) e que a concentração do cloreto de cálcio não influenciou na retenção proteica, realizaram-se novas tentativas, a fim de aumentar a incorporação proteica, com a utilização de uma pectina de baixo teor de esterificação não-amidada.

Ao realizar os ensaios com partículas produzidas por gelificação iônica seguida de interação eletrostática com proteínas do soro de leite, utilizando a PA e a PNA, observou-se que para ambas as pectinas houve uma maior incorporação proteica em relação aos resultados obtidos quando a proteína era adicionada à emulsão de pectina. Além disso, observou-se que existem pequenas diferenças entre os valores de umidade e proteína quando se mudou a pectina utilizada (Tabela 4). A PA apresentou os melhores resultados de absorção proteica e menores teores de umidade e, apesar de haver diferenças entre os valores de proteína e umidade ao variar a concentração de WPC em solução, todos os valores obtidos encontram-se adequados na tentativa de mimetização da *Artemia*.

**Tabela 4** – Teores de proteína e umidade das micropartículas produzidas por gelificação iônica seguidas da coacervação complexa com WPC não-desnaturado

% WPC em solução	Proteína		Umidade	
	PA	PNA	PA	PNA
4	50,47±0,64 Ba	50,61±1,47 Ba	93,63±0,19 Aa	94,93±0,37 Aa
6	60,65±1,04 Aa	53,81±1,89 Bb	89,97±0,43 Bb	93,64±0,34 ABa
8	58,45±0,56 Aa	51,28±1,38 Bb	90,10±0,31 Ba	92,55±1,02 BCa
12	56,21±3,11 Ab	60,31±1,37 Aa	86,83±0,49 Cb	91,27±0,34 Ca

PA= pectina amidada; PNA= pectina não-amidada. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha.

Portanto, para a realização dos ensaios seguintes, optou-se por trabalhar com a pectina amidada, uma vez que, além de apresentar maior absorção proteica, para a formação das microcápsulas, é necessário 2% de PA e 2% de  $\text{CaCl}_2$ , enquanto, para a PNA, é necessária uma concentração de 3% de pectina e de 5% de  $\text{CaCl}_2$ .

O fato de a PNA necessitar de uma maior quantidade de cloreto de cálcio para a formação das microcápsulas pode estar relacionado à presença dos grupos amidas na cadeia da pectina amidada, reduzindo a hidrofiliabilidade da pectina, favorecendo a formação do gel, uma vez que na pectina não-amidada há uma maior quantidade de grupos carboxílicos livres que estão aptos a interagirem com outras substâncias (MAESTRELLI *et al.*, 2008).

Os grupos amida formados pela desmetoxilação da pectina em presença de amônia modifica as propriedades viscoelásticas dos géis de pectina com cálcio. Pectinas amidadas podem formar géis mais fortes, especialmente em condições de pH baixo, devido à formação de ligações de hidrogênio entre os grupos amida. Em razão da formação de pontes de hidrogênio, elas necessitam de um menor teor de cálcio para gelificar (FRAEYE *et al.*, 2010).

Além do grau de amidação, o grau de esterificação de uma pectina também influencia na sua gelificação, uma vez que, quanto menor o grau de esterificação, maior será a sensibilidade da pectina ao cálcio como agente de gelificação, formando géis mais rígidos (SRIAMORNSAK, 1998). A PA utilizada nos testes, além de apresentar teores de amidação superiores a da PNA, também apresenta um menor grau de esterificação (como citado anteriormente), o que a torna mais favorável à formação de géis mais rígidos pela ação do cálcio, com ligações cruzadas entre as cadeias de ácido galacturônico do que as não-amidadas.

Essa diferença nas concentrações de pectina e  $\text{CaCl}_2$  entre a PA e a PNA também foi verificada por Capel *et al.* (2006) que ao avaliarem a influência do cloreto de cálcio na gelificação de pectinas, sendo uma amidada e a outra não, verificaram que a pectina que possuía grupamentos amina formaram géis mais fortes em relação a que não os possuíam. Isto também foi reportado por Ralet *et al.* (2001), quando afirmaram que pectinas amidadas necessitam de uma menor quantidade de cálcio para gelificar e possuem uma menor

probabilidade de precipitarem quando há um teor elevado de cálcio do que as não-amidadas.

Apesar da insignificante influência do teor de amidação da pectina, pode-se observar que houve uma diferença significativa nos teores de umidade e proteína conforme a porcentagem de WPC aumenta em solução, sendo que quanto menor a concentração de WPC em solução, maior o teor de umidade (Tabela 4). Em relação aos teores de proteína (Tabela 4), apesar de haver diferenças estatísticas, todas as concentrações foram suficientes para garantir uma incorporação proteica superior a 50%, valor considerado adequado para alimentação de larvas de peixe (BASKERVILLE-BRIDGES; KLING, 2000).

A associação da gelificação iônica seguida de interação eletrostática com as proteínas do soro de leite na forma não-desnaturada garantiu uma boa incorporação proteica e, a partir disso, verificou-se se a forma de desnaturação do WPC poderia melhorar os teores de proteína nas micropartículas. Para o WPC desnaturado a uma concentração de 12%, não foi possível a realização do recobrimento, uma vez que a solução ficou muito espessa, dificultando a agitação e o correto recobrimento nas microcápsulas.

### **3.4 Influência do tratamento térmico da proteína na retenção proteica**

Como pode ser observado na Tabela 5, os maiores teores de proteína adsorvida foram obtidos quando esta se encontrava na forma não-desnaturada para a realização do recobrimento.

**Tabela 5** – Teores de proteína para cápsulas produzidas por gelificação iônica seguida de coacervação complexa

<b>Cápsulas de gelificação iônica + coacervação complexa</b>			
<b>% WPC em solução</b>	<b>Não-desnaturado</b>	<b>Desnaturado</b>	
		<b>90°C/ 30 min</b>	<b>80°C/ 15 min</b>
4	50,47±0,64 Ca	29,40±2,45 Bc	41,15±3,12 Ab
6	60,65±1,04 Aa	38,31±1,26 Ac	49,31±6,68 Ab
8	58,45±0,56 Aa	25,78±1,70 Bc	40,96±6,9 Ab
12	56,21±3,11 B	---	---

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha.

Em relação a influência da concentração de WPC em solução pode-se observar que em relação ao WPC não desnaturado os ensaios com 6 e 8% diferiram significativamente dos demais. A concentração de 6% de WPC desnaturado a 90°C por 30 minutos foi a que apresentou a maior retenção proteica, diferindo das demais, porém esta quantidade de proteína é baixa quando comparada aos nauplios de *Artemia*. Em todas as concentrações de WPC há uma retenção significativamente maior de proteína quando este se encontra na forma não desnaturada, seguido pela desnaturação a 80°C por 15 minutos.

Acredita-se que este comportamento de maior retenção proteica quando o WPC encontra-se na forma não desnaturada possa ser explicado devido ao fato que moléculas de biopolímeros interagem entre si e com outras moléculas por meio de diferentes tipos de ligações. A força dessas ligações, o sinal e a magnitude podem ser modulados por mudanças nas condições do meio ou da composição da solução, como o pH, força iônica e temperatura. Estas forças são as responsáveis por manter os biopolímeros unidos e determinam a maneira como a partícula responde às diferentes condições do meio (JONES; MCCLEMENTS, 2010a). A desnaturação térmica utilizada no presente trabalho pode alterar a capacidade de ligação da proteína com outros biopolímeros.

A interação eletrostática ocorre entre as cargas dos biopolímeros, principalmente em sua superfície. A distribuição das cargas na superfície de uma proteína é heterogênea, com quantidades variáveis de regiões positivas e negativas, o que permite a sua interação com outras moléculas (JONES; MCCLEMENTS, 2010a).

Apesar de o potencial zeta das soluções de WPC não-desnaturado e desnaturado não apresentarem diferença em relação ao teor de cargas no pH 4, acredita-se que, devido a diferença de incorporação protéica, houve uma maior interação eletrostática do WPC com a pectina quando este se encontrava na forma não-desnaturada.

As proteínas podem interagir com outros materiais por meio de diversas interações físicas e químicas, sendo que as interações físicas, como a eletrostática, desempenham um papel importante na ligação com solventes, surfactantes, fosfolípidos, açúcares e polissacarídeos. Ao submeter as proteínas globulares a tratamento térmico como, por exemplo, a desnaturação que foi empregada, há uma agregação das proteínas através da formação de ligações hidrofóbicas e dissulfídicas (JONES; MCCLEMENTS, 2010a).

Nas proteínas globulares, como a  $\beta$ -lactoglobulina, a cadeia polipeptídica é geralmente dobrada em uma conformação esferoide compacta, com a maioria dos aminoácidos apolares localizados no interior e os aminoácidos polares localizados no exterior (SENO; TROVATO, 2007). Quando uma proteína globular torna-se desnaturada, as suas interações químicas e físicas mudam sensivelmente de tal forma que há exposição dos grupos apolares e dos grupos contendo enxofre que estavam originalmente no interior compacto da proteína globular. Consequentemente, as proteínas desnaturadas possuem uma maior tendência para agregação por meio da formação de ligações hidrofóbicas e dissulfídicas (JONES; MCCLEMENTS, 2010a).

Estas agregações das proteínas as tornam mais unidas, o que poderia facilitar o processo de encapsulação quando está presente como constituinte de recheio. Isto já não é verdadeiro quando a proteína é utilizada como um material de cobertura, pois a sua agregação pode dificultar a sua ligação com outros materiais, como os polissacarídeos, diminuindo, portanto, os teores de proteínas associadas com o polissacarídeo, como pode ser observado na Tabela 5, na qual as partículas submetidas à interação eletrostática com as proteínas na forma desnaturada apresentaram uma menor incorporação proteica.

Jones e McClements (2010a) formaram nanopartículas aquecendo a 80°C por 15 minutos misturas de  $\beta$ -lactoglobulina e pectina em condições de concentração e pH que permitiram a formação de complexos. Sabendo-se que a este tempo e temperatura há interação entre a  $\beta$ -lactoglobulina e pectina, pode-se observar que houve uma adsorção proteica superior do que quando se aumentou o tempo e a temperatura de desnaturação da proteína, porém estes valores ainda foram bastante inferiores ao obtidos quando se utilizou a proteína na sua forma não-desnaturada (Tabela 5).

Como a  $\beta$ -lactoglobulina, proteína presente em maior quantidade no WPC, apresenta uma temperatura de desnaturação de 70°C, ambas as condições de desnaturação do presente trabalho garantiram a ocorrência da desnaturação da proteína. Quando esta proteína encontra-se no estado desnaturado, ela apresenta cinco resíduos de cisteína, sendo que quatro destas estão envolvidas nas ligações dissulfídicas no seu estado não-desnaturado (HOFFMANN; VAN MIL, 1997). Com o aquecimento, a conformação da  $\beta$ -lactoglobulina se altera, expondo as suas ligações apolares e as ligações dissulfídicas, geralmente encontradas no interior da proteína (CHANASATTRU *et al.*, 2009).

Na presença da pectina, as moléculas de proteína ligam-se às moléculas do polissacarídeo em temperatura ambiente por meio de interações eletrostáticas em condições de pH favoráveis à interação. Após o aquecimento, as moléculas globulares de proteína se abrem e se separam das moléculas de pectina e se agregam, rapidamente, na fase aquosa, podendo dificultar a sua ligação à pectina (CHANASATTRU *et al.*, 2009).

### **3.5 Morfologia e microestrutura das micropartículas**

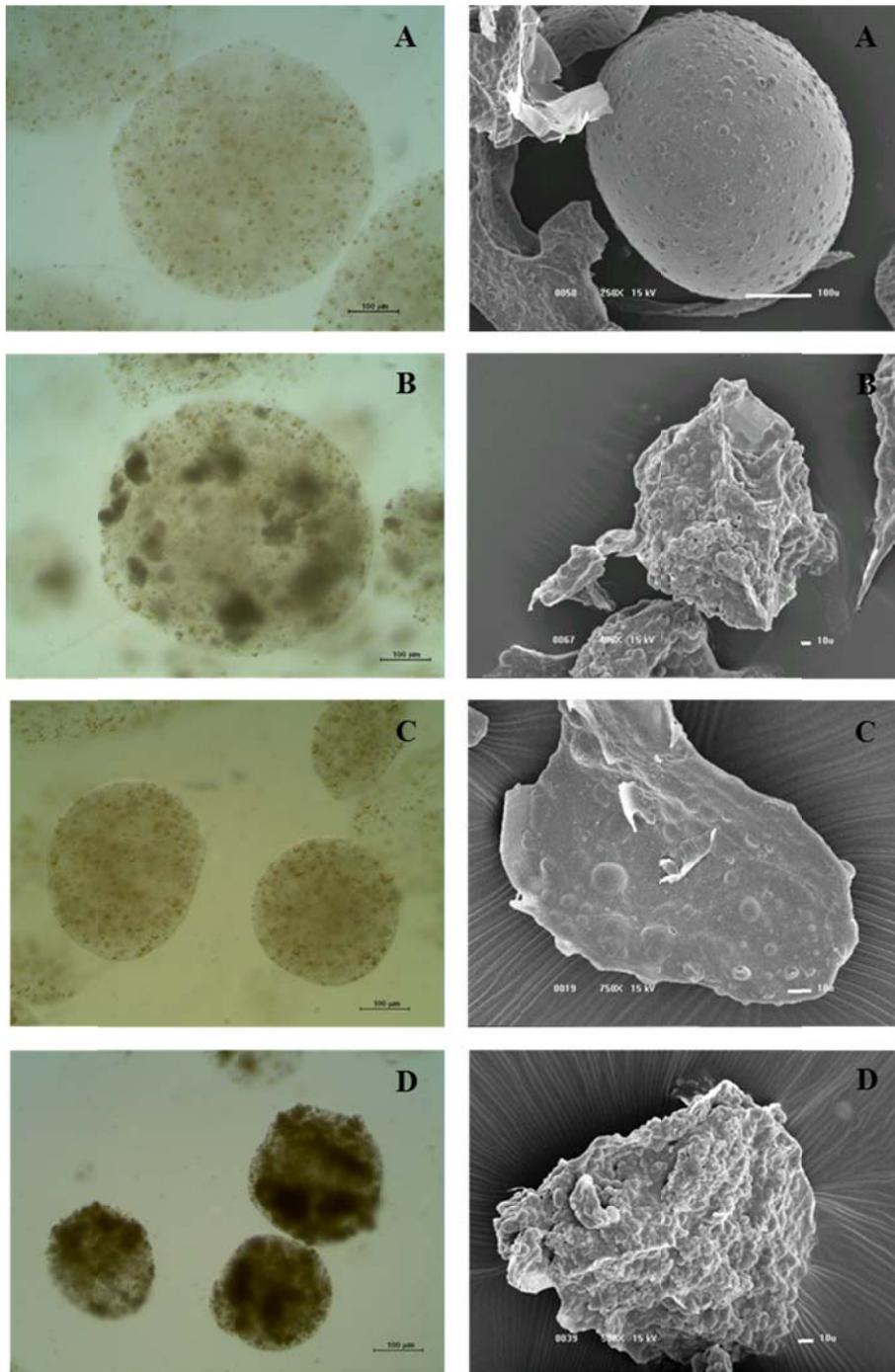
A morfologia das micropartículas dos ensaios preliminares, observada por microscopia ótica e eletrônica de varredura (Figuras 3, 4 e 5), mostra a formação de matrizes multinucleadas, com a parede definida e contínua ao redor da micropartícula. O conteúdo lipídico ficou distribuído uniformemente na matriz de pectina, observando-se distribuição dos diferentes tamanhos de gotas lipídicas por toda a extensão da micropartícula. As micropartículas apresentam, em sua maioria, forma esférica ou aproximadamente esférica.

Pode-se verificar que a desnaturação térmica da proteína e a concentração de cloreto de cálcio não alterou a morfologia da micropartícula quando essa foi inserida na emulsão de pectina para formação da matriz (Figura 3). Além disso, é evidente a aglomeração proteica nas micropartículas onde o WPC foi desnaturado antes da sua incorporação na emulsão, evidenciando, assim, que houve agregação das proteínas após o processo da desnaturação térmica (Figura 3B e 3D). Para as micropartículas contendo o WPC na sua forma não-desnaturada, não há presença de aglomerados, havendo uma distribuição uniforme do conteúdo proteico na matriz de pectina (Figura 3A e 3C).

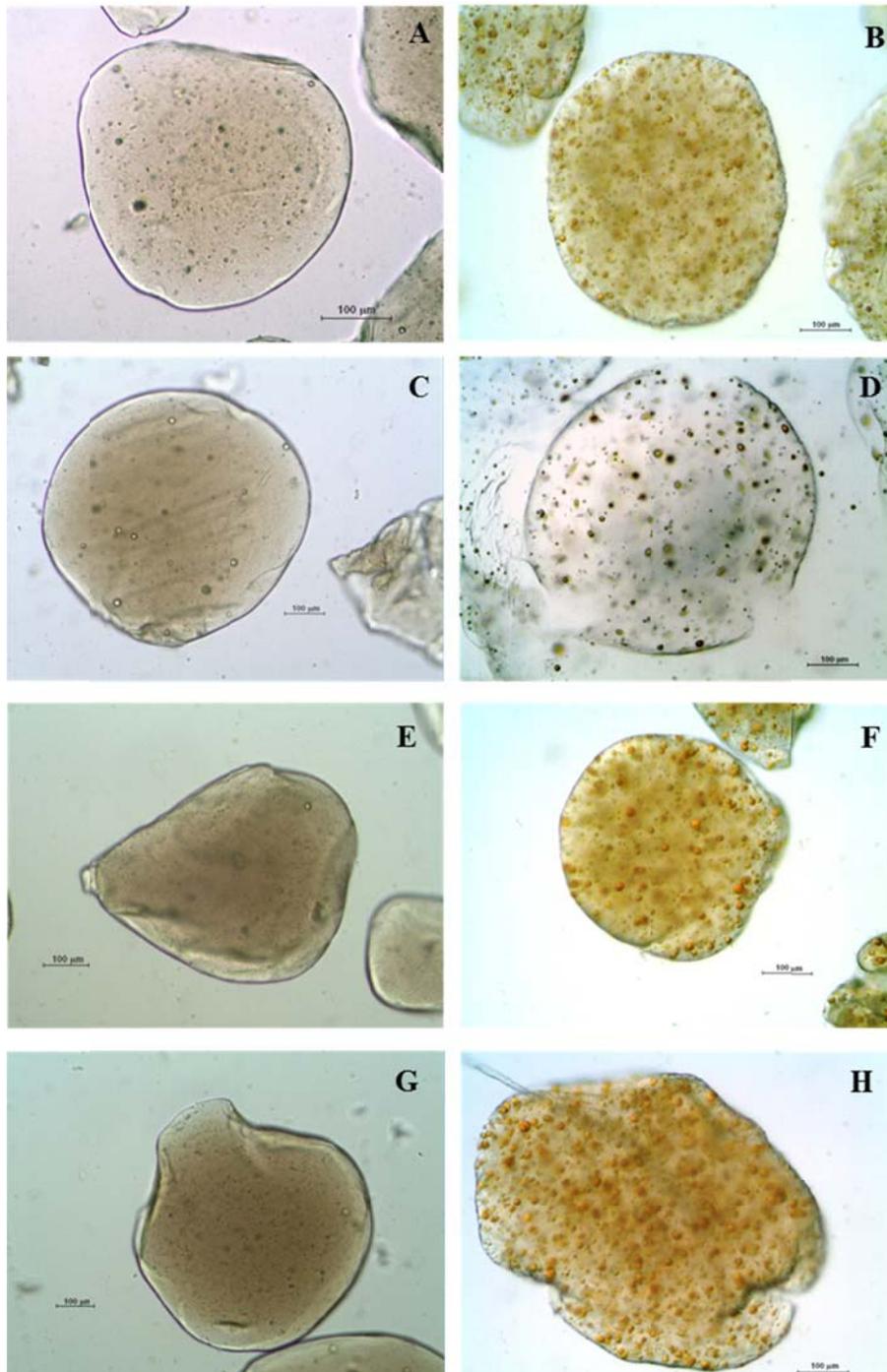
A observação da microscopia eletrônica de varredura para as partículas secas (Figura 3) mostra que micropartículas contendo WPC na forma não-desnaturada apresentaram um formato mais esférico em relação às que continham o WPC na forma desnaturada. Ambas mantiveram-se parcialmente íntegras após o processo de secagem, apresentando um contorno semelhante ao esférico, com partículas globulares de gorduras presentes no material de parede e sem rachaduras e furos aparentes.

A microscopia ótica das partículas úmidas produzidas por gelificação iônica com PA e PNA (Figura 4) e recobertas com WPC não desnaturado demonstra que há formação de partículas similares em relação ao formato quando há uma concentração de 2% de PA com 2% de  $\text{CaCl}_2$  e 3% de PNA com 5% de  $\text{CaCl}_2$ . A diferença da concentração da PA e da PNA e do  $\text{CaCl}_2$  não afetou a distribuição do material de recheio na partícula. Além disso, pode-se observar (Figura 4) que não há presença do WPC no interior da partícula, uma vez que este foi adicionado como material de cobertura, e não como constituinte de recheio.

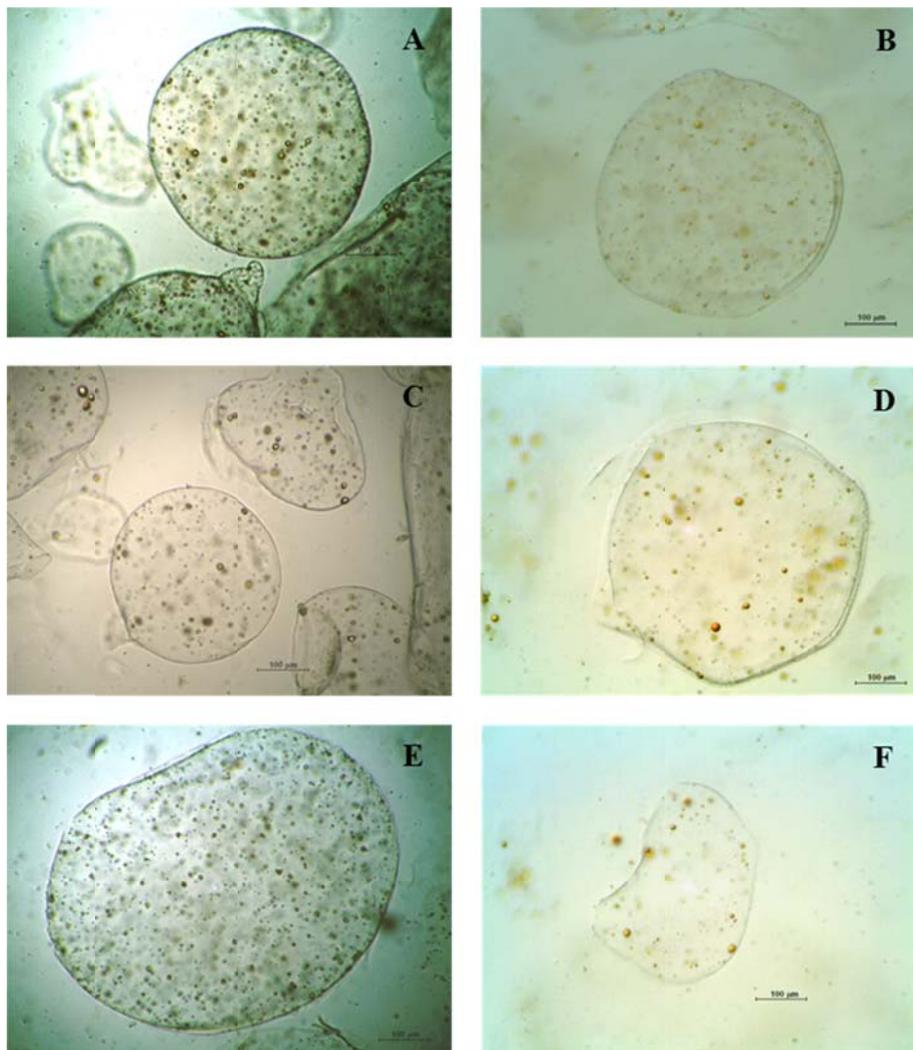
Isso também pode ser observado em relação às diferentes temperaturas utilizadas para o tratamento térmico (Figura 5), demonstrando que não houve diferenças evidentes na formação das micropartículas, apresentando características morfológicas similares às demais partículas (Figura 3 e 4). A partir disto pode-se verificar que o tratamento térmico da proteína utilizada como material de cobertura não influencia na formação, forma e distribuição de recheio da partícula. Diferindo das partículas que continham a proteína como constituinte da emulsão (Figura 3) onde pode-se observar diferenças em relação a distribuição da proteína na matriz de pectina.



**Figura 3** – Microscopia ótica das partículas úmidas e eletrônica de varredura das micropartículas liofilizadas contendo proteína do soro de leite (WPC) como constituinte da emulsão. A – 40% WPC não-desnaturado, 2%  $\text{CaCl}_2$ ; B – 40% WPC desnaturado, 2%  $\text{CaCl}_2$ ; C – 40% WPC não-desnaturado, 5%  $\text{CaCl}_2$ ; D – 40% WPC desnaturado, 5%  $\text{CaCl}_2$ .



**Figura 4** – Microscopia ótica das micropartículas úmidas produzidas por gelificação iônica seguidas de interação eletrostática com o concentrado proteico de soro de leite (WPC) não-desnaturado. A – 4% WPC, pectina não-amidada; B – 4% WPC, pectina amidada; C – 6% WPC, pectina não-amidada; D – 6% WPC, pectina amidada; E – 8% WPC, pectina não-amidada; F – 8% WPC, pectina amidada; G – 12% WPC, pectina não-amidada; H – 12% WPC, pectina amidada.



**Figura 5** – Microscopia ótica das micropartículas produzidas por gelificação iônica seguidas de interação eletrostática com o concentrado proteico de soro de leite (WPC) desnaturado. A – 4% WPC desnaturado 80°C 15 min; B – 4% WPC desnaturado 90°C 30 min; C – 6% WPC desnaturado 80°C 15 min; D – 6% WPC desnaturado 90°C 30 min; E – 8% WPC desnaturado 80°C 15 min; F – 8% WPC desnaturado 90°C 30 min.

#### **4 CONCLUSÕES**

Com base na análise dos resultados obtidos nos ensaios preliminares, pode-se observar que a pectina amidada apresentou, de uma maneira geral, os maiores teores de retenção proteica associados a um nível de umidade adequado ao desejado. Além disso, a melhor incorporação proteica ocorreu quando o WPC foi adicionado à micropartícula após

a gelificação iônica por interação eletrostática. Dentre os tratamentos térmicos da proteína utilizados para interação eletrostática, a proteína na sua forma não-desnaturada foi a que apresentou os melhores resultados de adsorção proteica, sendo, portanto, esta metodologia a selecionada para a elaboração das dietas experimentais.

**CAPÍTULO 3**

**UTILIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO**  
***Lactobacillus acidophilus* PARA ALIMENTAÇÃO DE LARVAS**  
**DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*)**

### **CAPÍTULO 3 - UTILIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO *Lactobacillus acidophilus* PARA ALIMENTAÇÃO DE LARVAS DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*)**

#### **1 INTRODUÇÃO**

O clima e potencial hídrico do Brasil são favoráveis para o cultivo de diversas espécies de peixes (BEERLI; LOGATO; FREITAS, 2004), incluindo o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). A larvicultura apresenta algumas dificuldades em relação aos fatores que interferam na sobrevivência das larvas como, por exemplo, condições ambientais adequadas e inexistência de alimento formulado que substitua satisfatoriamente o alimento vivo (BEERLI; LOGATO; FREITAS, 2004; BOCK; PADOVANI, 2000).

Náuplios de *Artemia* são o alimento mais utilizado no cultivo de larvas de peixes, apresentando ótimos resultados de crescimento, porém associado a um elevado custo. Uma das alternativas potenciais para a obtenção de uma dieta inerte com resultados de aceitação e crescimento similares ao alimento vivo é a utilização da microencapsulação. Esta técnica já vem sendo aplicada para este fim, porém ainda não se obteve resultados de desempenho similares ao alimento vivo, podendo isto estar relacionado à dificuldade para digestão, os tipos de ingredientes utilizados, a composição nutricional, a atratividade e a cor das dietas (LANGDON, 2003).

A técnica de gelificação iônica é simples, não envolve o uso de solventes orgânicos ou temperatura e pHs drásticos, o que a torna de baixo custo em comparação às demais técnicas e também em relação ao alimento vivo (LANGDON, 2003). Dietas microencapsuladas, obtidas por gelificação iônica, foram testadas em peixes de água doce e apresentaram alta taxa de ingestão, estabilidade em água e à ruptura da partícula, e boa digestão por algumas espécies de peixes de água doce (LÓPEZ-ALVARADO; LANGDON; TESHIMA, 1994; GUTHRIE *et al.*, 2000).

A técnica utilizada na elaboração de dietas inertes deve garantir que a partícula seja visível, capturável pelas larvas, contendo cor, forma, tamanho, velocidade de decantação e propriedades de liberação adequados para que a dieta seja atrativa e se obtenha sucesso na

alimentação das larvas. Além disso, as larvas devem ser capazes de digerir as partículas, de absorver e de assimilar os nutrientes para terem um bom crescimento e sobrevivência (KVALE *et al.*, 2006).

A criação intensiva de peixes pode levar a prejuízos na manutenção de sua saúde microbiana, podendo aumentar os custos com medicamentos. A promoção do crescimento sem danificação da flora intestinal pode ser obtida por meio da inclusão de micro-organismos probióticos às dietas (AL-DOHAIL; HASHIM; ALIYU-PAIKO, 2009).

A utilização de probióticos na aquicultura exige que eles possuam algumas características básicas, tais como, não serem patogênicos ao hospedeiro e a outros organismos aquáticos, serem capazes de colonizar o intestino do hospedeiro, não serem resistentes a antibióticos e serem registrados para utilização como aditivo alimentar (MERRIEFIELD *et al.*, 2010).

Os parâmetros de aplicação, como a dose e o tempo de administração, não estão estipulados em relação a probióticos para aquicultura, porém acredita-se que a dose ideal é aquela que consiga promover uma proteção do hospedeiro e/ou estimular o seu crescimento. Geralmente a dose utilizada em aquicultura varia de  $10^{6-10}$  CFU/g de dieta, entretanto a dose ideal pode variar conforme a espécie e os parâmetros imunológicos (NAYAK, 2010; CARNEVALI *et al.*, 2006; GALINDO *et al.*, 2009), bem como com relação ao tempo de administração, que pode variar de 1-10 semanas (NAYAK, 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar se micropartículas produzidas pelas técnicas combinadas de gelificação iônica, utilizando pectina de baixo teor de esterificação amidada e recobrimento por interação eletrostática, com proteínas de soro de leite, são capazes de mimetizar os náuplios de *Artemia* em relação ao seu perfil nutricional e proporcionar desenvolvimento e sobrevivência de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Além disso, também se avaliou a influência da adição à dieta do micro-organismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* sobre o desempenho de crescimento e sobrevivência, e a resistência das larvas ao estresse. As micropartículas foram caracterizadas também em relação a sua capacidade de hidratação, tamanho e morfologia.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Pectina cítrica de baixo teor de esterificação amidada – LMAP (CPKelco, mistura de diferentes lotes, Limeira, São Paulo, Brasil), concentrado proteico de soro de leite – WPC (Lacprodan, lote Lac804U17601, 76, Portenã, Província de Córdoba, Argentina), cloreto de cálcio anidro P.A. (Dinâmica, lote 36308, P.M. 110,99), óleo de salmão (desodorizado, contendo antioxidante, de uso comestível, fornecido por DDK Comércio Importação e Exportação Ltda.), ácido clorídrico 0,1N (Merck), hidróxido de sódio a 50% (nuclear, P.M. 40, Diadema, São Paulo, Brasil), ácido sulfúrico (Synth, P.M. 98,08, Diadema, São Paulo, Brasil), CPSP 90 – *Concentré de Protéine Soluble de Poisson* (Anorel, Le Portel, França), mistura mineral e vitamínica (Fri-Ribe, Pitangueiras, Brasil, contendo, de acordo com o fabricante as quantidades por 100g da mistura são de: ácido fólico 1 mg, ácido pantotênico 20 mg, antioxidante BHT 125 mg, colina 150 mg, cobre 10 mg, ferro 100 mg, iodo 5 mg, manganês 70 mg, selênio 0,15 mg, vitamina A 3000 UI.kg<sup>-1</sup>, vitamina B1 6 mg, vitamina B12 20 mg, vitamina B2 8 mg, vitamina B6 3 mg, vitamina C 350 mg, vitamina D3 3000 UI.kg<sup>-1</sup>, vitamina E 200 mg, vitamina K 6 mg, zinco 150 mg, niacina 100 mg, biotina 0,10 mg), micro-organismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* (La-05, Christian Hansen, Valinhos, Brasil), dieta microencapsulada comercial (Hatchfry Encapsulon III – Argent Laboratories, USA).

### 2.2 Caracterização físico-química dos materiais

#### 2.2.1 Composição centesimal

Os materiais utilizados – LMAP, WPC, CPSP 90 – foram caracterizados, em triplicata, em relação ao conteúdo total de proteína, umidade e cinzas, de acordo com AOAC (2006), e lipídeos, segundo Bligh e Dyer (1959).

Para a quantificação de proteína, foi utilizada a metodologia de Kjeldahl, utilizando-se os fatores de correção de 6,38 e 6,25 para conversão de nitrogênio em proteína, para o WPC e para os demais materiais protéicos, respectivamente. Em todas as análises, foi utilizado como branco uma partícula sem cobertura proteica para corrigir o teor de nitrogênio não-proteico presente na LMAP.

### 2.2.2 Caracterização da pectina

A LMAP utilizada foi caracterizada de acordo com FAO (2009) em relação ao seu teor de ácidos galacturônicos (AG), grau de esterificação (GE) e grau de amidação (GA) por meio de titulometria.

### 2.2.3 Potencial zeta

A análise do potencial zeta das soluções (0,5% p/p) – WPC, LMAP – foi avaliada com a utilização do equipamento Zetasizer (Malvern, Worcestershire, UK), sendo realizada a medição do pH 3 até o pH 7. As medidas foram feitas para duas amostras, preparadas de forma independente. Para cada amostra, foram feitas duplicatas das leituras e os resultados expressos como médias.

## **2.3 Dietas microencapsuladas**

### 2.3.1 Produção

Inicialmente diferentes concentrações de WPC em solução (4 a 12%) foram testadas para verificar a capacidade das partículas produzidas por gelificação iônica em adsorver as proteínas do soro por interação eletrostática sobre sua superfície, a fim de alcançar valores aproximados da composição centesimal de náuplios de *Artemia*.

As micropartículas foram preparadas com uma solução de LMAP (2% p/volume

total da emulsão) emulsificada com óleo de salmão (25% p/p.sólidos totais), utilizando-se um homogeneizador ultra turrax (14000 rpm/ 3min). A emulsão foi pulverizada através de um atomizador duplo fluido (1,5 mm) com fluxo de ar comprimido (0,125 kgf/cm<sup>2</sup>), posicionado a 12 cm da solução de cloreto de cálcio (2% p/p, pH 4,0) sob agitação magnética constante. As micropartículas foram mantidas por 30 minutos (tempo de cura) na solução de cloreto de cálcio para sua completa gelificação. Após o tempo de cura, as micropartículas foram lavadas com água pH 4,0 em peneiras ( $\phi = 125 \mu\text{m}$ ) e dispersas em soluções de WPC não-desnaturado (4, 6, 8 e 12% p/p, pH 4,0) sob agitação magnética constante por 30 minutos. As partículas foram novamente transferidas para peneiras ( $\phi = 125 \mu\text{m}$ ) e lavadas com água a pH 4,0. Essas partículas foram utilizadas para a determinação do teor de umidade e quantidade de proteína adsorvida. Pelo menos dois lotes independentes foram produzidos e caracterizados.

Nas dietas para o experimento *in vivo*, além da emulsão de pectina contendo o óleo, foi adicionada a mistura mineral e vitamínica (0,5% p/p sólidos totais), antes da metodologia acima descrita. Nas dietas que continham o micro-organismo probiótico, este também foi adicionado à emulsão, a fim de obter uma concentração de aproximadamente 10<sup>5</sup> UFC/g de partícula liofilizada. Além disso, adicionou-se 0,1% (p/v) de hidrolisado de peixe comercial CPSP 90 à solução de WPC.

Após a lavagem, as microcápsulas foram secas em liofilizador (Edwards Pirani 501). A temperatura foi reduzida para -40°C, sob pressão de 0,1 mmHg. O ponto final de secagem foi estabelecido na temperatura final de 25°C. O material seco foi acondicionado em frascos com tampa e armazenados em freezer a -18°C. Para a produção das dietas, foram realizados nove lotes independentes. Após a secagem os lotes foram misturados, a mistura foi caracterizada e utilizada no ensaio biológico.

## **2.4 Caracterização físico-química das dietas microencapsuladas**

### **2.4.1 Composição centesimal**

As micropartículas úmidas foram caracterizadas, em triplicata, em relação ao conteúdo total de proteína, umidade e cinzas, de acordo com A.O.A.C. (2006), e lipídeos,

segundo Bligh e Dyer (1959). Para a correta determinação do teor lipídico, foi necessária a realização de uma digestão prévia da proteína, permitindo a extração completa do conteúdo lipídico, uma vez que este ficava retido na fração proteica. Para isto, foram pesados 5g de cápsulas úmidas, às quais foi adicionado citrato de sódio (2% p/p), para dissolução das cápsulas e liberação do conteúdo. Após, adicionou-se 0,3mg/g de pepsina, corrigiu-se o pH para 3, agitou-se por 1 minuto, mantendo-as em banho (37°C) com agitação por 4 horas. Corrigiu-se o pH para 7, adicionou-se 0,3mg/g de pancreatina, agitou-se por 1 minuto, mantendo-as em banho (37°C) por 12 horas. Após essas etapas, seguiu-se a metodologia normal de extração pelo método de Bligh e Dyer (1959).

#### 2.4.2 Tamanho médio e distribuição de tamanho

O tamanho das micropartículas úmidas suspensas em água com pH ajustado para 7,0 e das secas por liofilização e reidratadas diretamente em água a pH 7,0 foi determinado em triplicata para cada amostra, utilizando-se um medidor de tamanho Mastersizer 2000 (Malvern, Worcestershire, UK). Para as partículas secas, foram utilizados dois tempos de reidratação, a saber:  $t_0$ , foi adicionada água às partículas secas, estas foram rapidamente agitadas e, imediatamente, foi realizada a determinação do tamanho;  $t_1$ , foi adicionada água às partículas secas e estas ficaram sob agitação constante em um homogeneizador de soluções AP 22 (Phoenix, Araraquara, Brasil) por uma hora antes da determinação do tamanho. Para as partículas úmidas, a leitura do tamanho também foi realizada imediatamente após o contato em água a pH 7,0. Os resultados de tamanho são apresentados como tamanho médio (D50) e desvio padrão. Adicionalmente, para as dietas experimentais (OS e OSPro), após uma hora de hidratação a pH 7,0, amostras de cada dieta foram filtradas em papel filtro, os sobrenadantes descartados e o teor de proteína nas partículas determinado (AOAC, 2006), em triplicata.

### 2.4.3 Morfologia e microestrutura

A morfologia das micropartículas úmidas e reidratadas em pH 7,0 foi observada por microscopia ótica (Jenaval, Carl Zeiss, Toronto, Canadá) com captação de imagens por câmara digital, usando objetiva 12,5, optvar 1,25x e o programa EDN-2 – Microscopy Image Processing System. A microestrutura das partículas liofilizadas foi observada em microscópio eletrônico de varredura (SEM) Jeol (T300, Japão), utilizando-se 15 kV. As amostras foram previamente fixadas em *stubs* com fita metálica dupla face e recobertas com uma fina camada de ouro (40mA/150s) por meio do evaporador Baltzer SCD50 (Baltec, Liechtensten).

## 2.5 Manutenção e preparo dos micro-organismos probióticos

A cultura probiótica comercial de *Lactobacillus acidophilus* – La5 utilizada para a produção das microcápsulas foi reidratada em leite esterilizado desnatado reconstituído a 11% de sólidos totais, adicionada de um crioprotetor (glicerol 10%), distribuída em microtubos tipo Eppendorf e armazenada sob congelamento (-18°C) até sua utilização. Para a obtenção da suspensão de células de *L. acidophilus* La-5, retirou-se, aleatoriamente, uma amostra congelada, e a cultura foi repicada três vezes consecutivas em caldo MRS (Oxoid), tendo sido incubada a 37°C por 15 horas. A cultura foi centrifugada (centrífuga RC5C, Sorvall Instruments, Du Pont, Wilmington, USA) a 7000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O concentrado de células foi ressuscitado em água peptonada 0,1% para lavagem das células, seguindo-se nova centrifugação nas mesmas condições. Após a lavagem das células, estas foram ressuscitadas em água peptonada 0,1%. A contagem das células foi determinada após técnica de diluições sucessivas em água peptonada a 0,1% e plaqueamento em profundidade em placas de Petri, utilizando-se ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas em condições de anaerobiose, utilizando-se gerador de anaerobiose Anaerogen (Oxoid, Cambridge, UK). A suspensão de células foi utilizada subsequentemente na produção das micropartículas (2% v/v). Para a contagem dos micro-organismos encapsulados, as microcápsulas reidratadas em água peptonada (pH 4,0) por 15

minutos foram rompidas por exposição à solução de citrato de sódio (2% p/v), sob vigorosa agitação por 5 minutos, a pH 7,0 e a contagem foi realizada como descrito anteriormente.

## 2.6 Ensaio *in vivo*

O ensaio biológico foi realizado no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. As larvas de pacu foram obtidas por reprodução induzida de um único casal de reprodutores. A alimentação exógena iniciou-se quatro dias após a eclosão.

Numa fase pré-experimental, as larvas foram estocadas em uma densidade de 20 larvas/L em 30 tanques de polietileno com 100 litros de água proveniente de poço artesiano, em fluxo contínuo e com aeração artificial constante. As larvas foram alimentadas *ad libitum* com náuplios de *Artemia franciscana* recém-eclodidos, até alcançarem peso médio de 20 mg.

Após esse período, aproximadamente duas semanas, as larvas ( $13,28 \pm 0,93$  mm de comprimento total e  $21,00 \pm 6,40$  mg de peso úmido) foram contadas individualmente e distribuídas em 20 tanques de polietileno de 50L, na densidade de 10 larvas/L, com fluxo de água e aeração artificial contínuos ( $29,5 \pm 0,6^\circ\text{C}$  e  $5,3 \pm 0,1 \text{mg/L}^{-1}$  de oxigênio dissolvido).

As larvas foram alimentadas com as seguintes dietas: JJ- larvas mantidas em jejum por todo o período experimental (controle negativo); AN- larvas alimentadas somente com náuplios de artemia recém-eclodidos (controle positivo); DMC- larvas alimentadas com dieta microencapsulada comercial Hatchfry; OS- larvas alimentadas com a dieta teste contendo óleo de salmão e OSPro- larvas alimentadas com a dieta teste contendo óleo de salmão e o probiótico *Lactobacillus acidophilus*.

Para os tratamentos DMC, OS e OSPro, foi realizada uma fase coalimentação por três dias, com as dietas mais náuplios de *Artemia*, antes de começar o tratamento exclusivo com as dietas. As larvas foram alimentadas cinco vezes ao dia e, durante o período de coalimentação, as dietas formuladas foram ofertadas em excesso logo após a oferta dos náuplios, que foram diminuindo gradualmente para 75%, 50% e 25% do total ofertado. Os resíduos acumulados no fundo dos tanques foram removidos diariamente por sifonamento.

As larvas foram individualmente pesadas e medidas (n=25 por tanque) no início do tratamento e também após 7, 14, 21 e 28 dias de experimento. As médias do peso úmido e do comprimento total foram calculadas. A taxa de crescimento específico (TCE) foi calculada por meio da seguinte fórmula:  $TCE = 100 \times (\ln W_F - \ln W_I) / d$ , em que W e L são os pesos (g) e tamanhos (mm) individuais das larvas; F e I representam os valores iniciais e finais; e d é o número de dias entre as medidas de biometria.

Ao final do experimento, todos os peixes em cada tratamento foram contados para determinação da sobrevivência (S) por meio da seguinte expressão:  $S = 100 \times N_F / (N_I - N_S)$ , em que N é o número de peixes em cada tanque, F e I representam os valores finais e iniciais e S representa os peixes de cada tanque que foram coletados para as análises do experimento. A taxa de canibalismo (C) foi determinada a partir da porcentagem da diferença do número de larvas iniciais, subtraída das que foram contabilizadas como mortas, das coletadas para análises e das restantes no tanque. Utilizando-se a equação para determinação:  $C = (I - S - F - M) / I \times 100$ , em que I é o número de larvas iniciais estocadas; S é o número de larvas removidas para biometrias durante o experimento; F o número final de larvas em cada tanque e M o número de larvas mortas retiradas dos tanques durante o experimento.

#### 2.6.4 Taxa de ingestão

A taxa de ingestão foi determinada pela observação intestinal de larvas, com auxílio de um microscópio óptico CX31 (Olympus, Japão). Vinte larvas foram colocadas em recipientes após 12 horas de jejum e receberam as dietas microencapsuladas testadas. Após 30 minutos, as larvas foram abatidas com benzocaína (0,01mL/L), e o conteúdo intestinal analisado. A taxa de ingestão foi expressa em porcentagem de larvas que ingeriram as microcápsulas no período de 30 minutos (TESSER; PORTELLA, 2006). O teste foi realizado em triplicata para cada dieta experimental.

#### 2.6.5 Teste de exposição ao ar

O teste de exposição ao ar foi aplicado após 21 dias de alimentação com as micropartículas. As larvas foram contadas (20 larvas/recipiente) e distribuídas em 32 recipientes plásticos de volume individual de 1,2 L, com temperatura controlada ( $29,5\pm 0,6^{\circ}\text{C}$ ) e aeração contínua. As larvas de cada tratamento experimental (AN, OS, OSPro e DMC) foram submetidas ou não à exposição ao ar por um minuto (adaptado de LUZ, 2007), constituindo oito tratamentos com quatro repetições de cada. Após 72 horas, avaliou-se a sobrevivência das larvas expostas ou não expostas ao ar. A sobrevivência foi determinada pela porcentagem de larvas que morreram em relação ao número inicial de larvas por tratamento.

#### 2.6.6 Análise estatística

Os resultados de adsorção proteica, umidade e tamanho, assim como os resultados biológicos de comprimento total, peso, TCE, sobrevivência, canibalismo, mortalidade após exposição ao ar foram analisados estatisticamente, utilizando-se ANOVA. Nos resultados que apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey. As variáveis biológicas foram submetidas a testes para verificar a normalidade de erro (Cramer Von Mises) e a homocedasticidade das variâncias (Levene). Todas as análises estatísticas foram realizadas com a utilização do programa SAS versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, Carolina do Norte, EUA).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização das matérias-primas

A pectina apresentou uma porcentagem de ácidos galacturônicos (AG) de  $85,9 \pm 1,9$ , adequado segundo a FAO (1994), que estabelece uma porcentagem mínima de 65% de AG para pectinas comerciais. Em relação ao grau de esterificação, a LMAP apresentou o valor de  $34,1 \pm 1,3\%$ , sendo classificada como pectina de baixo teor de esterificação, uma vez que apresenta menos de 50% dos grupos carboxílicos esterificados (TURQUOIS *et al.*, 1999). O teor de amidação foi de  $5,5 \pm 0,4\%$ , indicando que apenas 5% dos grupos carboxilas estavam amidados.

Para a elaboração da dieta, foi utilizado um concentrado proteico de peixe (CPSP 90) em baixa quantidade (0,1%), a fim de aumentar a incorporação de peptídeos e a atratividade das dietas. Esse concentrado foi utilizado juntamente com o WPC como constituinte da solução de proteína utilizada para o recobrimento das microcápsulas. A composição centesimal dos constituintes, incluindo o CPSP 90 utilizados na elaboração das micropartículas pode ser observada na Tabela 1.

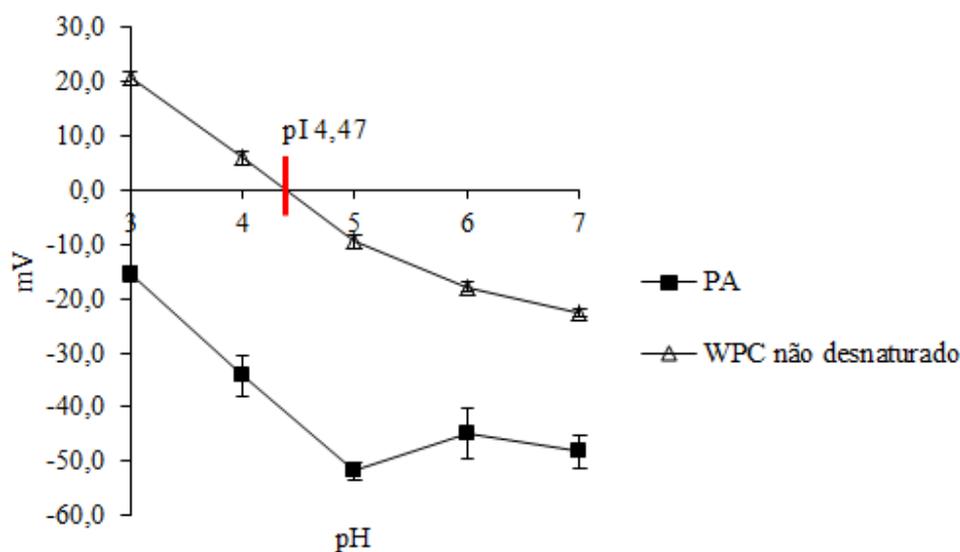
**Tabela 1** – Composição centesimal (%) em base seca dos produtos utilizados, exceto para % de umidade

Componentes	Composição Centesimal			
	(%)			
	Umidade	Proteínas	Lipídeos	Cinzas
WPC	$6,86 \pm 0,12$	$81,02 \pm 1,00$	$16,21 \pm 0,50$	$2,77 \pm 0,06$
CPSP 90	$4,37 \pm 0,13$	$82,48 \pm 0,15$	$10,60 \pm 0,40$	$5,13 \pm 0,11$
LMAP	$9,20 \pm 0,08$	$1,05 \pm 0,04^*$	0,0	$3,30 \pm 0,56$

WPC= concentrado proteico de soro; CPSP 90= concentrado proteico de peixe comercial; LMAP= pectina de baixo teor de esterificação amidada, \* nitrogênio não proteico.

A determinação da quantidade de cargas em solução para o polissacarídeo e para as proteínas do soro do leite feita através da medida do potencial zeta das soluções, permite

identificar a possibilidade de ocorrência da interação eletrostática proteína-polissacarídeo e, em especial, identificar faixas de pH onde essas interações podem ser favorecidas. Para a pectina de baixo teor de esterificação, o pKa apresentado na literatura é de 2,9 (RALET *et al.*, 2001) e, acima deste pH, a solução do polissacarídeo vai estar carregada negativamente, conforme pode ser observado na Figura 1. Com relação às proteínas do soro do leite, o ponto isoelétrico (pI) reportado na literatura varia de 4,5 a 5,2 (WALKENSTRÖM; HERMANSSON, 1997; LY *et al.*, 2008) e, em pHs inferiores ao PI, a solução proteica vai estar carregada positivamente. O pI encontrado para as proteínas do soro de leite utilizadas experimentalmente foi de 4,47 (Figura 1), indicando que, em pHs inferiores a 4,5 e superiores a 2,9, é possível a interação eletrostática entre a proteína e o polissacarídeo. O pH escolhido para produção das partículas foi ajustado para 4,0, conforme utilizado anteriormente na literatura, quando pectina proveniente de beterraba e  $\beta$ -lactoglobulina foram utilizadas para produção de nanopartículas por interação eletrostática (SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008).



**Figura 1** – Influência do pH na carga elétrica (Potencial  $\zeta$ ) das soluções (0,5% p/p) de pectina e WPC não-desnaturado

Embora tenham sido identificadas faixas de pH potenciais para ocorrência de neutralização de cargas da interação eletrostática entre as soluções de proteína e

polissacarídeo, no caso das partículas, a medida do potencial zeta eletroforético ficou impossibilitada devido ao tamanho das partículas e sua rápida precipitação. Dessa forma, ajustes das situações ótimas, para o recobrimento proteico da partícula de gelificação iônica, não foi possível pela medida de carga de superfície das partículas gelificadas, avaliando-se as condições ótimas indiretamente por meio da quantificação da proteína adsorvida. Durante a gelificação iônica, os grupos carboxílicos da pectina, carregados negativamente nas condições de pH utilizadas, vão se associar aos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , levando a uma diminuição da carga líquida negativa do polissacarídeo. Para que a adsorção da proteína carregada positivamente ocorra eletrostaticamente na superfície da partícula de gelificação iônica é necessário que uma parte dos grupos carboxílicos não tenha se ligado ao  $\text{Ca}^{2+}$  e, portanto, estejam disponíveis para associação com os grupos positivos da proteína. Adicionalmente, a pectina utilizada foi uma pectina de baixo teor de esterificação amidada que, nas condições utilizadas, apresenta grupos  $\text{NH}_3^+$  que podem também fazer associações com grupos laterais de aminoácidos carregados negativamente na cadeia proteica.

### **3.2 Caracterização das partículas e adsorção proteica**

As micropartículas produzidas pelos métodos combinados de gelificação iônica e interação eletrostática apresentaram elevados teores de proteína. As que foram submetidas à solução de 4% de WPC apresentaram o menor teor de proteína, diferindo estatisticamente das demais (Tabela 2). Nas concentrações de 6, 8 e 12%, todas as micropartículas apresentaram teor de proteína superior a 50%, não diferindo estatisticamente entre si. Porém, em relação ao teor de umidade (87,2 a 92,4%), as micropartículas submetidas à solução de 12% de WPC apresentaram o menor valor (Tabela 2). Todas as formulações apresentaram teores de umidade similares ao da *Artemia* (BASKERVILLE-BRIDGES; KLING, 2000).

A escolha da concentração de WPC utilizada para produção das partículas baseou-se, especialmente, no tamanho das partículas obtidas quando diferentes concentrações de WPC nas soluções proteicas foram avaliadas. O tamanho médio das partículas variou de 171 a 286  $\mu\text{m}$  (Tabela 2), aumentando conforme a concentração de proteína também aumentava. Diferença estatística significativa do tamanho das partículas somente foi

encontrada no tratamento com 12% de concentração proteica, enquanto não se observou diferença significativa entre os tamanhos médios quando 4, 6 e 8% de WPC foi utilizado. A concentração de 12% de WPC foi escolhida para produção das dietas porque proporcionou as maiores partículas, considerando que náuplios de *Artemia* apresentam tamanho médio entre 350 a 530  $\mu\text{m}$  (EMMERSON, 1984; YÚFERA; RODRIGUEZ; LUBIÁN, 1984).

Partículas obtidas com solução de WPC a 12% apresentaram, ainda, conteúdo de umidade e teor proteico (Tabela 2) similares aos observados na *Artemia* (BASKERVILLE-BRIDGES; KLING, 2000).

**Tabela 2** – Teores de proteína, umidade e tamanho médio das partículas úmidas produzidas a pH 4,0 com diferentes concentrações de WPC não-desnaturado

WPC em solução (%)	Proteína	Umidade	Tamanho médio ( $\mu\text{m}$ )
4	47,96 $\pm$ 1,65 B	92,42 $\pm$ 0,14 A	170,99 $\pm$ 32,31 B
6	54,76 $\pm$ 1,60 A	89,76 $\pm$ 0,66 B	188,53 $\pm$ 23,29 B
8	53,86 $\pm$ 2,25 A	89,42 $\pm$ 0,31 B	193,52 $\pm$ 33,81 B
12	52,76 $\pm$ 1,87 A	87,16 $\pm$ 0,45 C	286,30 $\pm$ 42,78 A

Médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

### 3.3 Caracterização das dietas

A composição centesimal das dietas experimentais, da dieta comercial e dos náuplios de *Artemia* está apresentada na Tabela 3.

**Tabela 3** – Composição centesimal (%) em base seca das dietas experimentais, comercial e *Artemia*, exceto umidade

Dietas	Composição Centesimal (%)			
	Umidade	Proteína	Lípido	Cinzas
OS	85,48 ± 0,37	51,11 ± 0,47	23,32 ± 0,20	1,28 ± 0,14
OSPro	84,45 ± 0,23	50,49 ± 0,31	23,22 ± 1,79	1,30 ± 0,05
DMC	9,61 ± 0,27	63,09 ± 3,55	17,00 ± 0,01	13,36 ± 0,17
AN	78,00 ± 0,20	54,74 ± 0,71	20,90 ± 0,54	5,54 ± 0,47

OS= dieta elaborada contendo óleo de salmão; OSPro= dieta elaborada contendo óleo de salmão e probiótico; DMC= dieta microencapsulada comercial; AN= náuplios de *Artemia*.

Em comparação com os náuplios de *Artemia* (AN), as duas dietas experimentais apresentaram uma composição proteica levemente inferior, teores de umidade e lipídeos superiores e teor de cinzas bastante inferior. Os teores de proteína e lipídios foram próximos aos da dieta microencapsulada desenvolvida por Chu e Ozkizilcik (1999), que continha 53% de proteína e 21% de lipídios, respectivamente. Os teores de umidade das dietas encontraram-se próximos aos teores de umidade observados para a *Artemia*, diferindo de dietas comerciais e experimentais, nas quais o conteúdo de umidade é bastante baixo, em torno de 10% (YÚFERA; PASCUAL; FERNÁNDEZ-DÍAZ, 1999; BASKERVILLE-BRIDGES; KLING, 2000; KVALE *et al.*, 2006). Este teor de umidade elevado pode contribuir para melhor digestão da dieta, uma vez que a grande quantidade de matéria seca é um dos fatores apontados para a dificuldade das larvas em digerir completamente as dietas formuladas (KOLKOVSKI, 2001).

Considerando que o pH da água encontrado na natureza ou nas condições experimentais de crescimento é próximo ao neutro ou levemente básico, dietas úmidas ou secas foram suspensas e/ou reidratadas em água a pH 7,0 e seu tamanho médio avaliado (Tabela 4) em dois diferentes tempos, imediatamente após serem colocadas em água e após uma hora, que é o tempo médio entre uma alimentação e outra, sendo considerado adequado para a identificação e ingestão da dieta (CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 2001). Os tamanhos médios das partículas úmidas e/ou reidratadas de ambas as dietas experimentais (Tabela 4) foram muito próximos, independente do tempo de reidratação, e

variaram de 225 a 263µm. A distribuição de tamanho, observada para as partículas úmidas, foi de 75 a 570µm para OS e 88 a 618µm para OSPro, enquanto partículas úmidas, uma hora após a reidratação, apresentaram variação de 87 a 615µm, para OS, e 82 e 563µm, para OSPro. Os tamanhos obtidos são compatíveis ao alimento vivo, rotíferos (80 a 280µm) e dos náuplios de *Artemia* (350 a 530µm) (EMMERSON, 1984; YÚFERA; RODRIGUEZ; LUBIÁN, 1984) comumente utilizados quando o cultivo de peixes é feito de maneira intensiva. Dietas testadas em ensaios biológicos com larvas de peixe apresentaram tamanho variado de 50-300µm (VILLAMAR; LANGDON, 1993; EMMERSON, 1984; YÚFERA; RODRIGUEZ; LUBIÁN, 1984) e 250 a 425µm (GUTHRIE *et al.*, 2000). Murray *et al.* (2010) estudaram dieta microencapsulada para larvas de *Atlantic halibut* com tamanho variando de 50-200µm, porém houve um baixo consumo das dietas, que foi atribuído ao pequeno tamanho das dietas uma vez que deveriam abranger uma faixa tamanho de até 600µm.

**Tabela 4** – Diâmetros médios (µm) das dietas úmidas e reidratadas

Dietas	Tempo de hidratação	Diâmetro das partículas (D50, µm)
OS	Úmidas	t <sub>0</sub> 225,81±41,99 A
	Reidratadas	t <sub>0</sub> 247,44±8,42 A
		t <sub>1</sub> 256,09±6,75 A
OSPro	Úmidas	t <sub>0</sub> 263,16±10,07 A
	Reidratadas	t <sub>0</sub> 263,17±10,44 A
		t <sub>1</sub> 247,61±11,51 A

OS – dieta com óleo de salmão; OSPro- dieta com óleo de salmão e *L. acidophilus*. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (p>0,05).

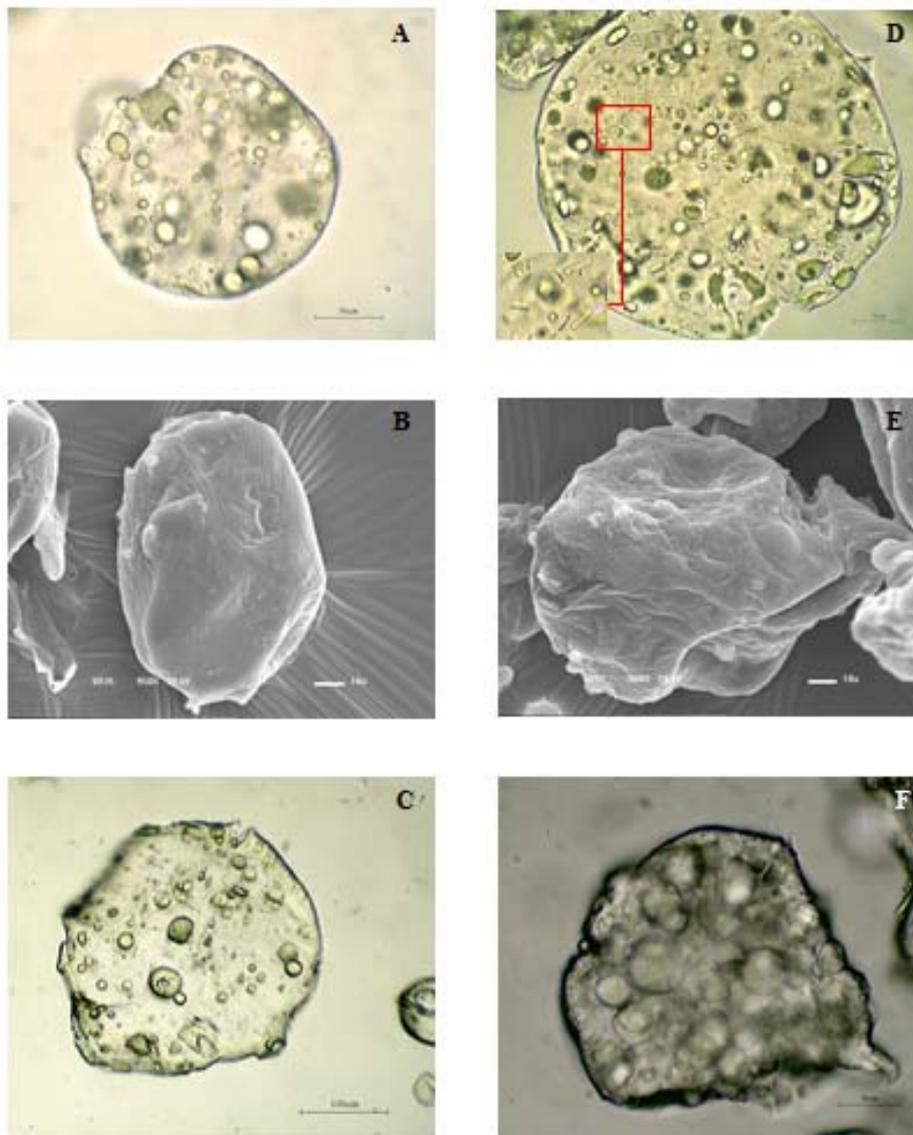
O fato de não ter havido diferença entre os tamanhos das partículas imediatamente reidratadas e as que permaneceram na água por uma hora, significa que ao administrar a dieta liofilizada nos tanques para as larvas ela irá reidratar-se por completo rapidamente, atingindo o tamanho ideal para ser consumida pela larva. Esta rápida taxa de reidratação também pôde foi observada em microcápsulas secas de alginato e alginato-quitosana; porém foram necessários 30 minutos de imersão para uma maior reidratação (POLK *et al.*, 1994). O teor de proteínas das partículas após uma hora de reidratação em pH 7,0 foi de

51,0±0,5% para a dieta OS e de 51,9±0,7% para a dieta OSPro, indicando que não houve perda de proteínas devido à mudança do pH.

A morfologia das dietas microencapsuladas, observada por microscopia ótica (Figura 2), mostra a formação de matrizes multinucleadas, com a parede definida e contínua ao redor da micropartícula. O conteúdo lipídico ficou distribuído uniformemente na matriz de pectina, observando-se distribuição de gotas lipídicas de diferentes tamanhos por toda a extensão da micropartícula. As micropartículas apresentaram, em sua maioria, forma esférica ou aproximadamente esférica.

As imagens obtidas por microscopia óptica indicam que as cápsulas úmidas e as hidratadas após a secagem apresentaram tamanhos e formas semelhantes (Figura 2 e Tabela 4). Isto também foi observado nas cápsulas de gelificação iônica liofilizadas obtidas por (MUKAI-CORRÊA *et al.*, 2005), que apresentaram uma considerável reidratação após o contato com água.

A observação por meio de microscopia eletrônica de varredura das partículas secas (Figura 2) mostra que as dietas OS e OSPro apresentaram formas semelhantes e mantiveram-se parcialmente íntegras após o processo de secagem, apresentando um contorno esférico, com partículas globulares de gorduras presentes no material de parede. Observou-se também aglomeração entre as partículas após a secagem por liofilização (resultados não apresentados). Apesar da aglomeração observada, as partículas, após a reidratação, voltaram a assumir uma forma aproximadamente esférica e aparentemente com paredes contínuas e sem rachaduras (Figura 2).



**Figura 2** – Microscopias das dietas utilizadas no ensaio biológico. A – micropartícula OS úmida; B – MEV da micropartícula OS; C – micropartícula OS reidratada; D – micropartícula OSPro úmida, com detalhe para os micro-organismos probióticos; E – MEV da micropartícula OSPro; F – micropartícula OSPro reidratada. Figuras A, C, D e F bars = 100µm; Figuras B e E bars= 10µm.

### 3.4 Quantificação dos *Lactobacillus acidophilus*

A população inicial do micro-organismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* La-5 adicionado na dieta OSPro foi de  $3,17 \times 10^5$  UFC/g de cápsula liofilizada. Após 28 dias de armazenamento congelado, observou-se uma redução da viabilidade de 0,27 ciclos logarítmicos, apresentando uma população ao final do tempo de armazenamento congelado de  $1,7 \times 10^5$  UFC/g de cápsula liofilizada. Os resultados mostram que, durante todo o período em que a dieta foi ministrada às larvas de peixe, não houve uma redução drástica da população de micro-organismos probióticos inicialmente encapsulados.

### 3.5 Ensaio biológico

#### 3.5.1 Crescimento e taxa de ingestão

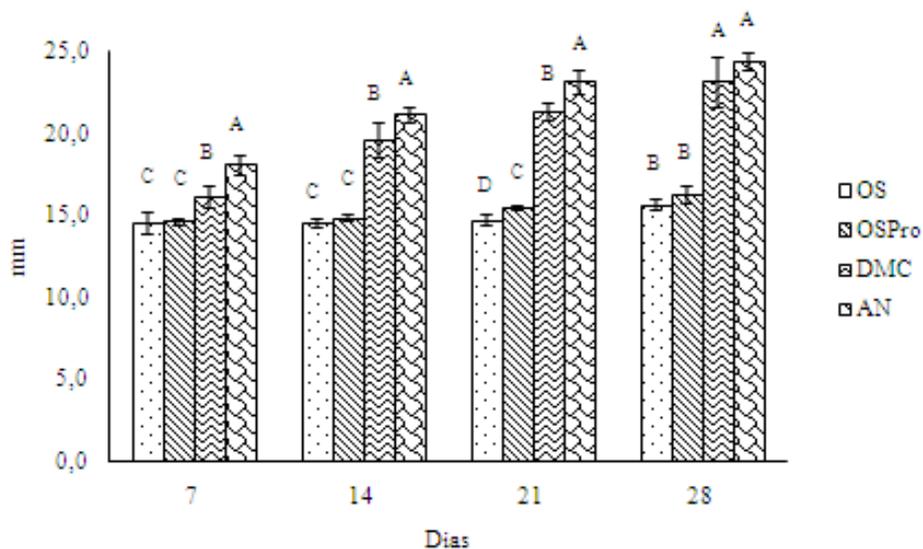
Ao avaliar o comprimento das larvas durante o experimento (Figura 3), observou-se que o tratamento com náuplios de *Artemia* (AN) foi o que apresentou o maior comprimento durante todo o período experimental, seguido sempre do tratamento com dieta comercial (DMC), diferindo estatisticamente dos demais, com exceção da última semana, quando os grupos AN e DMC não diferiram estatisticamente entre si. Já as dietas experimentais OS e OSPro foram as que apresentaram o menor comprimento, tendo diferindo entre si apenas na terceira semana, sendo que a dieta OSPro proporcionou larvas maiores. Este comportamento também se repetiu em relação ao peso (Figura 4), porém a mesma diferença entre as dietas OS e OSPro foi observada na segunda semana.

Desde a primeira semana de tratamento já foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao peso e ao comprimento entre as larvas que receberam as dietas experimentais (OS e OSPro) e AN e DMC, demonstrando maior peso e comprimento nas alimentadas com náuplios de *Artemia*, seguidas pelas larvas do tratamento DMC.

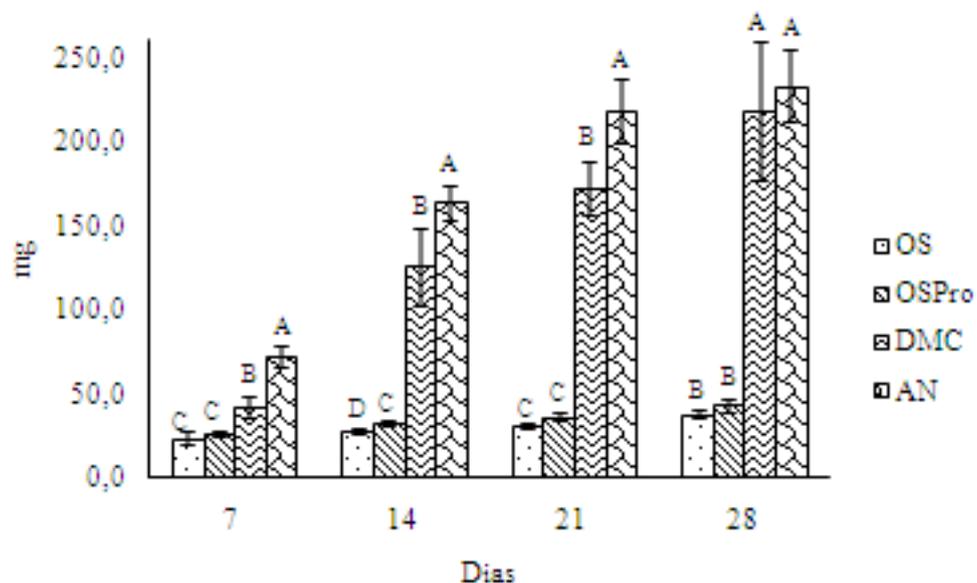
Melhor desempenho de crescimento em larvas alimentadas com alimento vivo em relação às dietas inertes é descrito em diversos trabalhos (CHU; OZKIZILCIK, 1999;

BASKERVILLE-BRIDGES; KLING, 2000; TESSER; CARNEIRO; PORTELLA, 2005; FERNANDEZ-DIAZ *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2008; ENGROLA *et al.*, 2009; MURRAY *et al.*, 2010). No entanto, há exceções, como o trabalho desenvolvido por Yúfera, Pascual e Fernández-Díaz (1999), que, ao fornecerem microcápsulas obtidas por polimerização interfacial por 15 dias para larvas de *Spaurus aurata*, verificaram resultados de desempenho semelhantes às larvas alimentadas com rotíferos.

Na terceira semana de experimento, observou-se diferença significativa em relação ao comprimento das larvas alimentadas com OS e OSPro, sendo as larvas do tratamento OSPro maiores (Figura 3). Isto se repetiu no parâmetro peso na segunda semana de tratamento, mostrando, assim, uma provável influência positiva dos probióticos sobre o crescimento das larvas de pacu (Figura 4), porém este efeito positivo não se manteve até o final do experimento.



**Figura 3** – Desempenho de crescimento em comprimento total (mm) das larvas de pacu durante o período experimental. OS= dieta com óleo de salmão; OSPro= dieta com óleo de salmão e probiótico; DMC= dieta microencapsulada comercial; AN= náuplios de *Artemia*. Médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).



**Figura 4** – Desempenho de crescimento em peso (mg) das larvas de pacu durante o período experimental. OS= dieta com óleo de salmão; OSPro= dieta com óleo de salmão e probiótico; DMC= dieta microencapsulada comercial; AN= náuplios de *Artemia*. Médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

Avella *et al.* (2010), ao avaliarem a influência de uma mistura do probiótico *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus pumilus*) em larvas de *S. aurata* por 75 dias, concluíram que essa combinação probiótica promoveu melhor resposta ao estresse e ao crescimento, sem influenciar nas taxas de sobrevivência, assim como o encontrado no presente estudo. No entanto, alguns autores não encontraram diferenças em relação ao peso e comprimento de larvas ao ofertar probiótico (HERNANDEZ *et al.*, 2010; LA BANDA *et al.*, 2010; MERRIEFIELD *et al.*, 2010).

Acredita-se que a oferta das dietas inertes em intervalos mais frequentes (e.g. a cada 30 minutos) possa proporcionar às larvas maior oportunidade de ingestão/alimentação, uma vez que o alimento vivo está praticamente todo tempo disponível para as larvas, movimentando-se e permanecendo na coluna de água nos intervalos entre as alimentações sem se depositarem no fundo dos tanques. Esse fato pode ser uma explicação para as diferenças nos desempenhos entre as dietas inertes e os alimentos vivos (BASKERVILLE-

BRIDGES; KLING, 2000). Quando a dieta se deposita no fundo rapidamente, a sua ingestão pelo peixe é dificultada, piorando o crescimento da larva (MURRAY *et al.*, 2010).

Webster e Lovell (1990) identificaram maior consumo de *Artemia* quando os náuplios estavam vivos, comparado com a *Artemia* congelada rapidamente ou liofilizada. Uma das hipóteses para explicar o maior consumo é a permanência dos animais vivos em suspensão na coluna d'água com mobilidade. Além disso, larvas expostas a estímulos visuais gerados por náuplios de *Artemia* tiveram efeito positivo em relação à taxa de ingestão para larvas de pacu (TESSER; PORTELLA, 2006).

A ingestão das dietas pelas larvas de pacu no início do experimento (peso médio de 20 mg) foi moderada (Tabela 5). Com o desenvolvimento dessas, a taxa de ingestão aumentou, apresentando taxas de 90, 91,7, 98,3 e 100% para larvas com peso médio de 37,7±2,1 mg (OS), 42,8±4,5 mg (OSPro), 218,1±41,3 mg (DMC) e 233,1±21,8 mg (AN), respectivamente.

Maiores taxas de ingestão de náuplios de *Artemia* do que de microdieta experimental com caseína também foi relatada com larvas de *Morone saxatilis*; porém, quando na dieta houve a adição de extrato de *Artemia*, a taxa de ingestão aumentou de 42% para 75% na primeira semana de tratamento (CHU; OZKIZILCIK, 1999). Além disso, também se observou tendência de aumento de taxa de ingestão quando as larvas estavam maiores, sendo altas e similares em todos os tratamentos (CHU; OZKIZILCIK, 1999).

De forma semelhante, com as larvas de pacu notou-se que a taxa de ingestão das dietas OS e OSPro foi similar à de AN e de DMC, mostrando que as dietas experimentais foram aceitas e consumidas pelas larvas.

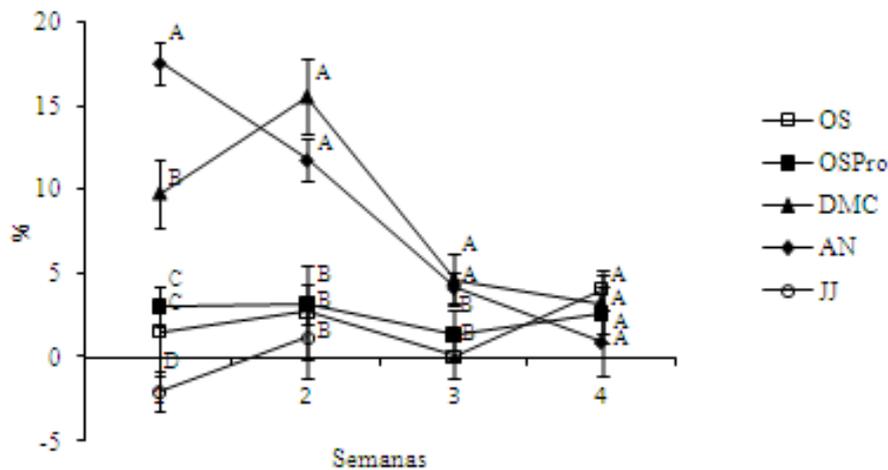
**Tabela 5** – Valores médios de taxa de ingestão (%) das dietas microencapsuladas pelas larvas de pacu no início e no final do experimento

Dietas	Taxa de ingestão (%)	
	Inicial	Final
OS	60	90,0
OSPro	70	91,7
DMC	80	98,3
AN	100	100

Taxa de ingestão das larvas de pacu na fase inicial e final do experimento. OS= dieta com óleo de salmão; OSPro= dieta com óleo de salmão e probiótico; DMC= dieta microencapsulada comercial; AN= náuplios de *Artemia*.

### 3.5.2 Taxa de crescimento específico e sobrevivência

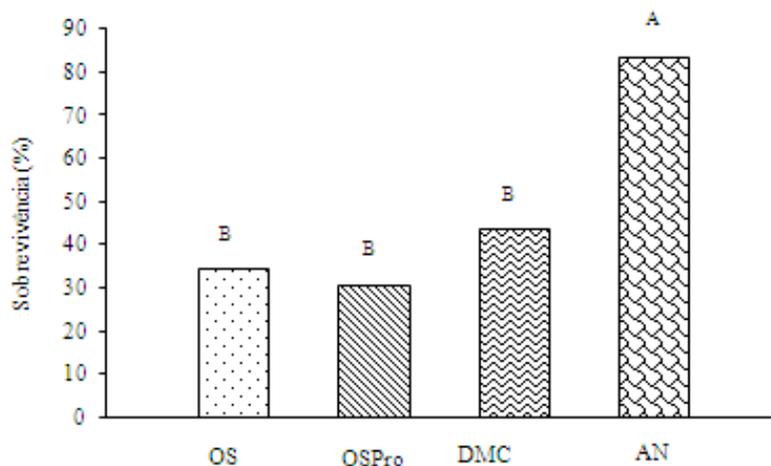
Observou-se diminuição da taxa de crescimento ao longo do experimento (Figura 5), o que é considerado normal, uma vez que, com o tempo, os peixes continuam a crescer, porém em uma velocidade inferior. Como esperado, o tratamento JJ (jejum) apresentou taxa de crescimento inferior aos demais tratamentos. Durante as três primeiras semanas, notou-se que as larvas dos tratamentos AN e DMC apresentaram um crescimento superior ao das larvas que receberam as dietas experimentais; porém, na última semana de experimento, a taxa de crescimento específico não variou estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre todos os tratamentos.



**Figura 5** – Taxa de crescimento específico (%) das larvas de pacu durante o período experimental. OS= Dieta com óleo de salmão; OSPro= dieta com óleo de salmão e probiótico; DMC= dieta microencapsulada comercial; AN= náuplios de *Artemia*. Médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Ao final do experimento observaram-se taxas de sobrevivência de  $34,5 \pm 7,6$ ,  $30,7 \pm 9,5$ ,  $43,6 \pm 13,7$  e  $83,6 \pm 1,8$  % nos tratamentos OS, OSPro, DMC e AN, respectivamente. A taxa de sobrevivência (Figura 6) das larvas que receberam apenas *Artemia* durante o período experimental foi significativamente superior aos demais, mas, entre os outros tratamentos (OS, OSPro, DMC), não houve diferença em relação às taxas de sobrevivência, que ficaram entre 30 e 40%, aproximadamente. Por outro lado, alta taxa de

canibalismo foi observada no tratamento DMC (Figura 7), sendo esta também uma das causas da baixa taxa de sobrevivência em relação ao tratamento com *Artemia* (AN), uma vez que as larvas de ambos os tratamentos apresentaram desenvolvimento semelhante.



**Figura 6** – Sobrevivência (%) das larvas de pacu durante o período experimental. OS= dieta com óleo de salmão; OSPro= dieta com óleo de salmão e probiótico; DMC= dieta microencapsulada comercial; AN= náuplios de *Artemia*. Médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

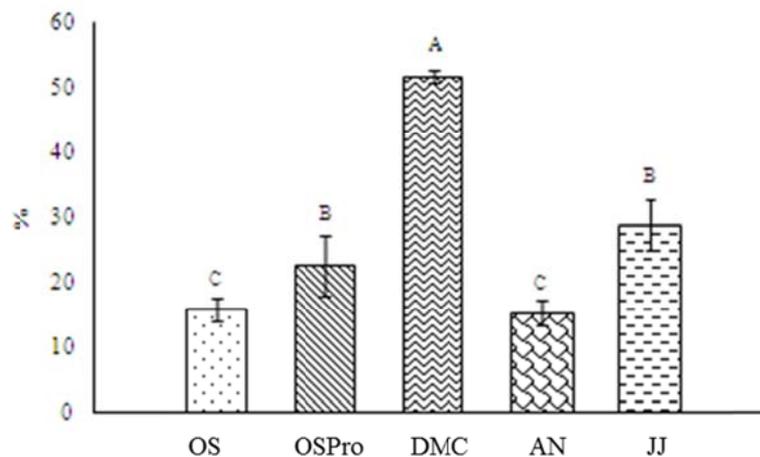
Mesmo sendo inferiores ao tratamento AN do presente estudo, os resultados de sobrevivência das larvas alimentadas com as dietas OS e OSPro (Figura 6) foram parecidos ao das larvas que receberam alimento vivo no trabalho desenvolvido por Baskerville-Bridges e Kling (2000). Os autores relatam sobrevivência de 36,5% entre larvas que receberam o alimento vivo, e 5,2 e 9,4% entre as que receberam as dietas microparticuladas em teste. É interessante notar que os resultados das larvas de pacu que receberam as microdietas experimentais foram semelhantes aos encontrados por Yúfera, Fernández-Díaz e Pascual (2005), que registraram sobrevivência de 38,6 e 46,3% para larvas de *Solea senegalensis* alimentadas com dietas microencapsuladas, mesmo estas possuindo teores de proteína de 55% e 62% respectivamente.

Altas taxas de sobrevivência de larvas alimentadas com dietas microencapsuladas já foram registradas. Yúfera, Pascual e Fernández-Díaz (1999), relatam 70% em larvas de

*Spaurus aurata* e crescimento similar ao observado com alimento vivo. Fernández-Díaz *et al.* (2006) registram sobrevivência média de 80% ao utilizar dieta semelhante com e sem adição de vitamina A para larvas de *Solea senegalensis*. Acredita-se que taxas de sobrevivência elevadas possam estar relacionadas com nutrição adequada das larvas, resultando em desenvolvimento e sobrevivência elevados (MURRAY *et al.*, 2010). Em ensaios biológicos onde houve baixo crescimento, geralmente são obtidas taxas de sobrevivência também baixas (CHU; OZKIZILCIK, 1999; BASKERVILLE-BRIDGES; KLING, 2000; TESSER; CARNEIRO; PORTELLA, 2005).

No presente ensaio biológico, as larvas de pacu apresentaram baixa taxa de crescimento específico e taxa moderada de sobrevivência (Figura 6). Apesar disso, se as larvas não tivessem metabolizado as dietas, provavelmente elas teriam morrido, juntamente com as que ficaram em jejum. Isso indica que as larvas de pacu ingeriram, digeriram e assimilaram os nutrientes em certo nível; porém ainda abaixo do necessário para ter desempenho semelhante ao alimento vivo. A eficiência dessas dietas pode não ter sido boa, uma vez que, para elaborá-las, levaram-se em consideração apenas os teores dos macronutrientes proteína, carboidratos, lipídeos e matéria seca.

As larvas do tratamento DMC apresentaram um crescimento final semelhante às larvas do tratamento AN. Esse resultado sugere que, além da boa nutrição proporcionada por essa dieta, o crescimento dessas larvas pode ter sido favorecido pela alta taxa de canibalismo (Figura 7) que apresentaram. Esta hipótese também foi levantada por Curnow *et al.* (2006), que perceberam que, ao finalizarem a oferta de *Artemia*, houve um crescimento expresso nos peixes de um dos tratamentos avaliados, podendo ter sido causado por canibalismo.



**Figura 7** – Canibalismo (%) das larvas de pacu durante o período experimental. OS= dieta com óleo de salmão; OSPro= dieta com óleo de salmão e probiótico; DMC= dieta microencapsulada comercial; AN= náuplios de *Artemia*; JJ= jejum. Médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

### 3.5.3 Teste de exposição ao ar

O teste de exposição ao ar mostrou que a dieta OSPro propiciou menor mortalidade das larvas de pacu em comparação com aquelas que receberam a dieta OS sem o probiótico (Tabela 6). As larvas alimentadas com a dieta OS, depois de expostas ao ar, mostraram uma maior mortalidade do que as não expostas. Por outro lado, não se encontrou diferença estatística ( $p>0,05$ ) em relação à mortalidade das que receberam a dieta contendo o probiótico, após o estresse provocado pela exposição ao ar.

Esse teste é eficiente para desafiar larvas que recebem diferentes aportes nutricionais. Curnow *et al.* (2006) verificaram que larvas de *Lates calcarifer* Bloch alimentadas por maior tempo com *Artemia* e rotíferos associados a uma microdieta comercial apresentaram maior sobrevivência após a exposição ao ar por nove minutos, comparadas as que recebiam apenas a dieta comercial, que apresentaram mortalidade total. O probiótico *Lactobacillus acidophilus* apresentou efeito benéfico em alevinos e juvenis de *African catfish*, apresentando melhora no crescimento, parâmetros hematológicos e sobrevivência (AL-DOHAIL; HASHIM; ALIYU-PAIKO, 2009).

**Tabela 6** – Mortalidade (%) das larvas de pacu após exposição ao ar ao 21º dia de alimentação

Tempo de exposição	Mortalidade (%)			
	AN	DMC	OSPro	OS
0 min	0±0 Aa	13,3±12,5 Aa	7,5±8,3 Aa	7,5±4,3 Ba
1 min	0±0 Ab	2,5±5,0 Ab	22,5±14,8 Aab	42,5±20,5 Aa

Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey ( $p>0,05$ ). AN= náuplios de *Artemia*; DMC= dieta microencapsulada comercial; OSPro= dieta com óleo de salmão e probiótico; OS= dieta com óleo de salmão.

#### 4 CONCLUSÕES

A utilização do processo combinado de gelificação iônica seguida de interação eletrostática possibilitou a obtenção de micropartículas com composição proteica, lipídica e teor de umidade semelhantes à composição encontrada em náuplios de *Artemia*, além de tamanho antes e após reidratação compatíveis com os organismos vivos usados na alimentação de larvas de peixes. A introdução da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* foi bem-sucedida, obtendo-se boa sobrevivência das bactérias durante o manuseio para a produção das partículas e durante a sua estocagem a frio após 28 dias. No entanto, as microdietas não suportam o crescimento das larvas de pacu, possivelmente devido à sua composição nutricional, que ainda deve ser otimizada. As partículas foram eficientes para o fornecimento de probiótico às larvas, comprovado pela maior resistência delas no desafio de estresse por exposição ao ar. O desenvolvimento dessa tecnologia abre novas avenidas para a continuidade das pesquisas e desenvolvimento de um produto que seja estável em água e que promova bom crescimento dos animais. A possível inadequação nutricional das dietas experimentais, a baixa quantidade mineral/vitamínica presente nas dietas experimentais e a possível indisponibilidade de nutrientes devido à associação forte destes com o polissacarídeo utilizado podem ter contribuído para os resultados de taxas de crescimento nulas obtidas, indicando a necessidade de ajustes nutricionais e novos experimentos.

## CONCLUSÕES GERAIS

Quando o concentrado proteico de soro de leite foi adicionado à emulsão de pectina na sua forma não-desnaturada ou desnaturada, não foi possível obter teores de proteína superiores a 35%.

A mudança da concentração de cloreto de cálcio não influenciou a retenção proteica quando esta estava presente como constituinte da emulsão de pectina.

Os teores de proteína foram satisfatórios (>50%) quando esta foi incorporada à micropartícula por interação eletrostática.

A incorporação proteica por interação eletrostática foi superior quando a proteína encontrava-se na forma não-desnaturada do que quando ela estava na forma desnaturada, independentemente do tratamento térmico utilizado.

A composição centesimal das dietas experimentais mostrou que estas estavam em níveis adequados em relação aos teores de proteína, umidade e lipídios – presentes na *Artemia*.

A partir da caracterização das dietas experimentais, pôde-se observar que as dietas possuem uma forma aproximadamente esférica, tamanho adequado e hidratação instantânea quando em contato com água.

Os testes *in vivo* mostraram que as larvas ingeriram as dietas em grande quantidade e apresentaram bons teores de sobrevivência, porém os resultados de crescimento não foram satisfatórios, necessitando de uma otimização do perfil nutricional da dieta, assim como um estudo da identificação de possíveis fatores antinutricionais presentes nas partículas utilizadas nos experimentos *in vivo* com larvas de pacu.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMORAD, E. G. **Digestibilidade e exigência de aminoácidos para juvenis de Pacu, *Piaractus mesopotamicus***. 2009. 87f. Tese (Doutorado em Aquicultura)– Centro de Aquicultura – Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2009.

AL-DOHAIL, M. A.; HASHIM, R.; ALIYU-PAIKO, M. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 1642-1652, 2009.

ALLAN-WOJTAS, P. M.; HANSEN, L. T.; CARBYN, S.; PAULSON, A. T. Microstructure of Ca-alginate microbeads with or without encapsulated *Bifidobacterium lactis* using cold-stage scanning electron microscopy. **Scanning**, v. 21, p. 118-119, 1999.

ALVIM, I. D. Produção e caracterização de micropartículas obtidas por *spray drying* e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes. 2005. 277f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição)–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

ALVIM, I. D. Microencapsulação: afinal o que é? **Cereal Chocotec News**, p. 4, out./dez. 2010.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 240-251, 2007.

ANAL, A. K.; STEVENS, W. F. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **International journal of pharmaceutics**, v. 290, p. 45-54, 2005.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, Maryland, USA, 2006.

ARAGÃO, C.; CONCEIÇÃO, L. E. C.; DINIS, M. T.; FYHN, H.J. Amino acid pools of rotifers and Artemia under diferente conditions: nutritional implications for fish larvae. **Aquaculture**, v.234, p. 429-445, 2004.

ARSHADY, R. Microspheres for biomedical applications: preparation of reactive and labelled microspheres. **Biomaterials**, v. 14, p. 5-15, 1993.

AVELLA, M. A.; GIOACCHINI, G.; DECAMP, O.; MAKRIDIS, P.; BRACCIATELLI, C.; CARNEVALI, O. Application of multi-species of Bacillus in sea bream larviculture. **Aquaculture**, v. 305, p. 12-19, 2010.

ÁVILA, F. A. et al. Use of vaccine and probiotic in the control of swine diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, p. 77-82, 2001.

AXELSSON, L. T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. von (Ed.). **Lactic acid bacteria**. New York, USA: Marcel Dekker, 1993. p. 1-64.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

BAIRAGI, A.; GHOSH, K. S.; SEN, S. K.; RAY, A. K. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. **Aquaculture International**, v.10, p. 109-121, 2002.

BAIRAGI, A.; GHOSH, K. S. SEN, S. K.; RAY, A. K.; Evaluation of the nutritive value of *leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. **Aquaculture Research**, v. 35, p.426-446, 2004.

BALCAZÁR, J. L.; BLAS, I de; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J. L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.173-186, 2006.

BARRERA, A. M.; RAMÍREZ, J. A.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; VÁZQUEZ, M. Effect of pectins on the gelling properties of surimi from silver carp. **Food Hydrocolloids**, v.16, p. 441-447, 2002.

BASKERVILLE-BRIDGES, B.; KLING, J. L. Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. **Aquaculture Nutrition**, v. 6, p. 171-182, 2000.

BEAULIEU, L.; SAVOIE, L.; PAQUIN, P.; SUBIRADE, M. Elaboration and characterization of whey protein beads by an emulsification/cold gelation process: application for the protection of retinol. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 239-248, 2002.

BEERLI, E. L.; LOGATO, P. V. R.; FREITAS, R. T. F. Alimentação e comportamento de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 149-155, 2004.

BEMILLER J. N.; WHISTLER, R. L. Carbohydrates. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food chemistry**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 1996.

BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y.; CYRINO, J. E. P. Dietary lysine requirement of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Aquaculture**, v. 297, p. 151-156, 2009.

BIOVONTADE. Disponível em: <<http://www.biovontade.com/#/CPSp/3474915>>.\_Acesso em: 20 maio 2011.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1989.

BOCK, C. L.; PADOVANI, C. R. Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em viveiros. **Acta Scientiarum**, v. 22, p. 495-501, 2000.

BOWERS, J. **Food theory and applications**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: MacMillan, 1992. 411p.

BOYD, C. E.; MASSAUT, L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. **Aquaculture Engineering**, v. 20, p. 113-132, 1999.

BRAUDO, E. E. Polyuronide interactions with polycoordinate metal ions. **Food Hydrocolloids**, v. 5, n. 1/2, p. 75-85, 1991.

BUREY, P.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T.; GIDLEY, M. J. Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 361-377, 2008.

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**, v. 109, p. 213-222, 1994.

CAHU, C. L.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L.; QUAZUGUEL, P.; LE GALL, M. M. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. **Aquaculture**, v. 171, p. 109-119, 1999.

CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. **Aquaculture**, v. 200, p. 161-180, 2001.

CALDER, P. C. Long-chain n-3 fatty acids and cardiovascular disease: further evidence and insights. **Nutrition Research**, v.24, p. 761-772, 2004.

CÂNDIDO, L. M. B. **Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais**. 1998. 110f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)–Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

CAPEL, F.; NICOLAI, T.; DURAND, D.; BOULENGUER, P.; LANGENDORFF, V. Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 901-907, 2006.

CARDOSO, F. S. N. **Produção de microencapsulados de amido com recobrimento em leite fluidizado**. 2000. 65f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Alimentar e Nutrição)–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

CARNEVALI, O.; VIVO, L. de; SULPIZIO, R.; GIOACCHINI, G.; OLIVOTTO, I.; SILVI, S.; CRESCI, A. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles

(*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. **Aquaculture**, v. 258, p. 430-438, 2006.

CASTRO, J. C. Uso de aditivos e probióticos em rações animais. In: FERREIRA, C. M.; RANZANIPAIVA, M. J. T.; TEIXEIRA, P. C.; FRANÇA, F. M.; DIAS, D. C. I. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RANICULTURA, 1.; CICLO DE PALESTRA SOBRE RANICULTURA DO INSTITUTO DE PESCA, 2., 2003. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, p. 12-18, nov. 2003.

CEMIG/CETEC. Companhia Energética de Minas Gerais. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG, 2000. 144 p.

CHANASATTRU, W.; JONES, O. G.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Impact of cosolvents on formation and properties of biopolymer nanoparticles formed by heat treatment of  $\beta$ -lactoglobulin-Pectin complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2450-2457, 2009.

CHANDRAMOULI, V.; KAILASAPATHY, K.; PEIRIS, P.; JONES, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 27-35, 2004.

CHEN, J.; ZHU, X.; HAN, D.; YANG, Y.; LEI, W.; XIE, S. Effect of dietary n-3 HUFA on growth performance and tissue fatty acid composition of gibel carp *Carassius auratus gibelio*. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, p. e476-e485, 2011.

CHU, F. E.; OZKIZILCIK, S. Acceptability of complex microencapsulated diets by striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 237, p. 1-9, 1999.

CONCEIÇÃO, L. E. C.; DERSJANT-LI, Y.; VERRETH, J. A. J. Cost of growth in larval and juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*) in relation to growth rate, food intake and oxygen consumption. **Aquaculture**, v. 161, p. 95-106, 1998.

CONCEIÇÃO, L.; MORAIS, S.; ARAGÃO, C. Fluxos de nutrientes em larvas de peixes: aplicação de técnicas com marcadores isotópicos e de modelação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 11-20, 2007.

CURNOW, J.; KING, J.; BOSMANS, J.; KOLKOVSKI, S. The effect of reduced Artemia and rotifer use facilitated by a new microdiet in the rearinf of barramundi *Lates calcarifer* (BLOCH) larvae. **Aquaculture**, v. 257, p. 204-213, 2006.

DAI, C.; WANG, B.; ZHAO, H. Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system. **Colloids and Surfaces: Biointerfaces**, v. 41, p.117-120, 2005.

DAY, O. J.; HOWELL, B. R.; JONES, D. A. The effect of hydrolysed fish protein concentrate on the survival and growth of juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.), during and after weaning. **Aquaculture Research**, v. 28, p. 911-921, 1997.

DE KRUIF, G. C.; WEINBRECK F., VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, p. 340-349, 2004.

DE VRIES, R. J.; WEINBRECK, F.; DE KRUIF, C. G. Theory of polyelectrolyte adsorption on heterogeneously charged surfaces applied to soluble protein –polyelectrolyte complexes. **Journal of Physical Chemistry**, v.118, p. 4649-4659, 2003.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Tecnology**, v. 23, p. 1361-1394, 2005.

DUBEY, R.; SHAMI, T. C.; BASHKER RAO, K. U. Microencapsulation technology and applications. **Defence Science Journal**, v. 59, n. 1, p. 82-95, 2009.

DUBIN, P. L.; GAO, J.; MATTISON, K. Protein purification by selective phase separation with polyelectrolytes. **Separation and Purification Methods**, v. 23, p.1-16, 1994.

DZIEZAK, J. D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, v. 4, p. 136-157, 1988.

EMMERSON, W. D. Predation and energetics of *Penaeus indicus* (Decapoda: Penaeidae) larvae feeding on *Brachionus plicatilis* and *Artemia nauplii*. **Aquaculture**, v. 38, p. 201-209, 1984.

ENGROLA, S.; FIGUEIRA, L.; CONCEIÇÃO, L. E. C.; GAVAIA, P. J.; RIBEIRO, L.; DINIS, M. T. Co-feeding in senegalense sole larvae with inert diet from mouth opening promotes growth at weaning. **Aquaculture**, v. 288, p. 264-272, 2009.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Compendium of food additive specifications, seventy-first meeting. FAO JECFA Monographs 7, 2009 (ISBN 978-92-5-106335-4).

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Health (emulsifiers, stabilisers, thickeners and gelling agents in food) regulations 1994**. Roma, 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org.br>>, acesso em 06 de setembro de 2011.

FAO. Food and Agricultural Organization. **The state of world fisheries and aquaculture: 2004**. Rome: FAO, 2004. 168p.

FAO/WHO. **Report on joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. 1-4 Oct. 2001, Cordoba, Argentina. Disponível em: <[ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio\\_report\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf)>. Acesso em: 20 jul. 2011.

FERNÁNDEZ-DÍAZ, C.; KOPECKA, J.; CAÑAVATE, J. P.; SARASQUETE, C.; SOLÉ, M. Variations on development and stress defence in *Solea senegalensis* larvae fed on live and microencapsulated diets. **Aquaculture**, v. 251, p. 573-584, 2006.

FERNÁNDEZ-DÍAZ, C.; PASCUAL, E.; YÚFERA, M. Feeding behaviour and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae fed on inert and live food. **Marine Biology**, v. 118, p. 323-328, 1994.

FERNÁNDEZ-DÍAZ, C.; YÚFERA, M. Capacity of gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae to break down dietary microcapsules. **Aquaculture**, v.134, p.269-278, 1995.

FERREIRA, A. V.; VIDAL, M. V.; ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S.; MENDONÇA, P. P.; MATTOS, D. C. Consumo de vitelo durante o desenvolvimento embrionário de melanotênia-maçã, *Glossolepis incisus*, Weber 1907 (*Melanotaeniidae*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 721-729, 2009.

FRAEYE, I.; DUVETTER, T.; DOUNGLA, E.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. Fine-tuning the properties of pectin/calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, p. 219- 228, 2010.

FULLER, R. The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. **British Poultry Science**, v. 18, p. 85-94, 1977.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

FURAYA, W. M. **Espécies nativas**: fundamentos da moderna aquicultura. Canoas, RS: Ed. da ULBRA, 2001. p. 83-90.

GALINDO, A. B.; HARTEMINK, R.; SCHARAMA, J. W.; VERRETH, J.; BUCIO, G. L.; ZWIERTERING, M. H. Kinetics of *Lactobacillus plantarum* 44<sup>a</sup> in the faeces of tilapia (*Oreochromis niloticus*) after its intakes in feed. **Journal of Applied microbiology**, v.107, p.1967-1975, 2009.

GARCÍA-ORTEGA, A.; HUISMAN, E. A.; SORGELOOS, P.; VERRETH, J. Evaluation of protein quality in microbound starter diets made with decapsulated cysts of *Artemia* and fishmeal for fish larvae. **Journal World Aquaculture Society**, v.32, p. 317-329, 2001.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 480-487, 2010.

GISMONDO, M. R.; DRAGO, L.; LOMBARDI, A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.12, p. 287-292, 1999.

GLENCROSS, B. D. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. **Reviews in Aquaculture**, v. 1, p. 71-124, 2009.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science e Technology**, v.10, p.139-157, 1999.

GOMEZ-GIL B. R.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, v.191, p. 259-270, 2000.

GUTHRIE, K. M; RUST, M. B.; LANGDON, C. J.; BARROWS, F. T. Acceptability of various microparticulate diets to first-feeding walleye *Stizostedion vitreum* larvae. **Aquaculture Nutrition**, v. 6, p.153-158, 2000.

HAMRE, K.; NAESS, T.; ESPE, M.; HOLM; J. C.; LIE, O. A formulated diet for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae. **Aquaculture Nutrition**, v. 7, n. 2, p. 123-132, 2001.

HARNSILAWAT, T.; PONGSAWATMANIT, R.; MCCLEMENTS, D. Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: a calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. **Food Hydrocolloids**, v.20, p.577-585, 2006.

HEELAN, B. A.; CORRIGAN, O. I. Preparation and evaluation of microspheres prepared from whey protein isolate. **Journal of microencapsulation**, v.15, n.1, p. 93-105, 1998.

HERNANDEZ, L. H. H.; BARRERA, T. C.; MEJIA, J. C.; MEJIA, G. C.; DEL CARMEN, M.; DOSTA, M.; ANDRADE, R. de L.; SOTRES, J. A. M. Effects of the commercial probiotic *Lactobacillus casei* on the growth, protein content of skin mucus and stress resistance of juveniles of the Porthole livebearer *Poeciliopsis gracilis* (Poeciliidae). **Aquaculture Nutrition**, v.16, p. 407-411, 2010.

HILTON, Z.; POORTENAAR, C. W.; SEWELL, M. A. Lipid and protein utilisation during early development of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). **Marine Biology**, v. 54, p. 855-865, 2008.

HIRAMATSU, N.; HIRAMATSU, K.; HIRANO, K.; HARA, A. Vitellogenin-derived yolk proteins in a hybrid sturgeon, bester (*Huso huso x Acipencerruthenus*): identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis. **Comparative Biochemistry and Physiology: Part A – Molecular & integrative physiology**, New York, v. 131, p. 429-441, 2002.

HOFFMANN, M. A. M.; VAN MIL, P. Heat-induced aggregation of beta-lactoglobulin: role of the free thiol group and disulfide bonds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n. 8, p. 2942-2948, 1997.

HUGUET, M. L.; DELLACHERIE, E. Calcium alginate beads coated with chitosan: effect of the structure of encapsulated materials on their release. **Process Biochemistry**, v. 31, n.8, p. 745-751, 1996.

IMESON, A. P.; LEDWARD, D. A.; MITCHELL, J. R. On the nature of the interaction between some anionic polysaccharides and proteins. **Journal Science of Food Agricultural**, v.28, p.661-667, 1997.

INOOKA, S.; UEHARA, S.; KIMURA, M. The effect of *Bacillus natto* on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens. **Poultry Science**, v. 65, p. 1217-1219, 1986.

IZQUIERDO, M. S. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. **Aquaculture Nutrition**, v.2, p. 183-191, 1996.

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

JIZOMOTO, H.; KANAOKA, E.; SUGITA, K.; HIRANO, K. Gelatin-acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic drugs and ready disintegration in the gastrointestinal tract. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 8, p.1115-1122, 1993.

JOMORI, R. K. **Estudos sobre alimentação de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) com náuplios de *Artemia* e sua substituição por dieta artificial**. 1999, 80f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)–Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B.; PORTELLA, M. C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221, p. 227-287, 2003.

JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MARTINS, M. I. E. G.; PORTELLA, M. C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, v. 243, p. 175-183, 2005.

JONES O. G.; MCCLEMENTS D. J. Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heattreating electrostatic protein-polysaccharide complexes. **Advances in Colloid and Interface Science**, Article in Press, doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071, 2010a.

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D.J. Functional biopolymer particles: design, fabrication, and applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9, p. 374-397, 2010b.

JUN-XIA, X.; HAI-YAN, Y.; JIAN, Y. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. **Food Chemistry**, v.125, p.1267-1272, 2011.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunology and Cell Biology**, v.78, n.1, p. 80-88, 2000.

KAILASAPATHY, K.; MASONDOLE, L. Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 60, n. 3, p. 48-54, 2005.

- KAMLER, E. Resource allocation in yolk-feeding fish. **Review in Fish Biology and Fisheries**, v. 18, p. 143-200, 2008.
- KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212A.L. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, N. E.; HOLT, J. H. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. v. 2. p. 1209-1234.
- KOHN, R. Ion binding on polyuronates: alginate and pectin. **Pure and Applied Chemistry**, v. 42, n.3, p. 371-397, 1975.
- KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles: implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, v. 200, p.181-201, 2001.
- KOLKOVSKI, S.; ARIELI, A.; TANDLER, A. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae. **Aquaculture International**, v. 5, p. 527-536, 1996.
- KOLKOVSKI, S.; KOVEN, W.; TANDLER, A. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture**, v. 155, p. 193-205, 1997.
- KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiet for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture Nutrition**, v.6, p.11-15, 2000.
- KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited review: betalactoglobulin: binding properties, structure and function. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.785-796, 2004.
- KOZASA, M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. **Microbiology Aliments Nutrition**, n.4, p.121-135, 1986.
- KVALE, A.; YÚFERA, M.; NYGARD, E.; AURSLAND, K.; HARBOE, T.; HAMRE, K. Leaching properties of three different microparticulate diets and preference of the diets in cod (*Gadus morhua* L.) larvae. **Aquaculture**, v. 251, p. 402-415, 2006.
- LA BANDA, I. G. de; LOBO, C.; LEÓN-RUBIO, J. M.; TAPIA-PANIAGUA, S.; BALEBONA, M. C.; MORIÑIGO, M. A.; MORENO-VENTAS, X.; LUCAS, L. M.; LINARES, F.; ARCE, F.; ARIJO, S. Influence of two closely related probiotics on juvenile *Senegalese sole* (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *pscida*. **Aquaculture**, v.306, p. 281-288, 2010.
- LANGDON, C. J. Microparticulate feeds, encapsulated particles. In: STICKNEY, R. R. (Ed.). **Encyclopedia of aquaculture**. New York: Wiley, 2000a. p. 529-530.
- LANGDON, C. J. Microparticulate feeds, complex particles. In: STICKNEY, R. R. (Ed.). **Encyclopedia of aquaculture**. New York: Wiley, 2000b. p. 528-529.

LANGDON, C. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. **Aquaculture**, v. 227, p. 259-275, 2003.

LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. 211 p.

LIAO, C.; YOUSEF, A. E.; CHISM, G. W.; RICHTER, E. R. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in buffer, culture media and foods by lacidin a, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* osu133. **Journal of Food Safety**, v. 14, p. 87-101, 1994.

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v. 21, p. 1-16, 2007.

LIU, S.; CAO, Y. L.; GHOSH, S.; ROUSSEAU, D.; LOW, N. H.; NICKERSON, M. T. Intermolecular Interactions during complex coacervation of pea protein isolate and gum Arabic. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 552-556, 2010.

LÓPEZ-ALVARADO, J.; LANGDON, C. J.; TESHIMA, S. I. et al. Effects of coating and encapsulation of crystalline amino acids on leaching in larval feeds. **Aquaculture**, v. 122, p. 335-346, 1994.

LU, S.; ZHAO, N.; ZHAO, A.; HE, R. Effect of soybean phospholipid supplementation in formulated microdiets and live food on foregut and liver histological changes of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. **Aquaculture**, v. 278, p. 119-127, 2008.

LUZ, R. K. Resistência ao estresse e crescimento de larvas de peixes neotropicais alimentadas com diferentes dietas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, p. 65-72, 2007.

LY, M. H.; AGUEDO, M.; GOUDOT, S.; LE, M. E.; CAYOT, P.; TEIXEIRA, J.A.; LE, T.M.; BELIN, J.M; WACHÉ, Y. Interactions between bacterial surfaces and milk proteins, impact on food emulsions stability. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p.742-751, 2008.

MACEDO-VIEGAS, E.M.; PORTELLA, M.C.; CARNEIRO, D.J. Utilization of fish protein hydrolysate in artificial diets for pacu, *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 14, p. 101-112, 2003.

MAESTRELLI, F.; ZERROUK, N.; CIRRI, M.; MENNINI, N.; MURA, P. Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complex. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, p. 1-11, 2008.

MARQUEZ-RUIZ, G.; VELASCO, J.; DOBARGANES, C.; MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; CORTI, G.; MENNINI, N.; MURA, P. Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 508-518, 2008.

MAY, C. D. Pectins. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A (Ed.). **Handbook of hydrocolloids**. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge, England: CRC, 2000. 443 p.

MERRIEFIELD, D. L.; DIMITROGLOU, A.; FOEY, A.; DAVIES, S. J.; BAKER, R. T. M.; BOGWALD, J.; CASTEX, M.; RINGO, E. The current status and future of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, v. 302, p. 1-18, 2010.

MESBAHI, G.; JAMALIAN, J.; FARAHNAKY, A. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. **Food Hydrocolloids**, v.19, p. 731-738, 2005.

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**, v.91, p.303-314, 1998.

MISHRA, S.; MANN, B.; JOSHI, V. K. Functional improvement of whey protein concentrate on interaction with pectin. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.9-15, 2001.

MOHANTY, S. N.; SWAIN, S. K.; TRIPATHI, S. D. Growth and survival of rohu spawn fed on a liver based diet. **Journal of the Inland Fisheries Society of India**, v. 25, p. 41-45, 1993.

MOHANTY, S. N.; SWAIN, S. K.; TRIPATHI, S. D. Rearing of catla (*Catla catla* Ham) spawn on formulated diets. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 11, p. 253-258, 1996.

MONTERO, D.; KALINOWSKI, T.; OBACH, A.; ROBAINA, L.; TORT, L.; CABALLERO, M. J.; IZQUIERDO, M. S. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. **Aquaculture**, v. 225, p. 353-370, 2003.

MORR, C. V.; HA, Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.

MOUNSEY, J. S.; O'KENNEDY, B. T.; FENELON, M. A.; BRODKORB, A. The effect of heating on  $\beta$ -lactoglobulin-chitosan mixtures as influenced by pH and ionic strength. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 65-73, 2008.

MUKAI-CORRÊA, R. **Produção de micropartículas por gelificação iônica para alimentação de larvas de peixe**: estudos em sistema-modelo com inclusão de micropartículas lipídicas ou emulsão lipídica e testes in vivo. 2008, 177f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição)–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

MUKAI-CORRÊA, R. **Produção e caracterização de microcápsulas obtidas por gelificação iônica para alimentação de larvas de peixe**. 2003, 184f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MUKAI-CORRÊA, R.; PRATA, A. S.; ALVIM, I. D.; GROSSO, C. Caracterização de microcápsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por gelificação iônica. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.9, p. 73-80, 2005.

MUKAI-CORRÊA, R.; PRATA, A. S.; ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Controlled release of protein from hydrocolloid gel microbeads before and after drying. *Current Drug Delivery*, v.1, n.1, p. 265-273, 2004.

MURRAY, H. M.; LALL, S. P.; RAJASELVAM, R.; BOUTILIER, L. A.; FLIGHT, R. M.; BLANCHARD, B.; COLOMBO, S.; MOHINDRA, V.; YÚFERA, M.; DOUGLAS, S. E. Effect of early introduction of microencapsulated diet to larval *Atlantic halibut*, *Hippoglossus hippoglossus* L. Assessed by microarray analysis. *Marine Biology*, v.12, p. 214-229, 2010.

NAYAK, S. K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, v.41, p.1553-1573, 2010.

NEWTON, I. S. Food enrichment with long-chain n-3 PUFA. *Inform*, v. 7, p. 169-177, 1996.

NGOUÉMAZONG, D. E.; KABUYE, G.; FRAEYE, I.; CARDINAELS, R.; LOEY, A.V.; MOLDENAERS, P.; HENDRICKX, M. Effect of debranching on the rheological properties of Ca<sup>2+</sup>-pectin gels. *Food Hydrocolloids*, v. 26, p. 1-10, 2011.

NOVIK, G. I.; SAMARTSEV, A. A.; ASTAPOVICH, N. I.; KAVRUS, M. A.; MIKHALYUK, A. N. Biological activity of probiotic microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 42, p. 166-172, 2006.

NUSSINOVITCH, A. Pectins. In: \_\_\_\_\_. **Hydrocolloid applications**: gum technology in the food and other industries. London: Chapman & Hall, 1997. 2-6 Boundary row. 354p.

O'SULLIVAN, D. J. Primary sources of probiotic cultures. In: GOKTEPE, I.; JENEJA, V. K.; AHMEDNA, M. (Ed.). **Probiotics in food safety and human health**. Boca Raton: Taylor&Francis, 2006. p. 91-108.

OLIVA-TELES, A.; CERQUEIRA, A. L.; GONÇALVES, P. The utilization of diets containing high level on fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture*, v. 179, p. 195-201, 1999.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 1, p.1-21, 2002.

ÖNAL, U.; LANGDON, C. Characterization of two microparticle types for delivery of food to altricial fish larvae. *Aquaculture Nutrition*, v.6, p.159-170, 2000.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil**: o desafio é crescer. Brasília: Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, 2004. 276 p.

OZAWA, K.; YABU-UCHI, K.; YAMANAK, K.; YAMASHITA, Y.; UEBA, K.; MIWATANI, T. Antagonistic effects of *Bacillus natto* and *Streptococcus faecalis* on growth of *Candida albicans*. **Microbiology and Immunology**, v.23, n.12, p.1147-1156, 1979.

PELEGRINE, D. H.; GASPARETTO, C. A. Estudo da solubilidade das proteínas presentes no soro de leite e na clara de ovo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.5, n.1, p.57-65, 2003.

PEPPAS, N. A.; BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release of fragrances from polymers I. Thermodynamic analysis. **Journal of Controlled Release**, v. 40, p. 245-250, 1996.

POLK, A.; AMSDEN, B.; DEYAO, 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.

PRATA, A. S. Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa. 2006. 267f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição)–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

RALET, M.C.; DRONNET, V.; BUCHHOLT, H.C.; THIBAUT, J.F. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterization, polyelectrolyte behavior and calcium binding properties. **Carbohydrate research**, v.336, p. 117-125, 2001.

RÉ, M. I. Microencapsulação: em busca de produtos 'inteligentes'. **Ciência Hoje**, v. 27, p. 24-29, 2000.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 1195-1236, 1998.

REES, D. A. Polysaccharide gels: a molecular view. **Chemistry and Industry**, n. 16, p. 630-636, 1972.

REESE, D. E. **Omega-3 fatty acids and swine reproduction**: a review. Nebraska: Swine Reports, 2003. p. 30-33.

REINECCIUS, G. A. Controlled release techniques in food industry, in encapsulation and controlled release of food ingredients. In: REINECCIUS, G. A.; RISCH, S. J. (Ed.). **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. Washington, DC: American Chemical Society, 1995. p.1-4.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2007. 184p.

RINGO, E.; MYKLEBUSTD, R.; MAYHEWE, T. M.; OLSEN, R. E. Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. **Aquaculture**, v. 268, p. 251-264, 2007.

RONNESTAD, I.; THORSEN, A.; FINN, R. N. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. **Aquaculture**, v. 177, p. 201-216, 1999.

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

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 341- 347, 1998.

SANTIPANICHWONG, R.; SUPHANTHARIKA, M.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D.J. Core-shell biopolymer nanoparticles produced by electrostatic deposition of beet pectin onto heat-denatured  $\beta$ -lactoglobulin aggregates. *JFSN: Journal of food science - Nanoscale food science, engineering and technology*, v. 73, n. 6, p. 23-30, 2008.

SANTOS, J. E.; GODINHO, H. P. Ontogênese e comportamento natatório das larvas do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Homberg, 1887) mantidas experimentalmente em três regimes de fotoperíodo. **BIOS, Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC-Minas**, v. 4, n. 4, p. 11-16, 1996.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESPOND, S.; RENARD, D.; THOMAS, F.; HARDY, J. Effect of protein aggregates on the complex coacervation between  $\beta$ - lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. **Food Hydrocolloids**, v.14, p. 403-413, 2000.

SCHULER, P. Natural antioxidants exploited commercially. In: HUDSON, B. J. F. **Food antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 99-170.

SENO, F.; TROVATO, A. Minireview: the compact phase in polymers and proteins. **Physica A**, v. 384, p.122-127, 2007.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v.17, p. 397-409, out./dez., 2004.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Livraria Varela, 1996.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 33, n.6, p.501-547, 1993.

SHELKE, K. **Hidden ingredients take cover in a capsule**. 2005. Disponível em: <<http://www.foodprocessing.com/articles/2005/421.html>>. Acesso em: 15 ago. 2011

SILVA E. N.; TEIXEIRA, A. S.; BERTECHINI, A. S. Efeito dos probióticos e antibióticos sobre as viscosidades e pH do trato gastrointestinal de frangos de corte. **Ciência e Prática**, v. 25, n. 4, p.163-173, 2001.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1484-1491, 2007.

SINITSYA, A.; COPIKOVA, J.; PRUTYANOV, V.; SKOBLYA, S.; MACHOVIC, V. Amidation of highly methoxylated citrus pectin with primary amines. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 359-368, 2000.

SINKO, P.; KOHN, J. Polymeric drug delivery systems: an overview. In: EL-NOKALY, M. A.; PIATT, D. M.; CHARPENTIER, B. A. **Polymeric delivery systems: properties and applications**. Washington: American Chemical Society, 1993. p. 18-41.

SOUZA, S.M.G.de.; ANIDO, R. J. V.; TOGNON, F. C. Ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 na nutrição de peixes – fontes e relações. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.6, n. 1, p. 63-71, 2007.

SRIAMORNSAK, P. Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 169, p. 213-220, 1998.

SUI, L.; WILLE, M.; CHENG, Y.; SORGELOOS, P. The effect of dietary n-3 HUFA levels and DHA/EPA ratios on growth, survival and osmotic stress tolerance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* larvae. **Aquaculture**, v.273, p. 139-150, 2007.

TAOKA, Y.; MAEDA, H.; JO, J. Y.; KIM, S. M.; PARK, S.; YOSHIKAWA, T. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fisheries Science**, v. 72, p. 755-766, 2006.

TESHIMA, S.; ISHIKAWA, M.; KOSHIO, S. Nutritional assessment and feed intake of microparticulate diets in crustaceans and fish. **Aquaculture Research**, v. 31, n.8-9, p. 691-702, 2000.

TESSER, M. B.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M. C. Co-feeding of *Pacu piaractus mesopotamicus* Holmberg (1887), larvae with *Artemia nauplii* and a microencapsulated diet. **Journal of Applied Aquaculture**, v.17, p. 47-59, 2005.

TESSER, M. B.; PORTELLA, M. C. Degradation analysis of microencapsulated diet in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) larvae intestine through scanning electron microscopy (SEM). **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 25, p. 49-52, 2003.

TESSER, M. B.; PORTELLA, M. C. Ingestão de ração e comportamento de larvas de pacu em resposta a estímulos químicos e visuais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.1887-1892, 2006.

TESSER, M. B.; PORTELLA, M.C. Estimulantes alimentares para larvas de pacu. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, n.9, p. 1851-1855, 2011.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin: a review. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 47-73, 1997.

THIES, C. How to make microcapsules. **Lecture and Laboratory Manual**. St. Louis. Missouri, 1995.

TOCHER, D.R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. **Reviews in Fisheries Science**, v. 11, p. 107-184, 2003.

TREVISAN, H. C. **Imobilização de glicose oxidase em suportes sílicos**. 1990. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

TURGEON, S. L.; LANEUVILLE, S. I. Protein + polysaccharide coacervates and complexes: from scientific background to their application as functional ingredients in food products. In: KASAPIS, S.; NORTON, I. T.; UBBINK, J. B. (Ed.). **Modern biopolymer science**. San Diego, USA: Academic Press, 2009. p. 327-363.

TURQUOIS, T.; RINAUDO, M.; TARAVEL, F. R.; HEYRAUD, A. Extraction of highly gelling pectin substances from sugar beet pulp and potato pulp: influence of extrinsic parameters on their gelling properties. **Food Hydrocolloids**, v.13, p. 255-262, 1999.

VALENTI, W. C. Aquicultura sustentável. In: CONGRESSO DE ZOOTECNIA, 12., 2002, Vila Real, Portugal. **Anais...** Vila Real: Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos, 2002. p. 111-118.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 655-671, 2000.

VIJAYAKUMARAN M.; RADHAKRISHNAN E. V. Control of epibionts with chemical disinfectants in the *Phyllosoma larvae* of the spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus). In: SINGH, I. S. B.; PAI, S. S.; PHILIP, R.; MOHANDAS, A. (Ed.). **Aquaculture medicine**, Kochi, India: Centre for Fish Disease Diagnosis and Management; CUSAT, 2003. p. 69-72.

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

VILLENA, M. J. M.; HERNÁNDEZ, M. E. M.; LARA, G. V.; MARTINÉZ, M. A. R. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. **ARS Pharmaceutica**, v.50, p. 43-50, 2009.

WALKENSTRÖM, P.; HERMANSON, A. M. Mixed gels of gelatin and whey proteins, formed by combining temperature and high pressure. **Food Hydrocolloids**, v. 11, p. 457-470, 1997.

- WANG, Y. B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 269, p. 259-264, 2007.
- WANG, Y. B.; XU, Z. R.; XIA, M. S. The effectiveness of commercial probiotics in Northern White Shrimp (*Penaeus vannamei* L.) ponds. **Fishery Science**, v.71, p. 1034-1039, 2005.
- WEBSTER, C. D.; LOVELL, R. T. Comparison of live brine shrimp nauplii and nonliving diets as first food for striped bass larvae. **Fish Culturist**, v. 52, p. 171-175, 1990.
- WEINBRECK, F.; TROMP, R. H.; DE KRUIF, C. G. Composition and structure of whey protein/gum arabic coacervates, **Biomacromolecules**, v. 5, n. 4, p. 1437-1445, 2004.
- WILLATS, W. G. T; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trend in Food Science & Technology**, v.17, p. 97-104, 2006.
- YAMADA, H. Contribution of pectins on health care. In: J. VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Ed.). **Pectins and pectinases**. Amsterdam: Elsevier, 1996. p. 173-190.
- YÚFERA, M.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C.; PASCUAL, E. Food microparticles for larval fish prepared by internal gelation. **Aquaculture**, v. 248, p. 253-262, 2005.
- YÚFERA, M.; KOLKOVSKI, S.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C.; DABROWSKI, K. Free amino acid leaching from a protein-walled microencapsulated diet for fish larvae. **Aquaculture**, v.214, p. 273-287, 2002.
- YÚFERA, M.; KOLKOVSKI, S.; FERNANDEZ-DÍAZ, C.; RINCHARD, J.; LEE, K. J.; DABROWSKI, K. Delivering bioactive compounds to fish larvae using microencapsulated diets. **Aquaculture**, v. 227, p. 277-291, 2003.
- YÚFERA, M.; PASCUAL, E.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. **Aquaculture**, v.177, p. 249-256, 1999.
- YÚFERA, M.; RODRIGUEZ, A.; LUBIÁN, L.M. Zooplankton ingestion and feeding behavior of *Penaeus kerathurus* larvae reared in the laboratory. **Aquaculture**, v. 42, p. 217-224, 1984.
- YÚFERA, M.; SARASQUETE, C.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C. Testing protein-walled microcapsules for the rearing of firstfeeding gilthead seabream, *Sparus aurata* L. **Marine & Freshwater Research**, v. 47, p. 211-216, 1996.
- ZAMBONINO-INFANTE, J. L.; CAHU, C. L.; PÉRES, A. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. **The Journal of Nutrition**, v.127, p. 608-614, 1997.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 473-479, 1998.

ZUCKERKANDL, E. The appearance of new structures and functions in proteins during evolution. **Journal of Molecular Evolution**, v.7, n.1, p. 1-57, 1975.

ZUO, R.; AI, Q.; MAI, K.; XU, W.; WANG, J.; XU, H.; LIUFU, Z.; ZHANG, Y. Effects of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on growth, nonspecific immunity, expression of some immune related genes and disease resistance of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) following natural infestation of parasites (*Cryptocaryon irritans*). **Fish & Shellfish Immunology**, doi:10.1016/j.fsi.2011.11.005, 2011.

**ANEXO I** - Perfil de aminoácidos do WPC e dos náuplios de *Artemia*. Resultados em g/100g de amostra em base seca

	<i>Artemia</i>	WPC	WPC/ <i>Artemia</i>
Asp	5.47	7.87	1.44
Glu	7.73	13.18	1.70
Ser	3.27	4.20	1.28
Gli	3.02	1.47	0.49
His	1.51	1.38	0.91
Arg	4.56	2.17	0.48
Tre	2.87	5.39	1.88
Ala	3.71	3.70	1.00
Pro	3.45	4.55	1.32
Tir	3.30	2.41	0.73
Val	3.30	4.36	1.32
Met	2.12	2.4	1.13
Cis	1.12	1.97	1.76
Ile	2.80	4.42	1.58
Leu	4.32	7.78	1.80
Fen	2.63	2.42	0.92
Lis	4.91	6.40	1.30
Total	60.09	76.07	-

## ANEXO II - Composição de ácidos graxos do óleo utilizado e das dietas experimentais

A composição dos ácidos graxos das dietas produzidas e do óleo de salmão utilizado foi caracterizada. A extração do óleo das dietas foi realizada segundo a metodologia de Bligh e Dyer (1959), com as mesmas adaptações citadas no item composição centesimal. A determinação dos ácidos graxos das amostras DOSPro- dieta microencapsulada contendo óleo de salmão e probiótico, DOS- dieta microencapsulada contendo óleo de salmão e OS- óleo de salmão foi realizada em um cromatógrafo gasoso (Varian 3600, Walnut Creek, USA) após a esterificação pelo método de Hartman e Lago (1973). Os ésteres de ácidos graxos foram separados de acordo com o procedimento 2-66 (AOAC, 2004) em uma coluna capilar Agilent DB-23 (50% cyanopropyl-methylpolysiloxane), dimensões 60 m,  $\phi$  int 0,25mm, 0,25  $\mu$ m de espessura. A temperatura do forno foi programada para 110°C/5min, 110-215°C (5°C/min), 215°C- 24 min; temperatura do detector: 280°C/temperatura do injetor 250°C; gás carreador: hélio; razão do Split 1:50; volume injetado 1,0  $\mu$ l.

A composição qualitativa foi determinada pela comparação entre os tempos de retenção dos picos com padrões de ésteres de ácidos graxos. Os padrões de ácidos graxos utilizados (Sigma Supelco; Bellefonte, EUA) foram: ácido caproico (C6:0); ácido enântico (C7:0); ácido caprílico (C8:0); ácido pelargônico (C9:0); ácido cáprico (C10:0); ácido undecanoico (C11:0); ácido láurico (C12:0); ácido tridecanoico (C13:0); ácido mirístico (C14:0); ácido pentadecanoico (C15:0); ácido palmítico (C16:0); ácido esteárico (C18:0); ácido nonadecanoico (C19:0); ácido araquídico (C20:0); ácido heneicosanoico (C21:0); ácido bênio (C22:0); ácido tricosanoico (C23:0); ácido lignocérico (C24:0), além de uma mistura de esteres de ácidos graxos PUFA N.o 3 (from Menhanden Oil – Cat. No. 47085-U) contendo ácido mirístico (C14:0); ácido palmítico (C16:0); ácido palmitoleico (C16:1); C16:2n4; C16:3n4; ácido esteárico (C18:0); ácido margaroleico (C17:1); ácido cis-vacênico (C18:1n-7); ácido oleico (C18:1n-9); ácido linoleico (C18:2n-6); ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3n-3); ácido  $\gamma$ -linolênico (C18:3n-4); ácido estearidônico (C18:4n-3); ácido gadoleico (C20:1n-9); ácido araquidônico (C20:4n-6); ácido eicosatetraenoico (C20:4n-3); ácido eicosapentaenoico (C20:5n-3); ácido docosapentaenoico (C22:5n-3) e ácido docosahexaenoico (C22:6n-3). Os padrões foram diluídos em éter de petróleo e injetados na quantidade de 1,0  $\mu$ L.

**ANEXO IIa** - Perfil de ácidos graxos da dieta OS e do óleo de salmão utilizado para a elaboração da dieta

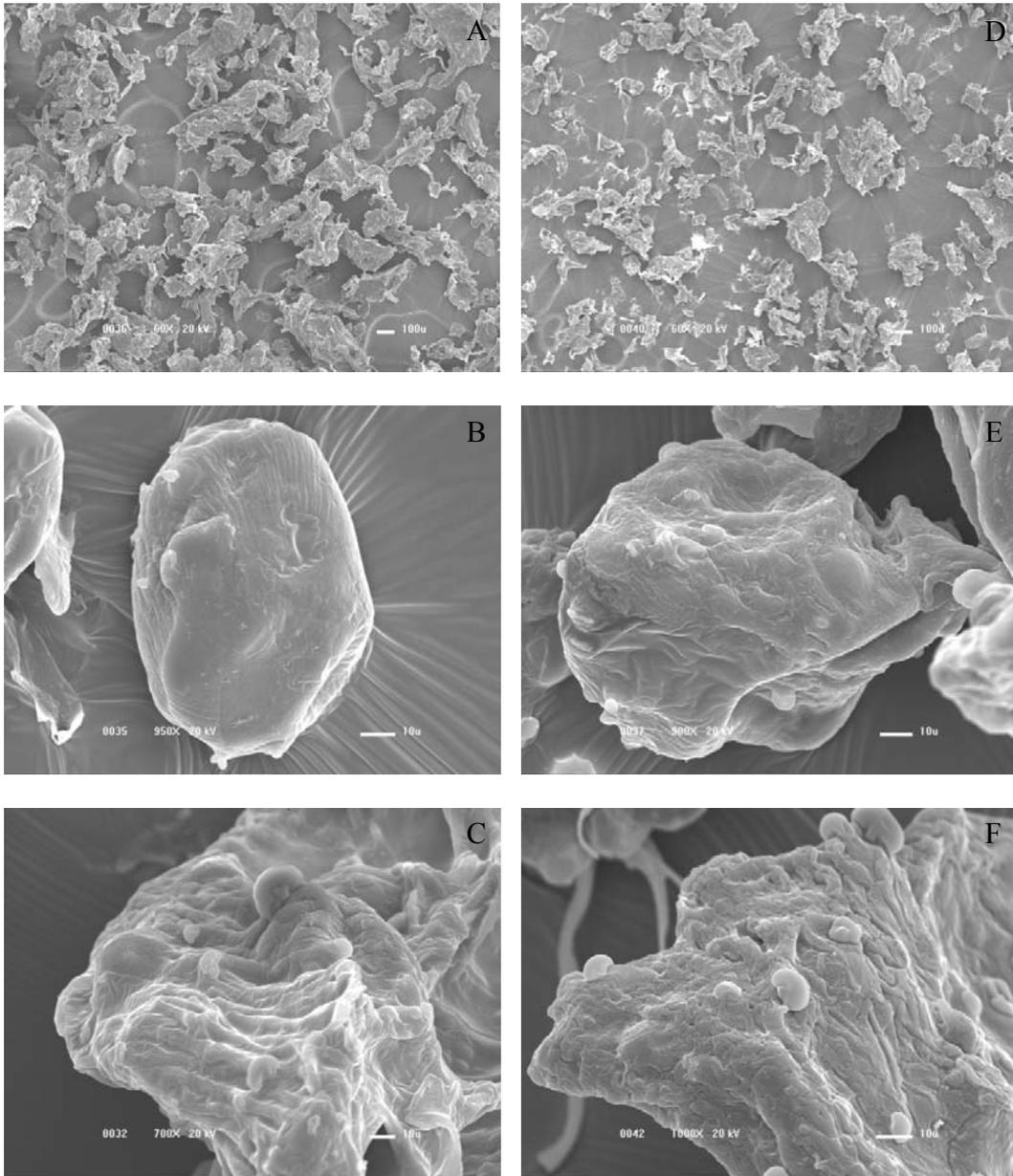
Ácidos Graxos	Óleo de salmão		
	DOS Extração ácida	DOS Extr. enzimática	OS
<b>Saturados</b>			
C 6:0	0,20	nd	nd
C 10:0	0,17	nd	nd
C 12:0	0,42	0,64	nd
C 14:0	11,07	13,34	5,65
C 15:0	1,02	1,23	0,52
C 16:0	33,32	38,83	18,86
C 17:0	1,14	nd	nd
C 18:0	9,43	11,14	5,22
C 20:0	0,43	nd	nd
C 21:0	nd	nd	nd
C 22:0	0,45	nd	8,98
C 24:0	0,19	nd	nd
∑Saturados	57,84	65,18	49,43
<b>Monoinsaturados</b>			
C16:1n9	7,57	7,37	7,94
C17:1	0,29	nd	nd
C18:1n9	23,48	23,27	24,32
C20:1n9	3,21	1,81	1,98
∑Monoinsaturados	34,55	32,45	34,24
<b>Polinsaturados</b>			
C16:2n4	nd	0,87	0,67
C16:3n4	nd	nd	0,87
C18:2n6	2,86	1,50	4,85
C18:3n3	0,30	nd	0,96
C18:4n3	0,21	nd	1,41
C20:4n3	0,16	nd	1,22
C20:5n3	2,09	nd	1,07
C22:5n3	0,67	nd	3,93
C22:6n3	1,34	nd	10,92
∑Polinsaturados	7,63	2,37	25,9
∑ n-3	4,77	nd	19,51
∑n-3/n-6	1,67	nd	4,02

DOS – dieta contendo óleo de salmão; OS – óleo de salmão utilizado na elaboração das dietas.

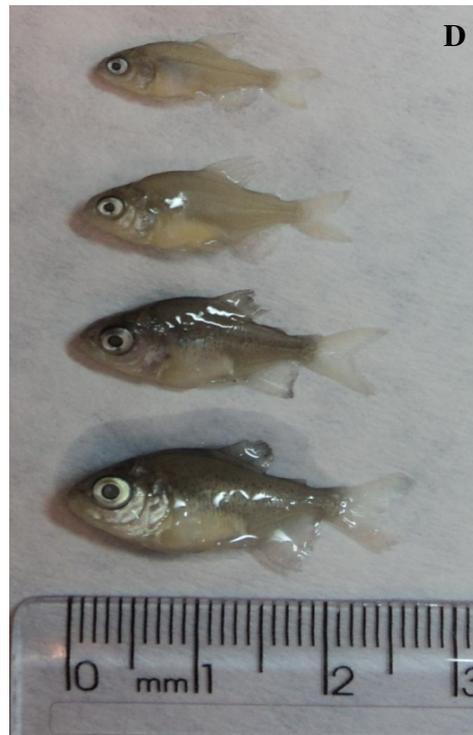
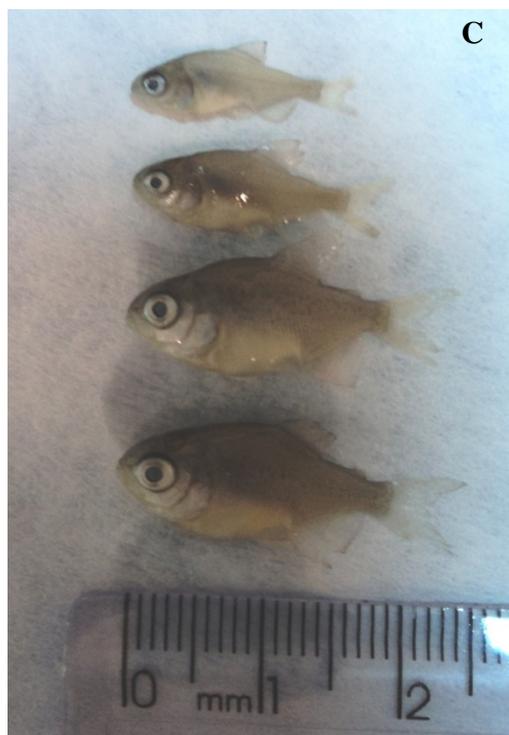
**ANEXO IIb-** Perfil de ácidos graxos da dieta DOSPro e do óleo de salmão utilizado para a elaboração da dieta

Ácidos Graxos	DOSPro		OS
	Extração ácida	Extra. enzimática	
Saturados			
C 6:0	0,19	nd	nd
C 10:0	0,18	0,24	nd
C 12:0	0,48	0,62	nd
C 14:0	10,66	12,73	5,65
C 15:0	0,99	1,17	0,52
C 16:0	32,62	37,16	18,86
C 17:0	0,91	nd	nd
C 18:0	9,46	10,38	5,22
C 20:0	0,43	nd	nd
C 22:0	0,25	nd	8,98
C 24:0	0,18	nd	nd
∑Saturados	56,35	62,3	49,43
Monoinsaturados			
C16:1n9	8,69	8,86	7,94
C17:1	0,39	nd	nd
C18:1n9	27,80	27,22	24,32
C20:1n9	3,56	1,13	1,98
∑Monoinsaturados	40,44	37,21	34,24
Polinsaturados			
C16:2n4	nd	nd	0,67
C16:3n4	nd	nd	0,87
C18:2n6	2,01	nd	4,85
C18:3n3	0,26	nd	0,96
C18:4n3	0,17	nd	1,41
C20:4n3	0,07	nd	1,22
C20:5n3	0,39	0,50	1,07
C22:5n3	0,43	nd	3,93
C22:6n3	nd	nd	10,92
∑Polinsaturados	3,33	0,50	25,9
∑ n-3	1,32	0,50	19,51
∑n-3/n-6	0,66	-	4,02

DOSPro – dieta contendo óleo de salmão e probiótico; OS – óleo de salmão utilizado na elaboração das dietas.



**ANEXO III** - Microscopia eletrônica de varreduras das dietas testadas. A – visão geral da dieta OS; B – micropartícula OS; C – detalhe do envoltório da micropartícula OS; D – visão geral da dieta OSPro; E – micropartícula OSPro; F – detalhe do envoltório da micropartícula OSPro.



**ANEXO IV** – Fotografias das larvas de pacu nas diferentes fases de desenvolvimento durante as quatro semanas de experimento biológico. A= tratamento OS; B= tratamento OSPro; C= tratamento DMC e D= tratamento AN.