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

Produção de micropartículas por gelificação iônica para alimentação de larvas de peixe: Estudos em Sistema-Modelo com inclusão de micropartículas lipídicas ou emulsão lipídica eTestes *in vivo*.

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição

RENATA MUKAI CORRÊA

Doutoranda

CARLOS R. F. GROSSO

Orientador

Campinas – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Corrêa, Renata Mukai
C817p 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 / Renata Mukai Corrêa. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

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

1. Micropartículas lipídicas. 2. Larvas de peixe. 3. Liberação controlada. 4. Gelificação iônica. 5. Compostos hidrofílicos. I. Grosso, Carlos Raimundo Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Production of microparticles by ionic gelation for fish larvae feeding: studies in model - system with inclusion of lipids microparticles or emulsion and assays in vivo
Palavras-chave em inglês (Keywords): Lipid microparticles, Fish larvae, Control release, Ionic gelation, Hydrophilic compounds
Área de concentração: Consumo e Controle de Alimentos
Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição
Banca examinadora: Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Valdemiro Carlos Sgarbieri
Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues
Maria Helena Andrade Santana
Débora Machado Fracalossi
Maria Célia Portella
Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINDORA

_____

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

_____

Profa Dra Débora Machado Fracalossi
Centro de Ciências Agrárias –USFC
(membro)

_____

Profa Dra Maria Célia Portella
Centro de Aquicultura da Unesp
(membro)

_____

Profa Dra Maria Helena Andrade Santana
Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP
(membro)

_____

Dr. Rodney Alexandre Ferrreira Rodrigues
CPQBA-UNICAMP
(membro)

_____

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp
(membro)

Dedico este trabalho à minha família e em especial aos meus pais Edna e Leone, que nunca mediram esforços para estarem sempre presentes em minha vida...

À minha querida Heleninha que tornou muito mais doce os meus dias, te amo...

"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e arte. O homem que desconhece esse encanto, incapaz de sentir admiração e estupefação, esse já está, por assim dizer, morto e tem os olhos extintos."

(Albert Einstein)

" O único lugar aonde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário" (Albert eisntein)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar saúde e força para que eu alcançasse a conclusão desse trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso, pela atenção, responsabilidade, disponibilidade e empenho constante a este trabalho, e por contribuir expressivamente em minha formação acadêmica.

À banca examinadora composta pelos professores: Profa Dra Débora Machado Fracalossi, Profa Dra. Maria Célia Portella, Profa Dra Maria Helena Andrade Santana, Dr. Rodney Alexandre Ferrreira Rodrigues, Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, pelas sugestões propostas que melhoraram a composição final deste trabalho. Em especial, a Profa Dra. Maria Célia Portella por disponibilizar a infra-estrutura de seu laboratório para que o ensaio biológico pudesse ser realizado, pela atenção e auxílio.

Aos meus pais por me incentivarem e ajudarem sempre. Somente com ajuda deles foi possível a realização dos ensaios em biológicos em Jaboticabal (Caunesp), muito obrigada mesmo.

Ao Prof. Dr. Alfredo Vitali pela sua atenção e hospitalidade disponibilizando a infra-estrutura do Frutotec/ITAL.

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

Ao Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán, sua técnica Carla e Eder (aluno brilhante), pelas análises aminoacídicas realizadas.

À Profa. Dra. Flávia Maria Netto pela atenção e disponibilização do equipamento pH-Stat. A Eliana pelo seu grande auxílio e análises de eletroforese.

Ao Prof Dr.Clóvis Parazzi, orientador de minha iniciação científica, pela grande amizade e conselhos dados durante anos e anos... sempre me icentivando.

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

Ao pessoal do Caunesp: Natália, Rodrigo, Luis Otávio, Julio, por serem tão prestativos e atenciosos durante minha permanência em Jaboticabal. A Rosângela Jomori e Marcelo Tesser que tanto contribuíram no enriquecimento do conteúdo desse trabalho e artigos.

Aos amigos do Departamento de Nutrição: Yara, Chico, Suzana, Fátima, Cidinha, Beth, Soeli, Eliana, Dona Nice, pelos tantos quebra galhos. Em especial ao Chico, Suzana e Fatiminha, pela amizade, momentos de descontração e desabafos, e que sempre me ajudaram.

Às minhas queridas estágiárias, Marcela e Erika, pela paciência e dedicação. Admiro o grande esforço e vontade de sempre querer estar apredendo, meninas vocês vão longe!

À minha amiga Ana Silvia pelas dicas, “mão na massa” e conselhos, aliás muitos, que me ajudaram bastante nessa fase de minha vida.

À Izabela, companheira de laboratório pelas dicas e contribuições intelectuais, e grandes idéias compartilhadas.

Às meninas do laboratório: Andrea, Nono, Alda, Carol, Camila e Glaucia pela amizade e por serem sempre prestativas. Agradeço muito a vocês todas. À Camila também agradeço a grande ajuda prestada durante os ensaios biológicos conduzidos no Caunesp.

À Larissa e Taciana e Karina, pelo pelas dicas, conselhos e amizade.

A todos os funcionários da pós-graduação e ao Cosme, pela paciência, competência, muito obrigada.

Ao Valdeci da manutenção pelas ajudas prestadas na manutenção e confecção de equipamentos.

Ao meu marido pela sua paciência, seu apoio (financeiro, também !) e por estar sempre ao meu lado. Também não posso me esquecer de agradecer pela Helena, o meu maior presente, muito obrigada.

A todas as pessoas que contribuíram para que este trabalho fosse concretizado, muito obrigada.

À CAPES pelo financiamento da bolsa de doutorado.

ÍNDICE

ÍNDICE_____xiii

INDICE DE FIGURAS _____ xvii

ÍNDICE DE TABELAS _____ xxiii

RESUMO GERAL _____ 1

ABSTRACT _____ 3

INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA _____ 5

OBJETIVOS _____ 8

1. OBJETIVO GERAL_____ 8

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____ 8

CAPITULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____ 9

1. Aqüicultura _____ 9

2. Alimento vivo e dietas inertes_____ 12

3. Fisiologia das larvas e composição das dietas _____ 18

4. Microencapsulação _____ 20

5. Microencapsulação por gelificação iônica _____ 22

6. Biopolímeros _____ 24

6.1. Goma gelana _____ 24

6.2. Pectina _____ 25

6.3. Alginato_____ 27

CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA SISTEMAS MODELOS_____ _____ 29

1. INTRODUÇÃO ***33***

2. MATERIAL E MÉTODOS ***36***

2.1. Materiais **36**

2.2. Produção das micropartículas lipídicas (LMs) **36**

2.2.1 Ensaios preliminares 36

2.2.2 Preparo das micropartículas lípidicas 37

2.2.3 Otimização do processo 38

2.3. Produção das micropartículas de gel contendo micropartículas lipídicas (MPLs) ou emulsão (EM) **39**

2.4. Secagem das micropartículas de gel **41**

2.5. Caracterização físico-química **41**

2.5.1 Distribuição de tamanho e diâmetro médio 41

2.5.2 Morfologia e microestrutura 41

2.5.3 Capacidade de hidratação 42

2.5.4 Eficiência de encapsulação 42

2.5.5 Eficiência de Inclusão 43

2.5.6 Perfis de liberação 44

2.6. Análise estatística **44**

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO ***45***

3.1. Produção das micropartículas lipídicas (MPLs) **45**

3.1.1 Otimização do processo 46

3.1.2 Produção das micropartículas geleificadas 52

3.1.3 Eficiência de encapsulação 52

3.1.4 Distribuição de tamanho e diâmetro médio 54

3.1.5 Capacidade de rehidratação 59

3.1.6 Morfologia e microestrutura 60

3.1.7 Perfis de liberação 75

4. CONCLUSÕES 82

CAPÍTULO 3. DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE DIETAS MICROPARTICULADAS PARA LARVAS ALTRICIAIS DE PEIXE. 83

1. INTRODUÇÃO 86

2. MATERIAL E MÉTODOS 88

2.1. Preparo das dietas 88

2.1.1 Obtenção das matérias-primas 88

2.1.2 Produção das dietas microparticuladas 90

2.1.3 Ensaios *in vivo* e *in vitro* 94

2.1.4 Análise estatística 97

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 98

3.1. Caracterização da matéria-prima 98

3.1.1 Gordura de peixe 98

3.1.2 Concentrado de proteínas de peixe (CPP) 99

3.2. Produção das dietas 103

3.2.1 Caracterização físico-química 103

3.3. Ensaios biológicos 113

3.3.1 Crescimento e Sobrevivência 113

3.3.2 Taxa de ingestão 123

4. CONCLUSÕES 130

CONCLUSÕES GERAIS _____ ***131***

CONSIDERAÇÕES FINAIS _____ ***132***

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS _____ ***133***

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA _____ ***134***

ANEXO I _____ ***149***

ANEXO I _____ ***151***

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de complexo microparticulado para larvas de peixes marinhos, proposto por GABBOT et al.. (1976), modificado por OZKIZILCIK & CHU (1996). FAA – aminoácidos livres _____16

Figura 2. Esquema ilustrativo do equipamento para produção das micropartículas lipídicas. GP/AE – gordura de peixe/ ácido esteárico _____38

Figura 3. Fluxograma da produção de micropartículas de gel contendo como recheio emulsão lipídica ou micropartículas lipídicas (MPLs) com glicose ou proteína (WPI). _____40

Figura 4. Gráficos de Pareto com valores estimados dos efeitos padronizados e suas interações para as variáveis estudadas sobre a eficiência de encapsulação (EE) na produção das micropartículas lipídicas, ao nível de 95% de confiança (p=0,05). A – micropartículas contendo glicose; B – micropartículas contendo proteína; %GLI- concentração da solução de glicose; LIP_GLI – proporção de lipídeo e glicose; %WPI - concentração da solução de proteína; LPI_WPI - proporção de lipídeo e proteína. _____50

Figura 5. Gráficos de Pareto com valores estimados dos efeitos padronizados e suas interações para as variáveis estudadas sobre a liberação de glicose após 60 minutos de experimento (LIB60'), ao nível de 95% de confiança (p=0,05). A – micropartículas contendo glicose; B – micropartículas contendo proteína; %GLI- concentração da solução de glicose; LIP_GLI – proporção de lipídeo e glicose; %WPI - concentração da solução de proteína; LPI_WPI - proporção de lipídeo e proteína. _____51

Figura 6. Imagens obtidas por microscopia óptica das micropartículas lipídicas. A – conteúdo de glicose; B – conteúdo de proteína. Aumento de 12,5x (barra = 10μm). _____60

Figura 7. Imagens obtidas por microscopia óptica das micropartículas gelificadas com pectina contendo micropartículas lipídicas. A e B – contendo glicose; C e D – contendo proteína. Aumento de 12,5x em A e C, e 25x em B e D. Barra = 100μm._____61

Figura 8. Imagens obtidas por microscopia óptica das micropartículas gelificadas com a mistura pectina/gelana/aginato, contendo micropartículas lipídicas. A e B – com glicose; C e D – com proteína. Aumento de 12,5x para A e C, e 25x para B e D. Barra = 100μm._____62

Figura 9. Imagens obtidas por microscopia óptica das micropartículas gelificadas contendo mistura lipídica, em emulsão. A e B – matriz de pectina com glicose e proteína, respectivamente; C e D – matriz de pectina/gelana/alginato contendo glicose e proteína. Aumento de 12,5x. Barra = 100μm _____1

Figura 10. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas lipídicas. A - com glicose; B – com proteína. Barras = 10μm. 64

Figura 11. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas gelificadas com pectina contendo micropartículas lipídicas. A – com glicose; B – com proteína; Barras = 10μm e 100 μm._____64

Figura 12. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas gelificadas com pectina, contendo a mistura lipídica em emulsão. A e B com glicose; C e D – com proteína. Barras = 10μm e 100 μm.66

Figura 13. Imagens obtidas por microscopia confocal: Micropartículas com parede lipídica- Nile red (fluorescência observada na cor vermelha) contendo

proteína -FITC (fluorescência na cor verde) . A – Observação por transmitância (DIC); B – proteína - FITC; C – micropartículas lipídicas- Nile red e D – sobreposição de B e C; - . Barras = 50µm._____69

Figura 14. Imagens obtidas por microscopia confocal: Sistema pectina (sem coloração) contendo emulsão lipídica- Nile red (fluorescência observada na cor vermelha) com proteína -FITC (fluorescência na cor verde) . A – Observação por transmitância (DIC); B – proteína-FITC; C – micropartículas lipídicas- Nile red e D – sobreposição de B e C. Barras = 50µm. _____71

Figura 15. Imagens obtidas por microscopia confocal: Sistema pectina/gelana/alginato (sem coloração) contendo emulsão lipídicas- Nile red (fluorescência observada na cor vermelha) com proteína -FITC (fluorescência na cor verde) . A – Observação por transmitância (DIC); B – proteína - FITC; C – micropartículas- Nile red e D – sobreposição de B e C. Barras = 50µm. _____73

Figura 16. Liberação das micropartículas lipídicas em sistema aquoso, em função do tempo. Sistemas contendo proteína ou glicose. _____75

Figura 17. Liberação (%) da glicose (gly) e da proteína (wpi), retida em micropartículas lipídicas ou em emulsão lipídeo+proteína (wpi-EM), encapsuladas em matrizes de gel, ao longo do tempo. A – sistema com pectina; B - sistema com pectina/gelana/alginato. _____77

Figura 18. Liberação (%) de micropartpiculas secas contendo glicose (gly) ou proteína (wpi), retidas em micropartículas lipídicas ou em emulsão lipídeo+proteína (wpi-EM), ao longo do tempo. A – sistema com pectina; B - sistema com pectina/gelana/alginato. _____81

Figura 19. Perfil de aminoácidos totais (g/100 g de proteína) do concentrado protéico de peixe (CPP), comparado ao padrão utilizado em dietas para larvas de peixe (BASKERVILLE-BRIDGES 2000). As barras indicam os desvios padrão obtidos da triplicata da amostra _____ 101

Figura 20. Solubilidade em água (%) do concentrado de proteínas liofilizado em função do pH._____ 101

Figura 21. Eletroforese em gel SDS-PAGE do concentrado protéico de peixe: 1 e 2 – amostras do concentrado protéico; P - padrões de peso molecular; a,b,c,d,e,f,g,h e i – bandas protéicas observadas. _____ 102

Figura 22. Fotomicrografias da morfologia das dietas micropartículadas observada por microscopia óptica. A – Dieta micropartículada (DM) ; B – Dieta micropartículada contendo náuplios de Artemia (DMA). Captação em água em aumento de 12,5X . Barra = 100 µm._____ 108

Figura 23. Morfologia externa da dieta micropartículada formulada DM, obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Micrografias A e C – aspecto geral da micropartícula (aumento 200x); B e D – detalhamento da parede da micropartícula (aumento 650x). Barras = 10 e 100 µm. _____ 109

Figura 24. Morfologia externa da dieta micropartículada DMA (contendo náuplios de Artemia liofilizados na formulação como substituição parcial da fonte protéica), obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Micrografias A e C – aspecto geral da microcápsula (aumento 200x); B e D – detalhamento da parede da micropartícula (aumento 650x). Barras = 10 e 100 µm. _____ 110

Figura 25. Perfil de liberação da proteína das dietas micropartículadas, ao longo do tempo. Os tratamentos DM e DMA com símbolos cheios representam as dietas micropartículadas úmidas e os tratamentos com símbolos abertos, representam as dietas secas._____ 111

Figura 26. Desempenho de crescimento em peso (g) das larvas de pacu, durante o período experimental. A – náuplios de Artemia; DM – dieta micropartículada; DMA - dieta micropartículada contendo náuplios de Artemia

; DMC – dieta comercial. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p>0,05). _____ 114

Figura 27. Desempenho em comprimento total (mm) das larvas de pacu, durante o período experimental. A – náuplios; DM – dieta micropartículada; DMA - dieta micropartículada, contendo náuplios de Artemia; DMC – dieta comercial. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente, entre si pelo teste de Tukey (p>0,05). _____ 115

Figura 28. Fotografias de larvas de pacu, em diferentes estágios de desenvolvimento de acordo com as biometrias realizadas. A – tratamento com Artemia; B – tratamento com dieta DMC; C – tratamento com dieta DM; D- tratamento com dieta DMA. Os números à esquerda das Figuras correspondem as biometrias realizadas. _____ 117

Figura 29. Taxa de crescimento específico (%) das larvas de pacu durante o período experimental dos tratamentos estudados. A – nauplios de Artemia; J – jejum ; DM – dieta micropartículada; DMA – dieta micropartículada contendo Artemia ; DMC – dieta comercial. _____ 119

Figura 30 Micrografias do trato digestório de larvas de pacu alimentadas com as dietas, em diferentes estágios de desenvolvimento, obtidas por microscopia ótica. A – larvas com peso médio de 6 mg, após o consumo da dieta DM (aumrnto 40X) . B – larvas com 15 mg e dieta DMC (40X). C – larvas com 25 mg e dieta DMA. Aumento de 20x. Setas pretas indicam as micropartículas presentes no interior do trato digestório das larvas. _____ 125

Figura 31. Grau de hidrólise (D.H. %) da caseína (cas), concentrado protéico de peixe (CPP), dieta micropartículada (DM) e dieta micropartículada contendo náuplios de Artemia (DMA), em função do tempo._____ 127

Figura 32. Amostras de larvas de pacu dos tratamento estudados. 1. Tratamento em jejum; 2. Dieta DM ; 3. dieta DMA; 4. dieta DMC; 5. alimento vivo Artemia.149

Figura 33. Micrografia do trato digestório de larvas de pacu, após 25 dias de experimento obtidos por microscopia ótica. As setas pretas estão indicando as dietas micropartículas DMA. _____ 151

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Dados da produção da Aquacultura mundial, para espécies de água doce e marinhas cultivadas, em toneladas. _____10

Tabela 2. Custo do alimento vivo Artemia e de dietas comerciais disponíveis.13

Tabela 3. Composição centesimal de rotíferos e Artemia, em base seca.___19

Tabela 4. Variáveis e níveis estudados para otimização do processo de produção de microparticulas lipídicas contendo glicose ou isolados protéico de soro de leite (fatorial completo) _____39

Tabela 5. Ponto de fusão das misturas de gordura de peixe (GP) e ácido esteárico (AE)._____45

Tabela 6. Planejamento experimental (variáveis numéricas e codificadas) e respostas de eficiência de encapsulação (E.E) e liberação após 60 minutos (LIB60'), para avaliação da produção de micropartículas lipídicas contendo glicose _____47

Tabela 7. Planejamento experimental (variáveis numéricas e codificadas) e respostas de eficiência de encapsulação (E.E) e liberação após 60 minutos (LIB60'),para avaliação da produção de micropartículas lipídicas contendo proteína. _____48

Tabela 8. Valores médios e respectivos desvios padrões de eficiência de inclusão (IE), encapsulação dos compostos hidrofílicos (EE), eficiência de processo (EP) e sólidos totais (%) dos sistemas gelificados contendo micropartículas (MP) ou emulsão lipídica (EM) com glicose (GLY) ou proteína (WPI). _____53

Tabela 9. Diâmetros médios, respectivos desvios padrões e distribuição de tamanho das micropartículas lipídicas (MPL) contendo compostos os compostos hidrofílicos (glicose e proteína)._____55

Tabela 10. Diâmetros médios, respectivos desvios padrões e distribuição de tamanho das micropartículas de gel (MPGEL) contendo micropartículas lipídicas (MPL) com os compostos hidrofílicos glicose (GLY) e proteína (WPI). _____57

Tabela 11. Diâmetros médios, respectivos desvios padrões e distribuição de tamanho das micropartículas de gel (MPGEL) contendo emulsão lipídica (EM) com os compostos hidrofílicos glicose (GLY) e proteína (WPI)._____58

Tabela 12. Valores de diâmetro médio (μm) dos sistemas secos e hidratados, com emulsão (EM) ou micropartículas lipídicas (MPL) contendo proteína. __59

Tabela 13. Composição das dietas experimentais, em base seca. _____91

Tabela 14. Caracterização do Índice de peróxido (mg/100g), cinzas (%) e umidade (%) da gordura de pacu obtida. Valores médios e respectivos desvios padrões. _____98

Tabela 15. Perfil de ácidos graxos dos lipídeos totais da gordura de pacu. Os valores médios foram obtidos a partir da duplicata da amostra e expressos em porcentagem. _____99

Tabela 16. Valores médios de eficiência de encapsulação (E.E.), proteínas, lipídeos e matéria seca total das formulações estudadas. O valor calculado representa o valor teórico do perfil nutricional na formulação e o valor experimental representa o resultado obtido dos ensaios em triplicata. ___ 103

Tabela 17. Valores médios e respectivos desvios padrões para, composição centesimal das dietas micropartículadas, e do náuplio de Artemia, expressos em base seca. _____ 104

Tabela 18. Aspecto morfológico e distribuição de tamanho das dietas micropartículadas secas e após hidratação._____ 106

Tabela 19. Valores de diâmetro médio (µm) das dietas micropartículadas úmidas, secas e hidratadas._____ 107

Tabela 20. Valores médios e respectivos desvios padrões de ganho de peso (g), biomassa (g) e sobrevivência (%) das larvas de pacu, entre os tratamentos testados, após 25 dias de experimento._____ 120

Tabela 21. Valores médios de taxa de ingestão (%) das dietas micropartículadas pelas larvas de pacu durante o período de experimento. _____ 123

RESUMO GERAL

Este estudo teve como objetivo produzir micropartículas por gelificação iônica contendo, como recheios, constituintes nutricionalmente importantes para a alimentação de larvas de peixes. Na primeira parte deste estudo, foram desenvolvidos sistemas modelos compostos por micropartículas obtidas por gelificação iônica utilizando os polissacarídeos pectina e a mistura ternária: pectina/gelana/alginato e íons cálcio para formação das matrizes. Como conteúdo, foram incorporados compostos hidrofílicos (glicose e isolado protéico de soro de leite) na forma de micropartícula ou emulsão lipídica, utilizando uma mistura lipídica (gordura de peixe/ácido esteárico) contendo surfactantes (monoestearato de sorbitana+triesterato de sorbitana). Esses sistemas foram caracterizados em relação à eficiência de encapsulação, eficiência de inclusão, hidratação, tamanho médio e sua distribuição, morfologia e composição centesimal. Os sistemas preparados na forma de emulsão lipídica apresentaram uma distribuição mais homogênea do conteúdo das micropartículas e liberação de proteínas significativamente menor ($p<0,05$) do que os sistemas contendo micropartículas lipídicas, sendo os compostos por pectina/gelana/alginato, os que apresentaram a menor liberação observada (~5%).

Na segunda parte deste estudo, os compostos hidrofílicos incorporados na forma de emulsão nos sistemas modelos foram substituídos por duas dietas experimentais. Seu preparo envolveu a obtenção e caracterização da gordura de peixe, concentrado protéico de peixe e dos náuplios de *Artemia*, utilizados na composição das dietas. Essas dietas foram otimizadas em relação ao conteúdo de proteínas, lipídeos e matéria seca, numa tentativa de alcançar o perfil nutricional dos náuplios de *Artemia* sp; e caracterizadas em relação à sua composição, tamanho, hidratação, morfologia, eficiência de encapsulação e liberação/retenção das proteínas. Ensaios *in vivo* foram feitos para avaliar a eficiência das dietas e *in vitro* para avaliar a digestibilidade dos compostos protéicos encapsulados. As dietas micropartículadas apresentaram perfis de

composição protéica, lipídica e de matéria seca, próximos aos dos náuplios de *Artemia* (alimento vivo). A integridade foi mantida após a secagem, apresentando baixa liberação de proteína durante o período estudado (10% para micropartículas secas). Os ensaios *in vivo* e *in vitro* mostraram boa digestibilidade da massa protéica das dietas, manutenção da taxa de crescimento e razoáveis valores de sobrevivência (~50%), porém ainda não suficientes para suportar um crescimento similar ao alcançado quando foi utilizado alimento vivo.

ABSTRACT

The aim of this study was to produce microparticles by ionic gelation containing essential ingredients for larvae fish feeding. In the first part of this study two model systems of microparticles obtained by ionic gelation were developed. The wall materials used were pectin and one ternary mixture of polysaccharides: (pectin/gelan/alginate) and calcium ions. First, hydrophilic compounds (glucose and whey protein isolate) were used as core material to produce solid lipid microparticles or emulsions using the same lipid mixture (fish fat/stearic acid) plus surfactants (sorbitan monoestearate + sorbitan triestearate) and after the solid lipid microparticles and the emulsions were used as core to produce gelified microparticles. The systems were characterized with respect to encapsulation efficiency, inclusion efficiency, swelling capacity, size and distribution size, morphology and proximate composition

The systems prepared with lipid emulsions presented more homogenous distribution of the core material and the protein release was lower than the systems containing lipid microparticles ($p<0,05$). The systems produced with ternary mixture presented the lowest protein release (5%).

In the second part of the study the hydrophilic compounds incorporated as emulsions in the model systems were substituted by two experimental diets. The preparation of the diets included the extraction and characterization of fish fat, fish protein concentrate and Artemia nauplii. These materials were used in the diet formulations. Those diets were improved with respect to protein content, lipids, and dry matter, trying to mimetic the nutritional profile of Artemia náuplii and characterized as a function of composition, size, swelling, morphology, encapsulation efficiency and protein release. In vivo assay were made in order to evaluate diets efficiency and in vitro assay to evaluate protein digestibility. The content of protein, lipid and dry matter of the microparticles similar as observed for Artemia náuplii (live feed).

Integrity was kept after dryer showed low protein release during the release period studied (10% to dry microparticles). *In vivo* and *in vitro* assays showed razonable digestibility, growing rates and also survival rates. However the microparticles could not sustained the same growing profile obtained when *Artemia* was used as the source of feed (alive feed). The results indicated that these particles can be improved as substitutes for live food (*Artemia*).

INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

A aquicultura tornou-se, na última década, uma atividade econômica de grande importância no cenário brasileiro de produção de alimentos, tendo se desenvolvido de forma bastante rápida, com taxas de crescimento médias anuais superiores a 22% [SEAP, 2007]. A produção mundial total dos produtos obtidos da aqüicultura, em 2005, foi de 59,4 milhões de toneladas, totalizando uma renda em torno de 73 bilhões de dólares, que representam um aumento médio anual de 6,9% em quantidade e 7,7% em valores, com 50% dessa produção e renda oriundas de peixes [FAO, 2007]. No período de 1990-2001, o Brasil obteve um crescimento de aproximadamente 825%, enquanto a aqüicultura mundial teve um crescimento de 187% para o mesmo período. O resultado desse crescimento fica evidenciado no *ranking* mundial estabelecido pela FAO, em que o Brasil encontrava-se na 36ª colocação em 1990 e passou a ocupar a 19ª em 2001. No *ranking* atual da América do Sul, o Brasil encontra-se em segundo lugar com 269,7 mil toneladas [IBAMA, 2006], superado apenas pelo Chile com 700 mil toneladas [FAO,2007].

Entre os segmentos do setor aquícola - a piscicultura, a carcinicultura (camarões) e a malacocultura (moluscos) - apresentam um grande problema a ser enfrentado em uma de suas etapas de produção: a larvicultura. Essa fase é considerada um dos pontos críticos no cultivo, sendo alvo de muitas pesquisas.

O fator mais importante na larvicultura é a dependência do fornecimento de plâncton como primeiro alimento para as larvas (estágio inicial de vida) da maioria das espécies de peixes, crustáceos e bivalves cultivados. No entanto, quando essas larvas são cultivadas intensivamente, os custos para produção do alimento vivo são elevados, contabilizando uma proporção significativa dos custos operacionais totais na larvicultura [LANGDON, 2003; JOMORI *et.. al.*, 2005]. A substituição desse tipo de alimento por

dietas inertes é crucial para redução dos custos de produção, bem como mante-la constante e com qualidade 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 e LANDGON, 2000; YÚFERA *et al*., 2000, 2003]. Estas 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, diretamente ligados à natureza intrínseca da partícula como a textura, paladar, cor, formulação, tamanho, densidade e estabilidade em água [KOLKOVISKI, 2001; CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001]. Outros apontam a perda de alguns nutrientes aquossolúveis e inadequados perfis nutricionais, como fatores determinantes na eficiência de substituição do alimento vivo [TESHIMA *et al.,* 2000; CAHU & ZAMBONINO-INFANTE, 2001; HAMRE *et al.,* 2001; LANDGON, 2003].

O presente estudo é uma continuidade da dissertação de mestrado intitulada *Preparo e caracterização de microcápsulas obtidas por polimerização iônica para alimentação de larvas de peixes* [MUKAI-CORREA, 2003]. Quatro biopolímeros (alginato, pectina de baixo teor de metoxilação, goma gelana e carragena) e sistemas constituídos de suas misturas foram estudados e avaliados, em relação ao seu potencial de uso, para fabricação de microcápsulas produzidas por gelificação iônica com íons cálcio, contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada, como sistema modelo. Como comportamento funcional, essas microcápsulas mostraram: insolubilidade em água, altos rendimentos de encapsulação (78,8 a 94,4%) e digestibilidade da proteína encapsulada frente à tripsina (ensaios *in vitro).* Entretanto, as microcápsulas contendo misturas dos biopolímeros (gelana/alginato e pectina/gelana/alginato), após inclusão de gordura vegetal, apresentaram perfis de liberação com retenção de quase 90% da proteína encapsulada (após 240min de imersão em água), mostrando-se potenciais para carrear dietas com o intuito de

substituição do alimento vivo. No entanto, o desenvolvimento de formulações balanceadas e a avaliação de liberação/retenção de compostos hidrofílicos e de baixo peso molecular e ensaios *in vivo* das cápsulas são necessários para melhorar a retenção, a estabilidade após secagem e as características nutricionais dos sistemas constituídos pelas matrizes poliméricas frente as necessidades das larvas.

Este trabalho teve o objetivo de aprimorar e aprofundar os conhecimentos no desenvolvimento de micropartículas para a alimentação de larvas de peixes, obtidas por gelificação iônica. Adicionalmente, micropartículas ou emulsões lipídicas envolvendo compostos hidrofílicos de baixa massa molar foram desenvolvidas e estudadas em sistemas modelos, utilizados para avaliação das suas características de liberação. Dietas micropartículadas experimentais, com formulação baseada no alimento vivo *Artemia sp* foram testadas em ensaios *in vitro* e *in vivo*, utilizando larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), escolhido como espécie modelo. Características funcionais importantes para a aplicação proposta, como: morfologia, distribuição de tamanho, perfis de liberação e capacidade de hidratação foram determinadas para todos os tipos de micropartículas produzidas. Este projeto está inserido em uma linha de pesquisa inédita no Brasil, voltado ao desenvolvimento de dietas para larvas de peixes, com estudos conduzidos no Laboratório de Controle de Qualidade/Departamento de Alimentos e Nutrição em associação com o Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *campus* Jaboticabal, onde foram feitos os ensaios *in vivo*.

***Palavras-chave** : micropartículas, gelificação iônica, spray cooling, larvas de peixe, liberação controlada.*

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Produzir micropartículas por gelificação iônica contendo como recheio constituintes nutricionalmente importantes para a alimentação de larvas de peixes, e avaliá-las em dietas utilizando larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em ensaios *in vivo.*

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Estudar por meio de sistemas modelos a veiculação de compostos hidrofílicos por intermédio de micropartículas lipídicas ou emulsões como conteúdo das micropartículas produzidas por gelificação iônica a partir de duas formulações contendo os polissacarídeos pectina e a mistura ternária pectina/gelana/alginato.

b) Produzir micropartículas a partir de misturas de compostos hidrofóbicos (gordura de peixe e ácido graxo), envolvendo compostos hidrofílicos de baixa massa molar (glicose e isolado protéico de soro de leite).

c) Utilizando os compostos marcadores (glicose e isolado protéico de soro de leite), estudar o comportamento de liberação das micropartículas lipídicas em solução aquosa.

d) Comparar o comportamento de liberação das micropartículas obtidas por gelificação iônica, contendo micropartículas lipídicas ou emulsão lipídica (sistemas modelo).

e) Caracterizar todos os sistemas obtidos em relação à desidratação/reidratação, tamanho e morfologia.

f) Utilizar o melhor sistema modelo estudado para a encapsulação de dietas, contendo níveis de proteínas, lipídios e de matéria seca similares aos náuplios de *Artemia sp.*

h) Avaliar o potencial dessas dietas micropartículadas como substitutas parciais do alimento vivo, através de: ensaios *in vivo* de crescimento e sobrevivência de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), e *in vitro* pela digestibilidade, medida pelo grau de hidrólise das proteínas encapsuladas.

CAPITULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Aqüicultura

A aqüicultura mundial vem apresentando índices médios anuais de crescimento de 9,2 %, comparados aos 1,4 % da pesca extrativa e 2,8 % da produção de animais terrestres [FAO, 2007], sendo a China o país com maior produção, com 71% do cultivo mundial e cerca de 50%, em termos de valor (Tabela1).

Generosamente rico em bacias hidrográficas, como a bacia amazônica (20% da água doce do mundo), águas represadas (5 milhões de hectares), além de 8.400 quilômetros de costa marítima e um clima extremamente favorável ao crescimento desses organismos cultivados, tanto de espécies marinhas, como de água doce, o Brasil apresenta um enorme potencial para o desenvolvimento da aqüicultura [SEAP, 2007].

A aqüicultura comercial brasileira firmou-se como atividade econômica no cenário nacional da produção de alimentos, a partir de 1990, com uma produção de pescado cultivado inicial em torno de 25.000 toneladas/ano. Em 2000, o Brasil passou a produzir cerca de 150.000 toneladas de pescado cultivado (piscicultura, carcinicultura, malacocultura e outros), tendo se desenvolvido de forma bastante rápida. Em 2001, a produção foi de aproximadamente 200.000 toneladas, com 128.000 produtores e aumento de 40% da área cultivada em relação a 1998, que era de 78.552 hectares cultivados por 96.657 aqüicultores. Em 2005, a produção total foi de 257.780 toneladas, passando em 2006 para 271.606 toneladas, com crescimento de 9,6 % (6,4 % aqüicultura continental e 3,2% maricultura) em relação ao ano de 2005. Em valores, a produção aqüícola brasileira em 2006 chegou ao total de 536 milhões de dólares, com 12 milhões provenientes da malacocultura (marisco e ostras), 146 milhões da

carcinicultura (camarão) marinha, 371 milhões da piscicultura de água doce [IBAMA, 2006].

Atualmente, tanto os peixes como os moluscos produzidos em aquicultura são comercializados, em sua maioria, no mercado interno. No caso dos camarões marinhos, cerca de 30% da produção é destinada ao mercado interno, enquanto 70% são exportados para os Estados Unidos, França, Espanha, Itália e Holanda [FAO, 2007].

Tabela 1. Dados da produção da Aqüicultura mundial, para espécies de água doce e marinhas cultivadas, em toneladas.

	Ambiente	2000	2001	2002	2003	2004	2005
África	Límnico	391 695	396 956	441 926	507 270	547 651	633 520
	Marinho	16 409	17 415	21 492	24 078	21 868	22 850
Total		**408 104**	**414 371**	**463 418**	**531 348**	**569 519**	**656 370**
América do Norte	Límnico	405 120	413 862	446 970	471 029	469 094	465 262
	Marinho	306 056	369 258	387 494	412 141	502 034	396 898
Total		**711 176**	**783 120**	**834 464**	**883 170**	**971 128**	**862 160**
América do Sul	Límnico	204 263	214 674	244 245	248 067	265 136	271 498
	Marinho	539 729	758 359	769 137	806 293	876 912	893 937
Total		**743 992**	**973 033**	**1 013 382**	**1 054 360**	**1 142 048**	**1 165 435**
Ásia	Límnico	19 794 763	21 049 416	22 405 615	23 828 804	26 064 942	27 534 231
	Marinho	21 809 459	23 142 704	25 069 502	26 613 706	28 777 086	30 438 252
Total		**41 604 222**	**44 192 120**	**47 475 117**	**50 442 510**	**54 842 028**	**57 972 483**
Europa	Límnico	455 626	480 090	472 010	484 795	471 889	461 113
	Marinho	1 603 640	1 615 326	1 574 138	1 677 510	1 723 373	1 679 329
Total		**2 059 266**	**2 095 416**	**2 046 148**	**2 162 305**	**2 195 262**	**2 140 442**
Oceania	Límnico	3 610	3 809	3 394	2 842	2 391	3 667
	Marinho	130 295	122 107	130 088	134 084	147 347	158 489
Total		**133 905**	**125 916**	**133 482**	**136 926**	**149 738**	**162 156**

Fonte: adaptado da FAO – Serviço de Informação e Estatística – *Fisheries and Aquaculture* - 21/08/2007.

Analisando a situação atual, é possível observar algumas tendências para a aqüicultura brasileira, que incluem [SEAP, 2007]:

- Aumento significativo na produção de peixes de água doce, especialmente das tilápias e de algumas espécies nativas, como o pacu e pintado;
- Rápido desenvolvimento do cultivo em gaiolas ou tanques-redes nos reservatórios;
- Aumento do uso de rações comerciais e diminuição dos cultivos realizados à base de estercos de animais terrestres;
- Priorização de espécies autóctones nas bacias hidrográficas mais preservadas, tais como a Amazônica e a do Paraguai;
- Maior uso de equipamentos utilizados em sistemas intensivos;
- Mais atenção aos mercados externos e à exportação;
- Aumento no número de produtos aqüícolas processados e com valor agregado.

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*), espécie pertencente à família *Characidae*, é um peixe de água doce, originário da bacia Paraná-Paraguai e apresenta grande potencial para a aqüicultura, pois é uma espécie de hábito alimentar onívoro, rápido crescimento, boa qualidade de carne e boa aceitação pelo mercado consumidor [JOMORI, 1999]. Segundo dados de produção aquícola do IBAMA [2006], referente ao ano de 2006, o pacu aparece em segundo lugar (87 toneladas), como espécie nativa mais cultivada no Brasil, com grande importância nos estados do Centro-oeste e Sudeste, ficando atrás apenas do tambaqui (*Colossoma macropomum*). Atualmente, a criação das larvas de pacu no Brasil é feita em sistema semi-intensivo de produção, que resulta baixas taxas de sobrevivência (em torno de 35 a 50%), pois suas larvas dependem da disponibilidade de organismos vivos nos primeiros dias de vida, para garantia de seu desenvolvimento inicial, crescimento e sobrevivência. Uma alternativa promissora para esse sistema é a produção intensiva dessa espécie em laboratório, que resulta em taxas de sobrevivência superiores às obtidas em sistema semi-intensivo [JOMORI *et al.*, 2003].

No entanto, a substituição ou minimização do período de uso do alimento vivo por dietas é necessária para diminuição dos gastos de produção e favorecimento de uma larvicultura em grande escala [TESSER & PORTELLA, 2006]. Estudos recentes conduzidos com larvas de pacu visando à substituição do alimento vivo por dieta apresentaram resultados insatisfatórios de crescimento e sobrevivência [JOMORI, 1999; TESSER *et al.*, 2005], com mortalidade total das larvas quando a dieta inerte foi fornecida exclusivamente desde o início [TESSER *et al.*, 2005]. O uso exclusivo desse tipo de dieta inerte para larvas de pacu foi alcançado por JOMORI *et al* .[2008], mas o crescimento das larvas foi muito pequeno quando comparado às larvas alimentadas exclusivamente com náuplios de *Artemia*.

2. Alimento vivo e dietas inertes

A nutrição das larvas, após a eclosão, é garantida pelas suas reservas vitelínicas. O período que se sucede à depleção do vitelo, quando os indivíduos passam a necessitar de alimentação exógena, é considerado o ponto crítico para a sobrevivência desses organismos, sendo a questão que mais tem ocupado os pesquisadores de países em que a aqüicultura é mais avançada. Nessa etapa, a disponibilidade de zooplâncton (o primeiro alimento) é fundamental, pois passam a ser a principal fonte de substâncias como as proteínas, os aminoácidos, as enzimas, os ácidos graxos, entre outros; necessários ao desenvolvimento da larva [PORTELLA, 1996].

Rotíferos e *Artemia* são usados intensivamente como o alimento vivo dominante para estágios larvais de espécies de peixes de água doce e marinha. Entretanto, o custo de aquisição e de infraestrutura e laboratórios para um cultivo em massa desses organismos zooplanctônicos representam uma parte significante dos investimentos. Adicionalmente, o fornecimento inconstante e a ocorrência de mudanças na composição bioquímica desses organismos (que variam de acordo com o local de

coleta), muitas vezes levam a uma nutrição sub-ótima das larvas [TESSER & PORTELLA, 2005]. A possibilidade de carrearem contaminantes como agrotóxicos e patógenos, também contribui como fatores negativos. PERSON LE RUYET *et al*. [1993] calcularam os custos envolvidos com o alimento vivo (como principal *Artemia*) para o cultivo de "seabass" (*Dicentrarchus labrax*) e concluíram que o alimento vivo foi responsável por 79% do custo de produção (juvenis com 45 dias de idade) e por 50% dos custos nos primeiros três meses de cultivo. Em estudo recente, JOMORI *et al.* [2005] encontraram que a alimentação com organismos vivos pode representar até 33% dos custos totais de produção do cultivo do pacu.

Diversas microdietas têm sido desenvolvidas e testadas como alternativa econômica ao alimento vivo, proporcionando manejo mais simples e também como uma maneira de introduzir e fornecer nutrientes que não estão disponíveis no alimento vivo para as larvas (VILLAMAR e LANGDON, 1993; LANGDON, 2003; ÖNAL e LANGDON, 2004; KVALE *et al.,*2006).

A Tabela 2 ilustra o custo do alimento vivo e de algumas dietas comerciais disponíveis no mercado.

Tabela 2. Custo do alimento vivo *Artemia* e de dietas comerciais disponíveis.

Site*	**Produto**	**Tipo**	**Peso Unid. (g)**	**Preço [1] Unid. (US$)**
***Artemia*-international.com**	Great Salt Lake *Artemia* cysts	Vivo	425	90,00
	San Francisco Original *Artemia* cysts	Vivo	425	75,00
	Artemia descapsulada	Inerte	500	13,00
	Biomassa de *Artemia* congelada	Inerte	425	6,00
	Artemia em flocos	Inerte	400	38,00
	Golden Pearls – Dieta para larvas	Inerte	500	48,00
actwin.com/fish	Cistos de *Artêmia*	Vivo	425	130,60
Miami-aquaculture.com	Great Salt Lake Strain Cysts	Vivo	454	40,00
	San Francisco Bay Strain Cysts	Vivo	454	77,00
	Lansy NRD 1/2 (*Artemia* redution feed)	Inerte	1000	48,88
	Proton 1 (*Artemia* Reduction Feed)	Inerte	1000	54,13

Sites consultados em agosto de 2007; [1] - valores sem taxas e impostos.

Os primeiros estudos com dietas para peixes, utilizando micropartículas, datam de 1966 [LANGDON, 1989], sendo as dietas microencapsuladas obtidas por polimerização interfacial, constituídas de parede protéica, as primeiras desenvolvidas nessa área. Elas incluíam em sua formulação *nylon* e outros agentes químicos potencialmente tóxicos, que depois foram substituídos. Entretanto, atualmente ainda são utilizados solventes orgânicos em sua produção e seu custo é elevado [LANGDON, 2003]. Essas cápsulas apresentam boas características de retenção do material encapsulado [YÚFERA *et al.*., 1999, 2000]. Por outro lado, algumas espécies de larvas de peixes estudadas mostraram dificuldade de quebrá-las e digeri-las [CHU & OZKIZILCIK, 1999]. Em uma seqüência de estudos, YÚFERA *et al*. [1996 a 2002] estudaram dietas microencapsuladas por polimerização interfacial. Elas foram capazes de substituir a primeira alimentação de larvas de *Sparus aurata*, entretanto o desempenho em crescimento e sobrevivência dessas larvas foram inferiores aos observados quando eram fornecidos exclusivamente *Artemia*, sugerindo a falta de nutrientes na dieta, como o de aminoácidos livres.

Dietas microencapsuladas produzidas com agar, carragena ou alginato, utilizando a técnica de gelificação iônica e cálcio como agente de reticulação apresentaram-se estáveis em água, sendo quebradas e digeridas por algumas espécies de peixes de água doce [LOPEZ-ALVARADO *et al*., 1994; GUTHRIE *et al*., 2000] e marinhos [YÚFERA *et al.,* 2000; ROBIN e PERON, 2004]. O processo de produção de micropartículas com o uso dessa técnica de gelificação iônica é simples e de baixo custo, comparativamente aos custos e infra-estrutura exigidos para a produção de alimento vivo. A formação da partícula ocorre pelo gotejamento de uma solução polimérica, contendo os nutrientes em uma solução iônica, em concentrações adequadas, podendo-se obter razoáveis níveis de recheio e cápsulas de diferentes formas e tamanhos [WILAERT & BARON, 1996, MUKAI-CORRÊA *et al*., 2004]. Essa técnica não envolve o uso de solventes orgânicos ou temperaturas e pHs extremos, entretanto, apresenta restrições na retenção de compostos hidrofílicos de baixa massa molar, como vitaminas, minerais, peptídeos, aminoácidos, açúcares etc., que são rapidamente liberados com a hidratação das partículas [VILLAMAR e LANGDON,

1993]. LOPEZ-ALVARADO *et al*. [1994] relataram que mais de 80% de aminoácidos foram liberados, após 2 minutos de imersão em água, de micropartículas produzidas a partir de alginato, carragena e zeína. Mas a adição de lipídeos nessas matrizes polissacarídicas produz uma melhora na retenção desses compostos [VILLAMAR e LANGDON, 1993, MUKAI-CORRÊA *et al*., 2004].

Micropartículas lipídicas têm sido produzidas para melhorar as características de liberação dos compostos hidrofílicos [BUCHAL & LAGDON, 1998; CHU & OZKIZILCIK, 1996; ONAL e LANGDON, 2004; MUKAI-CORRÊA *et al*., 2004; ONAL e LAGDON, 2005]. Entretanto, esse tipo de micropartícula não pode carrear grandes quantidades de nutrientes, pois somente uma pequena proporção de seu volume, entre 5 e 15%, representam a quantidade efetiva de recheio (material) que pode ser encapsulado. Por outro lado, microcápsulas com parede protéica ou polissacarídica, com maior capacidade de recheio, podem ser usadas com essa função: de suprir a necessidade nutricional de proteínas, lipídeos e carboidratos [LOPEZ-ALVARADO *et al*, 1994].

Lipossomos apresentam um considerável interesse para encapsular nutrientes solúveis em água e melhorar a estabilidade de compostos como o colesterol e a vitamina E [COUTTEAU & SOGELLOS, 1997]. No entanto, a produção escalonada é difícil e envolve um custo elevado.

Complexos microencapsulados, formados por microcápsulas com parede de proteínas, contendo micropartículas lipídicas carregadas com aminoácidos, desenvolvidos por ÖNAL & LANGDON [2004], demonstraram ser efetivos em reter compostos de baixa massa molar, retendo mais que 90% de lisina, por mais de 24 horas de imersão das microparticulas em água. O modelo hipotetizado por GABBOT *et al.* [1976] para bivalves marinhos, modificado por OZKIZILCIK & CHU [1996], mostra um protótipo formado por um complexo micropartículado. Na Figura 1, pode-se observar que, nesse modelo, a parede da microcápsula é permeável para permitir a liberação de substâncias atrativas, como aminoácidos livres. Em contrapartida, compostos altamente solúveis, como vitaminas e minerais, são encapsulados nas matrizes lipídicas, preservando a qualidade nutricional da dieta. Esse tipo de cápsula

proposto pode ainda permitir a encapsulação de enzimas digestivas e outros componentes em compartimentos separados.

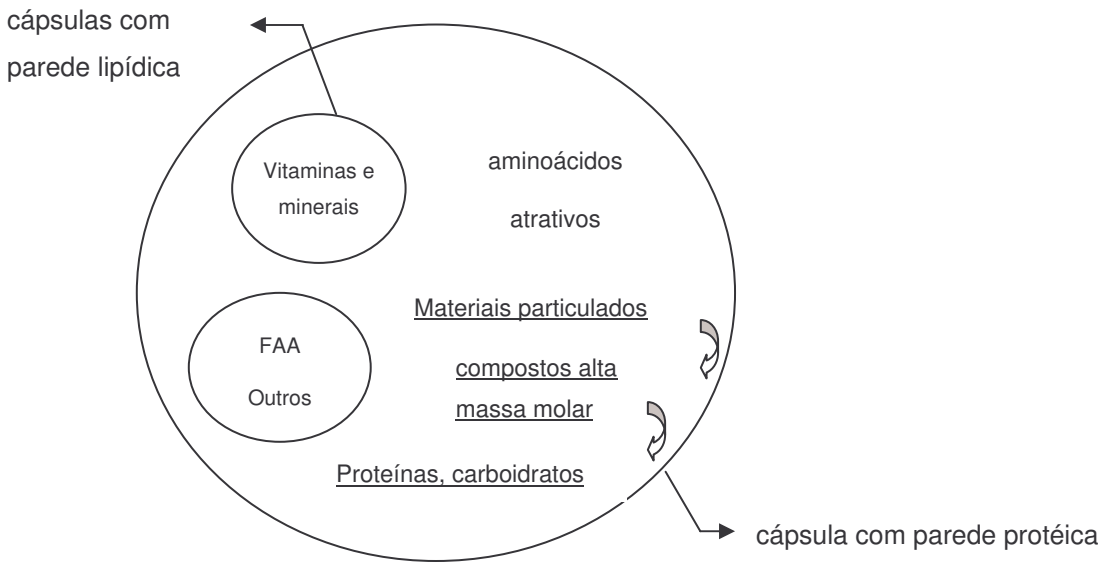


Figura 1. Modelo de complexo microparticulado para larvas de peixes marinhos, proposto por GABBOT *et al.*. [1976], modificado por OZKIZILCIK & CHU [1996]. FAA – aminoácidos livres

Apesar de grandes esforços, entretanto, a maioria das microdietas desenvolvidas não tem obtido sucesso, muitas vezes sendo usadas como suplementos, pois quando utilizadas exclusivamente, o crescimento e a sobrevivência das larvas são freqüentemente comprometidos. A substituição total de alimento vivo com microdietas tem sido acompanhada em larvas de camarões, enquanto que, em cultivo de peixes, a larvicultura ainda se baseia na presença do alimento vivo [TESHIMA e KOSHIO, 2000].

Considerando as informações disponíveis, os resultados negativos podem ser atribuídos a uma variedade de fatores, como baixa ingestão das dietas [YÚFERA, *et al.*, 1999], pobre desenvolvimento do trato digestório, baixa atividade enzimática, entre outros [KOLKOVSKI *et al.*,1997; KOLKOVSKIi *et al.*, 2001; LANGDON, 2003]. Muitos autores acreditam que os resultados negativos ligados aos fatores citados estão

diretamente relacionados à natureza intrínseca da partícula, como: textura, paladar, cor, formulação, tamanho, densidade e estabilidade em água [KOLKOVISKI, 2001; CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001; JOMORI, *et al. ,*2005]. Outros apontam à perda de alguns nutrientes aquossolúveis e ao inadequado perfil nutricional [TESHIMA *et al.,* 2000; CAHU & ZAMBONINO-INFANTE, 2001; HAMRE *et al.,* 2001; LANGDON, 2003].

O desenvolvimento de dietas micropartículadas deve ser focado na produção de matrizes que retenham componentes hidrossolúveis de diferentes massas molares [OZKIZILCIK & CHU, 1996; ÖNAL e LANGDON, 2004], possuam flutuabilidade adequada [SRIVASTAVA *et al*., 2002], baixa taxa de dissolução e perda de nutrientes (JONES *et al*., 1993) e apresentem menor custo, em relação às dietas vivas [JOMORI *et. al.*,2005]. Aliado a esses parâmetros, elas também devem possuir boa aceitabilidade e fácil digestão [KOLKOVSKI *et al*., 2001; GUTHRIE *et al*., 2000].

Dessa maneira, as micropartículas devem manter-se intactas até que as larvas de peixe possam ingeri-las, para promover máxima sobrevivência, crescimento e desenvolvimento larval. Elas devem possuir as mesmas características fisiológicas e estruturais de um alimento vivo, tais como: conter diversas fontes protéicas e lipídicas, vitaminas, minerais, aminoácidos etc. [PEDROZA- ISLAS, 2004].

KOLKOVSKI [2001] acredita também que a necessidade de conhecer e compreender a habilidade digestiva da larva são questões importantes para elaboração de dietas. LINDNER *et al.* [1995] ainda ressaltam a atenção à qualidade dos ingredientes e proteínas utilizadas nas dietas, que podem ser de difícil digestão para as larvas, ou mesmo conter fatores antinutricionais. O conhecimento das necessidades nutricionais, comportamento (hábitos alimentares) e condições fisiológicas (constituição do trato gastrintestinal, composição em enzimas digestivas, tamanho de boca, tempo de digestão das larvas, de espécies de peixes cultiváveis também deve ser conhecidas e consideradas [FERNÁNDEZ-DIAZ *et al*., 1994; MILLAMENA *et al*., 1999].

3. Fisiologia das larvas e composição das dietas

A capacidade digestiva da larva é, muitas vezes, um fator limitante à utilização de dietas inertes como alimento inicial. O processo de digestão e absorção de nutrientes, não é totalmente esclarecido, podendo variar de espécie para espécie. Existem diversas explicações para os mecanismos que envolvem a ingestão e digestão do alimento pela larva, e sua conversão em crescimento e sobrevivência [KOLKOVSKI, 2001; JOMORI *et al*., 2003]. Algumas teorias estão baseadas nas limitações digestivas; outras, que a liberação de compostos do alimento vivo estimulem a produção de enzimas digestivas [KOLKOVSKI, 2001].

A aceitabilidade das dietas também parece influenciar a sobrevivência e o crescimento das larvas, uma vez que está relacionada à sua composição como: digestibilidade dos ingredientes, fonte de proteínas e lipídeos, atrativos e a forma de preparo [TESSER *et al*., 2005]. Dietas que apresentam menor aceitação que o alimento vivo acarretam, na maioria das vezes, menores taxas de crescimento. No entanto, a aceitablidade das dietas em alguns casos é elevada, mas o crescimento da larva é inferior ao apresentado por larvas alimentadas com alimento vivo, sugerindo a existência de fatores nutricionais, presentes nesse alimento, que melhorem a conversão alimentar e, com isso, o ganho de peso [KOLKOVSKI, 2001].

O conteúdo de proteínas nas microdietas e seu balanço nutricional são fundamentais para a adequada alimentação das larvas. O conteúdo de matéria seca de rotíferos e *Artemia*, em geral, é de 8,8 e 9,2%, representando 52 e 60,1% de proteína em base seca e 5,2 a 6,0% de proteína em base úmida, respectivamente. No entanto, a maioria das microdietas descritas na literatura, para esse propósito, foram desenvolvidas para conter uma alta quantidade de proteínas e de matéria seca, como as desenvolvidas por BASKERVILLE-BRIDGES & KLING [2000], contendo 94,9% de matéria seca e 61,8% de proteínas. GUTHRIE *et al*. [2000] observaram baixos níveis de sobrevivência e crescimento para esses tipos de dietas. Segundo KOLKOVSKI [2001], a dificuldade de a larva digerir as dietas está relacionada a 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 a 34,8% (base seca), para sistemas contendo somente proteína, ainda inferiores às quantidades presentes nos alimentos vivos típicos para as larvas. A Tabela 3 apresenta a composição centesimal do alimento vivo típico, usado como alimentação de larvas.

Tabela 3. Composição centesimal de rotíferos e *Artemia*, em base seca.

Organismo	**Proteína ($g\ kg^{-1}$)**	**Lipídeos ($g\ kg^{-1}$)**	**Carboidratos ($g\ kg^{-1}$)**	**Cinzas ($g\ kg^{-1}$)**
Rotíferos	520	115	14	141
Artemia	601	193	28	83

Fonte: BASKERVILLE-BRIDGES [2000]

A técnica conhecida como co-alimentação (*co-feeding*), em que as larvas são alimentadas inicialmente com alimento vivo por alguns dias, com a substituição gradativa pela dieta, tem apresentado sucesso na inclusão de dietas inertes [TESHIMA E KOSHIO, 2000]. Geralmente, essa co-alimentação com microdietas e alimento vivo produz uma melhora no crescimento, comparado à alimentação somente com microdietas, pela contribuição direta no aumento do suprimento de nutrientes às larvas [ROSELUND *et al*., 1997], além de servir como uma espécie de aprendizado. PORTELLA [1996] cita que a co-alimentação com alimento vivo e dietas inertes pode produzir crescimento e sobrevivência muito parecidos aos alcançados com o alimento vivo somente.

4. Microencapsulação

A microencapsulação consiste na cobertura de partículas muito pequenas de ingredientes com um material, visando reduzir a reatividade do material encapsulado (recheio) em relação ao meio (luz, oxigênio, umidade, temperatura etc.), controlando sua taxa de liberação ou evaporação e facilitando o manuseio do material encapsulado [SHAHIDI & HAN, 1993]. A liberação do material de recheio pode ocorrer por ruptura mecânica, temperatura, pH ou solubilidade do meio, biodegradação ou por difusão [REINECCIUS, 1995]. Ela permite a variação de diversos fatores (ingredientes e procedimentos) que influenciam nas características finais do produto. A microcápsula pode ser formada por várias técnicas, em que a escolha do método em particular é determinada, em grande parte, pelas características de solubilidade dos componentes ativos e dos materiais carreados [ROSENBERG & YUNG, 1993].

As primeiras aplicações de microencapsulação foram feitas na década de 1960, em papéis de cópia sem carbono, que levavam em suas folhas de papel comum a tinta microencapsulada. Ao serem pressionadas, as microcápsulas rompiam liberando a tinta [RÉ, 2007].

Na indústria de alimentos, a microencapsulação tem sido muito aplicada na proteção de flavorizantes, enzimas, microrganismos, vitaminas, ácidos graxos, minerais, peptídeos [DZIEZAK, 1988; RÉ, 2007; LISERRE, 2005]. Outras funções também ligadas à encapsulação podem ser citadas, tais como a transformação do estado físico de substâncias (líquido para sólido); preservação da qualidade nutricional; ocultação de propriedades indesejáveis (sabor, aroma, pH, cor etc.) e liberação controlada do material encapsulado em condições específicas [SHAHIDI & HAN, 1993; RÉ, 1998]; entre outras.

Dois tipos básicos de estruturas são formados pelo processo de microencapsulação, diferenciados pela distribuição do recheio. Quando a estrutura formada é do tipo “reservatório”, observa-se uma partícula mononucleada com o conteúdo (recheio) envolvido por uma parede (película), que recebe o nome de microcápsula. Já, quando o conteúdo se distribui em uma estrutura tipo “esponja” ou

matriz, observa-se uma partícula multinucleada, que recebe o nome de microesfera ou micropartícula. O tipo de estrutura formada influi na quantidade e no comportamento da liberação do conteúdo [THIES, 1995].

De maneira geral, o processo de microencapsulação é dividido em três etapas: preparo de uma solução ou suspensão com o material de parede e o a ser encapsulado, seguido de homogeinização (envolvimento do material de parede ao redor do recheio) e fixação ou solidificação do material de parede [THIES, 1995]. Este, juntamente com o recheio, pode ser preparado separadamente, onde o material de parede e o recheio são dispersos em uma única fase do mesmo solvente ou, ainda, cada um disperso em uma fase da emulsão (óleo em água ou água em óleo). As cápsulas produzidas por cada método apresentam características diferentes de retenção do recheio e podem apresentar comportamento de liberação diferenciado [ALVIM, 2005].

Na seleção dos materiais de parede para imobilização de compostos, diversos aspectos devem ser considerados, como: as propriedades mecânicas das cápsulas, a forma física e o tamanho das partículas, a resistência ao ataque químico e microbiano, as características de superfície (carga, hidrofobicidade, absorção de outras substâncias, superfície específica e composição química), a morfologia do material, sua permeabilidade, capacidade de ser derivatizado, preço e disponibilidade comercial [TREVISAN, 1990].

Em geral, o material de parede não deve reagir com o recheio e nem nele ser solúvel, sendo interessante que apresentem polaridades opostas [CARDOSO, 2000].

De acordo com RÉ [1998] e CARDOSO [2000], o material de parede deve possuir boa propriedade emulsificante, permitir a formação de filme, baixa viscosidade, baixa higroscopicidade, estabilidade e proteção do recheio e ausência de sabores desagradáveis.

A possibilidade de controle na taxa de liberação do material encapsulado é uma das funções mais exploradas da tecnologia de microencapsulação e está diretamente relacionada ao material de parede (cobertura), estrutura química, espessura,

porosidade e solubilidade [FANGER, 1974]. O comportamento e as características das microcápsulas produzidas dependem do material de parede escolhido, das características do material a ser encapsulado, do método de produção empregado e do meio de liberação [ALVIM, 2005].

O tamanho e distribuição do poro têm uma fundamental influência na difusão de moléculas através da rede de gel das microcápsulas [VELINGS & MESTDAG, 1995]. A porosidade do gel pode ser significativamente reduzida pela secagem parcial das cápsulas [SMIDSROD, 1973], embora essa desidratação possa causar fissuras em sua superfície e facilitar a erosão durante o contato com o meio de liberação. Matrizes de alginato contendo "blue dextrana" submetidas a ensaios de liberação, após sua secagem, apresentaram liberação de dextrana mais rápida do que nas cápsulas não desidratadas, em razão da formação dessas fissuras [KIM & LIM, 1992]. A hidratação em solução aquosa apresentada pelas microcápsulas também é um fator importante no controle da taxa de liberação de compostos encapsulados, em que a expansão causa um aumento no tamanho do poro do gel e, conseqüentemente, a permeabilidade da cápsula é afetada. A área de superfície disponível para contato com a solução e a concentração intracapsular do componente diluído também são influenciados pela hidratação, podendo alterar as características de liberação [POLK *et al.*, 1994].

5. Microencapsulação por gelificação iônica

Métodos de microencapsulação, como precipitação, polimerização interfacial e secagem por atomização, estão bem estabelecidos [TANAKA *et al.*, 1984; DUPUY *et al.*, 1988; DOUGLAS e SEFTON, 1990]. Entretanto, estes métodos não têm sido utilizados em trabalhos cujo objetivo é a liberação do recheio, pois podem envolver a utilização de solventes orgânicos, temperaturas extremas ou condições de pH que poderiam torna-los inativos.

A polimerização iônica, ou ligação iônica de polieletrólitos, apresenta condições brandas, é simples, rápida e de baixo custo. Envolve uma solução polimérica aquosa,

com íons de baixa massa molar, em que polieletrólitos de cargas opostas interagem formando um complexo. Cápsulas de alginato ou pectina de baixo teor de metoxilação são muito usadas como material de cobertura, sendo os íons cálcio o agente de reticulação mais utilizado [MESTDAGH e AXELOS, 1998].

A concentração de polissacarídeo e cátions, a força iônica e o pH determinam a cinética da formação do gel, bem como o volume, estabilidade e porosidade das cápsulas, podendo influenciar na difusão de solutos para dentro e para fora da matriz polimérica [MESTDAGH e AXELOS, 1998].

Dietas protéicas, carboidratos e partículas insolúveis em água podem ser incorporadas e eficientemente mantidas por microcápsulas fabricadas por gelificação iônica, com o uso de hidrocolóides [VILLAMAR & LANGDON, 1993, MUKAI-CORRÊA *et al*., 2004].

Já as misturas de polissacarídeos podem melhorar as características do gel resultante. Quando dois polissacarídeos são misturados, podem produzir diferentes tipos de estrutura resultante, incluindo redes provenientes de entumescimento, geradas a partir de separação de fases, redes interpenetrantes e redes pareadas [AMSDEN, 1998]. Misturas de pectina e alginato foram utilizadas em diferentes proporções e avaliadas em relação à capacidade de alterar a difusão de diferentes recheios empregados. Os resultados indicaram que o comportamento de difusão de um soluto hidrofóbico (fenilalanina) foi fortemente afetado pela introdução da pectina metilada na mistura, enquanto um soluto mais hidrofílico (triptofano) foi muito menos afetado [MESTDAGH e AXELOS, 1998]. MUKAI-CORRÊA *et al*. [2004], estudando a produção de microcápsulas produzidas por gelificação iônica com o uso de diversos polissacarídeos, observaram diferentes perfis de liberação, com maior retenção de proteína quando se utilizou a mistura polissacarídica composta de pectina/gelana/alginato (1:1:1 p/p), melhorando também a retenção da proteína encapsulada por meio da adição de lipídeos nos sistemas.

6. Biopolímeros

Os biopolímeros são muito utilizados como material de parede, pois apresentam características interessantes, como a liberação controlada de compostos, além da possibilidade de modificação da formação de sua estrutura, que podem influenciar diretamente na difusividade e porosidade da partícula formada. Ingredientes e modificadores adequados (enzimas, plastificantes, reticulantes, múltiplas coberturas etc.) podem ser introduzidos física ou quimicamente para alterar características como solubilidade, permeabilidade, textura e outras. [LAMPRECH *et. al.* 2001; LOPEZ-ALVARADO *et al.,* 1994].

6.1. Goma gelana

É um polissacarídeo solúvel em água, produzido por fermentação de uma cultura pura de *Sphingomonas elodea* (*Pseudomonas elodea*). Os açúcares constituintes da goma gelana são a glicose, o ácido glicurônico e a raminose, na proporção molar de 2:1:1. Como características principais, a goma gelana apresenta formação de gel com quase todos os íons, incluíndo os de hidrogênio. Sua massa molecular é de aproximadamente $0{,}5 \times 10^6$ Da [SANDERSON *et al*., 1989].

Sua hidratação em água fria deionizada pode ser parcial ou totalmente inibida se a goma contiver íons divalentes. A completa hidratação é alcançada com o aquecimento da dispersão a 70°C, ou pela mistura de sal monovalente da goma em água deionizada [GIBSON & SANDERSON, 1997]. A gelificação da goma depende da força iônica e da identidade do cátion. A falta de especificidade entre os cátions alcalinos terrosos diferencia significativamente a goma gelana de outros polissacarídeos, contendo ácidos urônicos como alginato e a pectina, em que se observa afinidade iônica específica [GRASDALEN & SMIDSROD, 1987].

Embora somente a forma desacetilada seja comercial, ambas as gelanas (acetilada e desacetilada) formam géis termorreversíveis, variando em propriedades mecânicas de um gel macio e elástico, para a forma acetilada, a um duro e quebradiço,

quando a forma desacetilada é utilizada [KANG & VEEDER, 1982]. O gel formado é transparente, apresenta alto ponto de fusão e pode ser adicionado em grande quantidade. Pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros produtos para produzir uma ampla variedade de texturas.

A mistura de mais de um hidrocolóide para formação de géis compostos é uma prática comum. A goma gelana é semelhante ao agar e k-carragena, formando géis instáveis e frágeis, porém pode ser usada em combinações com esses agentes gelificantes para melhorar as propriedades, como estabilidade ao calor, para o caso do agar, ou estabilidade ácida, no caso da carragena [SANDERSON *et al.*, 1989].

A goma gelana apresenta capacidade potencial de uso como matriz, cujo objetivo é a liberação controlada tanto para a área farmacológica como alimentícia, em que a ingestão dessa goma não foi relatada como produtora de reações fisiológicas ou efeitos tóxicos em dietas humanas e animais [SANDERSON & CLARK, 1984].

6.2. Pectina

É um polímero natural encontrado na maioria das plantas, derivado das paredes celulares. Esse heteropolissacarídeo é obtido comercialmente por extração aquosa de material péctico de algumas frutas, sendo encontrada em maiores quantidades nas frutas cítricas e em maçãs. Ela consiste, principalmente, de ácido galacturônico, contendo unidades carboxílicas esterificadas do ácido, que formam cadeias lineares interrompidas pela presença do açúcar ramnose a intervalos periódicos, sendo normalmente classificada de acordo com seu grau de esterificação. Usualmente são classificadas em pectinas de baixo e alto teor de esterificação [MAY, 1997], onde o grau de esterificação é a porcentagem de ácidos galacturônicos que são metilesterificados [DZIEZAK, 1991]. Os metil ésteres formados ocupam um espaço similar, mas são mais hidrofóbicos e conseqüentemente têm um efeito diferente na estruturação da água.

A pectina é um poliácido e seu pkA é de cerca de 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 produtos insolúveis [NUSSINOVITCH, 1997].

Geralmente, as pectinas não possuem estruturas exatas, a molécula não adota uma conformação reta em solução, mas ocorre de forma estendida e flexível. Possui boa solubilidade, no entanto necessita ser dispersa em água aquecida com temperatura acima de 60°C [MAY, 1997].

A gelificação da pectina de baixo teor de metilação (BTM) ocorre por meior 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 a formação de macromoléculas agregadas [KOHN, 1975]. Um modelo denominado "egg-box" tem sido sugerido para a formação da rede de gel [REES, 1982] com íons cálcio, sendo induzida da mesma forma que os géis de alginato. Os géis são geralmente formados a concentrações maiores do que 1% e a proporção de cálcio mais usada, de acordo com diversos autores, é de 0,1 a 0,5% do peso do gel, sendo essa formação prejudicada na presença de pH muito ácido. Os géis formados são termoreversíveis, entre pH 3,0 e 4,0. Essa redução pode ocorrer porque dois grupos carboxilados são associados à água antes de os íons cálcio formarem as ligações salinas, fazendo a zona de junção. A força do gel aumenta à medida que eleva-sea concentração de cálcio, mas é reduzida com o aumento da temperatura e da acidez (pH<3). As pectinas BTM (baixo teor de metoxilação) também gelificam na ausência de cálcio pela formação de associações entre cadeias em baixa temperatura (~10ºC) para formarem géis transparentes [KJØNIKSEN, HIORTH & NYSTRÖM, 2004]. As composições e propriedades das pectinas variam com a matéria-prima utilizada nos processos de extração e tratamentos realizados [DZIEZAK, 1991; BEMILLER & WHISTLER, 1996].

As características eletrostáticas e a formação de géis conferem à pectina ótimas propriedades para ser utilizada como material de parede para formação de microcápsulas. Alguns aspectos funcionais da pectina ligados à saúde têm sido estudados por muitos pesquisadores. Ela é hidrolizada no trato intestinal, produzindo

em seguida substâncias não calóricas, interagindo com o colesterol na regulação da homeostase do colesterol hepático e no metabolismo de lipoproteínas [FERNANDEZ *et al.*, 1994], entre outros.

6.3. Alginato

São polímeros lineares de alta massa molar com secções rígidas e regiões flexíveis, formados por monômeros de ácido β-D-manurônico (M) e ácido α-L-gulurônico (G), unidos linearmente por meio de ligações glicosídicas α-1,4, onde existem três tipos de estruturas de blocos: de ácido β-D-manurônico (M), de ácido α-L-gulurônico (G) e uma mistura desses blocos [COTTRELL & KOVACS, 1980]. A composição molecular específica de uma amostra de alginato depende do tipo de alga de que foi extraído e do local de sua produção, podendo ocorrer variações nas porcentagens de ácido manurônico (M) e gulurônico (G) [THIES, 1995]. A composição e a extensão das seqüências, bem como o peso molecular, determinam suas propriedades físicas [GOMBOTZ & WEE, 1998].

A gelificação depende do tipo de cátion, com grande seletividade ao cálcio, atribuídos a sítios de ligação específicos de cálcio com grupos carboxílicos do ácido poligalacturônico, implicado ligações interblocos G pelos íons cálcio. Essa gelificação e a reticulação do polímero, alcançadas principalmente pelas mudanças dos íons sódio dos ácidos gulurônicos por cátions divalentes, formam a agregação desses grupos, dando a característica de uma estrutura “egg-box” [GOMBOTZ & WEE, 1998]. Esse mecanismo de formação do gel do alginato no modelo “caixa de ovos” proposto por GRANT *et al.* [1973], pode ser explicado pelas interações de segmentos G com íons cálcio. As regiões de blocos G são alinhadas lado a lado, resultando na formação de cavidades. Os íons cálcio fazem uma junção entre as cadeias, semelhante ao formato de uma caixa de ovos, formando uma rede tridimensional. A força do gel está diretamente relacionada à quantidade de zonas de junção e à natureza das associações envolvidas nessas zonas.

Na formação de uma matriz de gel na presença de íons cálcio, cátions divalentes de cálcio são unidos a moléculas polianiônicas de alginato, formando uma zona de junção, possibilitando, assim, a formação da rede do gel em temperatura ambiente. A principal vantagem do gel de alginato é sua habilidade em ser termoestável, podendo ser armazenado em temperatura ambiente [ONSOYEN, 1997]. Entretanto, a erosão dos géis de alginato é um problema importante, uma vez que pode ocorrer a aceleração na liberação do material de recheio [SEZER e AKBUGA, 1999].

Algumas propriedades relevantes em géis de alginato de cálcio incluem: rigidez mecânica, aumento de volume, colapso da matriz e resistência a interferentes, como cátions monovalentes, que são altamente dependentes da massa molecular desse polímero, bem como da proporção ácido manurônico e gulurônico e no conteúdo de blocos GG. Alto conteúdo de blocos G e blocos G longos produz géis de alginato com maior reatividade ao cálcio e maior potencial formador do gel, mais rígidos, transparentes e mais quebradiços [SMIDSROD, 1974 *apud* MORRIS 1998, MARTINSEN *et al.*, 1989; ONSOYEN, 1997]. Eles também apresentam maior abertura dos poros e exibem alta taxa de liberação para proteínas, que podem estar relacionadas à baixa retração desse tipo de gel, ou à diferença na barreira de difusão na superfície das esferas [MARTISEN *et al.*, 1992]. Em oposição, observação experimental por OSTBERG & GRAFFNER [1994] apontaram para uma redução na taxa de liberação, através da matriz.

Segundo GOMBOTZ & WEE [1998], o alginato possui propriedades interessantes que incluem o comportamento relativamente inerte em ambientes aquosos dentro da matriz e dissolução e biodegradação do sistema em condições fisiológicas normais.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA - SISTEMAS MODELOS

RESUMO

O presente estudo teve o objetivo de comparar o comportamento de liberação de micropartículas, obtidas por gelificação iônica, a partir dos polissacarídeos: pectina e a mistura ternária: pectina/gelana/alginato, contendo compostos hidrofílicos (glicose e isolado protéico de soro de leite) envolvendo uma mistura lipídica, composta por gordura de peixe e ácido esteárico, incorporados na forma de micropartículas lipídicas ou na forma de uma emulsão. Na primeira forma, micropartículas lipídicas contendo os compostos hidrofílicos foram produzidas pela técnica de *spray cooling*, por meio de um planejamento experimental, e incorporados como conteúdo nas micropartículas obtidas por gelificação iônica. Na segunda, os compostos e a mistura lipídica foram adicionados à solução polissacarídica, emulsionados conjuntamente, e a emulsão geleificada também por gelificação iônica. Todas as micropartículas foram caracterizadas em relação à eficiência de encapsulação, eficiência de inclusão, hidratação, tamanho médio e sua distribuição, morfologia e composição centesimal. O planejamento experimental possibilitou a otimização do processo de produção de micropartículas lipídicas, resultando em uma proporção ótima de 70/30, para gordura de peixe e ácido esteárico, respectivamente, e concentrações de soluções de 65% para glicose e 40% para proteína. A eficiência de encapsulação (EE) apresentou uma ampla faixa de variação, com valores de 1 a 68% e de 4 a 74%, para os sistemas pectina e a mistura ternária, respectivamente. Os valores para a eficiência de inclusão (IE) variaram de 57 a 100%, para o sistema polimérico com pectina e de 63 a 99% para a mistura ternária, onde os menores valores observados foram para os sistemas contendo glicose incorporada em micropartículas lipídicas. As micropartículas gelificadas apresentaram um diâmetro

médio, cerca de três vezes maior que as micropartículas lipídicas (50µm), com maioria de tamanho entre 100 e 200µm. A hidratação ocorreu de forma instântanea, após contato com a água, com expansão do volume de até 4 vezes, caracterizando a grande quantidade de água retida nesse tipo de matriz. A morfologia revelou micropartículas com forma esférica, em sua maioria, matriz multinucleada, com distribuição uniforme dos compostos, exceto para as micropartículas de gel, contendo micropartículas lipídicas. Uma superfície lisa, sem fissuras foi observada para as micropartículas de gel preparadas na forma de emulsão. O comportamento de liberação das micropartículas lipídicas contendo glicose foi de 20% e 50%, após 30 e 240 minutos, respectivamente, enquanto que a liberação de proteína foi de 60% de liberação, nos primeiros 30 minutos, mantendo-se constante ao longo do tempo. As micropartículas de gel revelaram que os sistemas preparados na forma de emulsão lipídica apresentaram uma liberação significativamente menor ($p<0,05$) de proteína que os sistemas contendo micropartículas lipídicas, sendo os sistemas compostos por pectina/gelana/alginato os que apresentaram a menor liberação observada (~5%).

Pelos resultados obtidos, observou-se que a maneira de introdução da gordura pode influenciar fortemente o comportamento de liberação de matrizes polissacarídicas produzidas por gelificação iônica. Da mesma maneira, a quantidade de polissacarídeos, de íons e de recheio utilizados, nas micropartículas também pode determinar diferentes eficiências de encapsulação e diferentes perfis de liberação.

Palavras-chaves: Micropartículas lipídicas, gelificação iônica, perfil de liberação, compostos hidrofílicos, gordura de peixe.

ABSTRACT

The aim of this research was compare the release behaviour of microparticles produced by ionic gelation using pectin or one ternary mixture of polysaccharides: pectin, gelllan and alginate, encapsulating lipidic microparticles or one emulsion containing the same lipidic material, the polysaccharide(s) and hydrophilic compounds (glucose or whey protein isolate) as aqueous solutions. Lipidic microparticles with glucose or WPI were first produced using spray cooling.

In both cases one experimental design was used to investigate the best conditions with respect to the release behaviour of the core materials. All particles were characterized considering inclusion efficiency, encapsulation efficiency, hydration capacity, average size and size distribution, morphology and composition. For the lipidic microparticles, the results of the experimental design showed the following best conditions: 70/30 fish fat :stearic acid mixture and concentrations of 65% glucose and 40% for WPI solutions. The encapsulation efficiency range was very large: from 1.2 to 67.8% and from 3.7 to 74.7 for pectin and ternary mixture respectively. The inclusion efficiency range was 57.1 – 100% when pectin was used and 62.8 – 98.5 for ternary mixture. The lower values were obtained when glucose solutions were used inside lipidic microparticles compared to the emulsified particles. The average diameter obtained for gel emulsified microparticles (100 – 200 µm) were around three times larger than lipidic microparticles (50 µm). Hydration obtained by the dry particles was instantaneous and the sweeling observed was around four times the size of the dry particles.

Microparticles showed round shape, multinucleated and uniform core distribution when emulsified particles were produced. On the other side distribution of the lipidic microparticles were not homogeneous inside gel particles. The glucose release from lipidic microparticles was 20 and 50% after 30 and 240 min, respectively, and 60% for WPI after 30 min of release. Emulsified systems showed a much better release control, specially when ternary mixture was used (~5% of release).

The way used to introduce the fat material inside the particles was very important with respect to modulate the release behaviour. In the same way, the amount of core

and the ionic concentration and polysaccharide concentration were also important to get high encapsulation efficiency and acepatable release profiles.

Keywords: lipidic microparticles, ionic gelation, release profiles, hydrophilic compounds, fish lipid

1. INTRODUÇÃO

A falta de uma parede distinta e contínua ao redor das micropartículas produzidas por gelificação iônica, representadas por uma matriz de gel porosa, resulta baixa eficiência de retenção de compostos solúveis em água e baixa massa molar. Diversas estratégias têm sido empregadas para melhorar as características de liberação desses compostos, como o uso de micropartículas lipídicas ou emulsões para retenção dos componentes hidrossolúveis, com resultados promissores na encapsulação de aminoácidos, vitaminas, peptídeos, sais etc. [BUCHAL & LANGDON, 1998; CHU & OZKIZILCIK, 1996; MUKAI-CORRÊA *et al.,* 2004; ONAL & LANGDON, 2004; ONAL & LANGDON, 2005].

Micropartículas lipídicas podem ser preparadas utilizando técnicas por evaporação de solvente e por fusão dos lipídeos, em que uma solução de material de recheio é incorporada no lipídeo fundido e, em geral, emulsificada podendo-se dispersar a pré-emulsão em uma fase aquosa. As micropartículas são formadas pela solidificação, por congelamento das gotas de lipídeo fundido ou evaporação do solvente a partir da fase lipídica [CORTESI *et al.*, 2002]. O método conhecido como *spray chilling* (pulverização a frio) é fácil, com possibilidade de produção em escala industrial [WESTESEN *et al.*, 1997]. As micropartículas são formadas pela atomização das gotas lipídicas fundidas e emulsificadas conjuntamente com o material de recheio, que são solidificadas pelo ar frio ou $N_{2,}$ sendo muito interessante, pois não há a necessidade de uma fase aquosa ou solvente orgânico, o que pode melhorar a incorporação de compostos a serem encapsulados [ÖNAL & LANGDON 2004]. Além disso, o tamanho da gota pode ser controlado pelas condições de atomização. A técnica tem sido utilizada para preparar formulações com liberação controlada, aumentar a estabilidade das partículas [SCHWENDEMAN *et al.*, 1998] e veicular nutrientes específicos, como vitaminas [ONAL & LANGDON, 2004] e alguns aminoácidos [ONAL & LANGDON, 2005].

Como fontes de lipídeos incluem-se os mono, di e triglicerídeos, ceras, ácidos graxos, fosfolipídios ou suas misturas que possuem habilidade para formar uma variedade de sistemas como: emulsões, lipossomas e macro e micropartículas sólidas

[REITHMEIER *et al.,* 2001]. No entanto, a eficiência de encapsulação e a liberação desses compostos são influenciadas pela mistura lipídica e o modo de preparo utilizado na produção das micropartículas [BUCHAL &LANGDON, 1998; ALVIM, 2005]. A adição de emulsificantes também é freqüentemente utilizada no processo de produção desse tipo de micropartícula, podendo afetar consideravelmente a estabilidade e características físicas das emulsões lipídicas, bem como a produção de micropartículas lipídicas [SIEKMANN, 1992].

Os lipídeos com baixo ponto de fusão são os mais indicados para produzir micropartículas lipídicas como dieta para larvas de peixes, pois podem apresentar baixas taxas de liberação de nutrientes solúveis em água, apresentar melhor digestibilidade e grande facilidade para emulsificação se comparados aos lipídeos de alto ponto de fusão e com longas cadeias saturadas [ÖNAL e LANGDON, 2001]. A utilização desse tipo de lipídeos também confere maior maciez às micropartículas formadas, podendo reduzir a necessidade de a larva quebrar enzimaticamente essa micropartícula, em que a liberação do seu conteúdo ocorrerá por processos físicos digestivos ou por simples difusão [ONAL e LANGDON, 2004; 2005].

Desse modo, uma matriz macia com liberação controlada pode permitir o carreareamento de nutrientes solúveis e de baixa massa molar. Por outro lado, as micropartículas poliméricas podem ser usadas para carrear macronutrientes (proteínas, lipídeos e carboidratos). Aliando as características dos dois tipos de micropartículas, complexos micropartículados podem ser formados [CHU & OZKIZILCIK, 1996, ONAL e LANGDON, 2005] e podem ser capazes de propiciar uma dieta nutricionalmente completa para larvas de peixe.

Esse trabalho teve o objetivo de investigar a produção de micropartículas obtidas por gelificação iônica, usando como sistemas modelos: inclusão da mistura lipídica na forma de micropartículas lipídicas ou emulsão. Micropartículas lipídicas foram produzidas a partir de mistura lipídica, composta por gordura de peixe e ácido esteárico, contendo compostos hidrofílicos de baixa massa molar. Comportamento de liberação individual ao longo do tempo, da glicose e do isolado protéico de soro de leite, foram

acompanhados nas micropartículas lipídicas e nos complexos micropartículados, conjuntamente com a eficiência de encapsulação, inclusão e de produção das micropartículas. Todos os tipos de micropartículas foram caracterizados em relação à morfologia, capacidade de reidratação e tamanho médio e sua distribuição.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais

Ácido esteárico (ácido graxo saturado, ponto de fusão =69,6°C, Vetec, São Paulo); alginato de sódio DMB (alto peso molecular, alto conteúdo de grupos guluronato, lote 500771, ref. 669990 – MANUGEL); goma gelana (alto peso molecular, lote 9L0020A – Nutrasweet Kelco/Monsanto, São Paulo) cloreto de cálcio dihidratado - CaCl2. $2H_2O$ (lote 64271, Merck); D - glicose anidra (P.A., Synth), isolado protéico de soro de leite (Newzeland, 96% de proteína); pectina cítrica de baixo teor de metoxilação (BTM) amidada tipo 8002/R (grau de metoxilação de 26-30%, grau de amidação de 15 a 21%, lote 11655, ref. 119900 - Citrus Colloids S/A, doada pela Ind. Braspectina S A, Limeira); gordura extraída de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*); monoestearato de sobitana (S60, Dhaytan, São Paulo); triestearato de sorbitana (TS60 Dhaytan, cedido pela Dhaymers, São Paulo); poliglicerol polirricinoleato (PGPR- Dhaytan); kit enzimático-colorimétrico para determinação de glicose (lote, 434 –LABORLAB); isotiocianato de fluoresceína - FITC (lote 90k5316, Sigma); Nile Red (lote 47H3445, Sigma).

2.2. Produção das micropartículas lipídicas (LMs)

2.2.1 Ensaios preliminares

Para obter micropartículas lipídicas sólidas, com ponto de fusão entre 35 e 40°C, que suportassem as condições de preparo das micropartículas de gel e também apresentasse uma matriz relativamente macia em temperatura ambiente (25°C), foi estudado preliminarmente o ponto de fusão da mistura lipídica: gordura de peixe (obtida, conforme descrito no capítulo 3, item 2.1.1.) e ácido esteárico, em três proporções diferentes: 9:1, 8:2 e 7:3g (p/p), respectivamente. O ponto de fusão foi determinado pelo aquecimento das misturas lipídicas em banho-maria, em temperaturas crescentes, entre 25 e 50°C, com observação visual do material, após 15

minutos de imersão, com classificação de sólido ou líquido, sendo o último considerado uma estimativa do ponto de fusão.

2.2.2 Preparo das micropartículas lípidicas

A produção das micropartículas lipídicas foi feita pelo aquecimento (60°C) e homogeneização (ultraturrax Ika - 10.000 rpm/1 min) de uma mistura lipídica composta por gordura de peixe e ácido esteárico (4:1 p/p), tensoativos monoestearato/triestearato de sorbitana (1:1 p/p, representando 5% do peso total de lipídeos) e dos compostos hidrofílicos em soluções individuais de glicose ou isolado protéico de soro de leite (40% p/v), nas concentrações definidas para cada ensaio do planejamento experimental da Tabela 4. As emulsões foram pulverizadas por meio de um atomizador de duplo fluido de *spray-dryer* (BUCHI, Switzerland) aquecido a 70°C e com pressão de ar de 0,5 kgf cm^2, em uma câmara fria (10°C), dentro de uma câmara coletora de alumínio (Figura 2), para que ocorresse uma rápida solidificação das micropartículas, causado pela queda brusca de temperatura da solução lipídica ao sair do atomizador. O material resultante foi armazenado em ambiente frio (8°C) para posteriores análises de eficiência de encapsulação e comportamento de liberação em sistema aquoso. Após análise dos resultados dos ensaios, um tratamento foi escolhido em cada planejamento (glicose e isolado protéico) experimental e caracterizado em relação à composição, tamanho médio e distribuição, morfologia, eficiência de encapsulação e liberação em sistema aquoso.

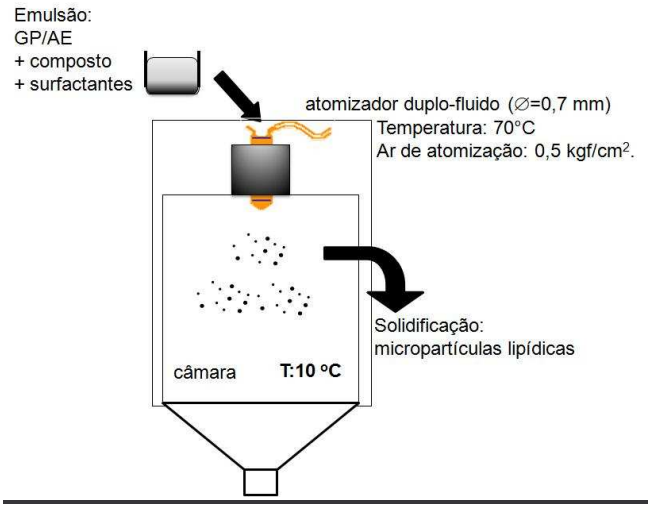


Figura 2. Esquema ilustrativo do equipamento para produção das micropartículas lipídicas. GP/AE – gordura de peixe/ ácido esteárico.

2.2.3 Otimização do processo

Para otimizar o processo de produção das micropartículas lipídicas contendo glicose ou isolado protéico de soro de leite (WPI) foram realizados 2 planejamentos experimentais 2^2, com 2 níveis (-1,+1) e com três repetições no ponto central (0) para cada tratamento, conforme ilustrado na Tabela 4. Foi avaliada a influência da concentração da solução de glicose e de WPI, a proporção de lipídeo/glicose e lipideo/WPI na eficiência de encapsulação e suas liberações após 1 hora em sistema aquoso. Como constante do processo, fixou-se a concentração de tensoativos (5% em relação ao peso total de lipídeos, segundo estudos conduzidos por MAGEE e OLSON, 1981).

Tabela 4. Variáveis e níveis estudados para otimização do processo de produção de micropartículas lipídicas contendo glicose ou isolado protéico de soro de leite (fatorial completo)

	Variáveis estudadas	Níveis*		
		- 1	**0**	**+1**
Planejamento glicose	Concentração da solução de glicose (%)	50	65	80
	Proporção de glicose/lipídeo	20/80	30/70	40/60
Planejamento WPI	Concentração da solução de WPI (%)	8	24	40
	Proporção de WPI/gordura	10/90	20/80	30/70

*A seleção dos valores reais extremos das variáveis foi feita por meio de *screening* dessas variáveis em ensaios preliminares, com o cuidado de que a mistura resultasse em micro partículas após pulverização.

2.3. Produção das micropartículas de gel contendo micropartículas lipídicas (MPLs) ou emulsão (EM)

As micropartículas de gel foram produzidas pela técnica de gelificação iônica, utilizando soluções aquosas de pectina PE (2% p/p) ou de mistura ternária composta por pectina/gelana/alginato - PEGEAL (1:1:1; 2% p/p) e íons cálcio (2% p/p), para formação da matriz de gel, conforme proposto por MUKAI-CORRÊA *et al*. [2004], com adaptações. A pressão de trabalho utilizada para pulverização da solução polimérica foi de 0,25 kgf/ cm^2. A Figura 3 ilustra o procedimento de preparo das micropartículas.

Como conteúdo dessas micropartículas, foram utilizados dois sistemas modelos em que as formulações utilizadas para formação das micropartículas lipídicas, constituídas pela mistura lipídica de gordura de peixe e ácido esteárico (4:1 p/p, respectivamente), tensoativos (5% do peso total de lipídeos) e os compostos isolado protéico de soro de leite (12g/100g de solução) ou glicose (19,5g/100g de solução), foram incorporadas na forma de micropartículas lipídicas ou na forma de emulsão do tipo óleo em água.

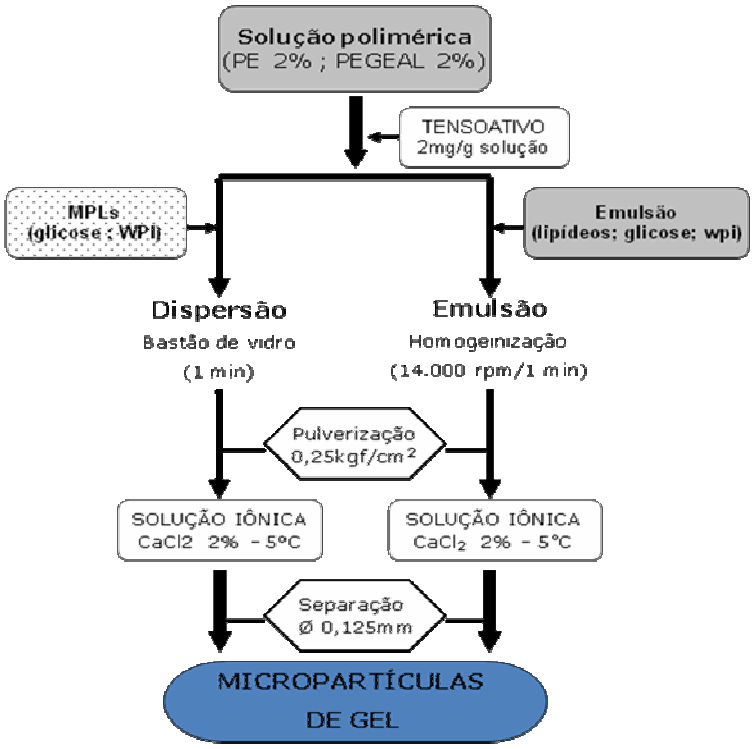


Figura 3. Fluxograma da produção de micropartículas de gel contendo como recheio emulsão lipídica ou micropartículas lipídicas (MPLs) com glicose ou proteína (WPI).

O sistema modelo, utilizando como conteúdo as micropartículas lipídicas, foi preparado pela adição prévia do surfactante poliglicerol polirricinoleato (PGPR, Dhaythan) na quantidade de 2mg/g de solução polimérica, para auxiliar a dispersão das micropartículas lipídicas (MPLs). A solução foi homogeneizada em ultraturrax (IKA – 14.000 rpm/1 min) em temperatura ambiente (25 ± 2°C), seguida de adição das MPLs (30 mg/g de solução), que foram dispersas com ajuda de um bastão de vidro, e a dispersão resultante pulverizada em solução iônica ($CaCL_2$) gelada (5°C).

O sistema modelo, contendo os compostos na forma de emulsão, foi preparado pela mistura dos lipídeos fundidos a 65°C (contendo os tensoativos monoestearato-S60 e triestearato de sorbitana-TS60, 1:1 p/p, representando 5% do peso total de lipídeos), a solução polimérica (com adição do surfactante PGPR) e os compostos hidrofílicos (glicose ou WPI), em mesma proporção usada no sistema modelo composto

pelas micropartículas lipídicas. A mistura foi homogeinizada (14.000 rpm/1 min/65°C) e pulverizada em solução iônica ($CaCL_2$) gelada (5°C) para enrijecimento da blenda lipídica. Parte das micropartículas poliméricas produzidas foi preservada em seu estado hidratado para análises da eficiência de processo e de encapsulação, comportamento de liberação, morfologia e tamanho médio e sua distribuição.

2.4. Secagem das micropartículas de gel

Após a produção, as micropartículas de gel fabricadas pelos dois diferentes processos foram separadas em peneira (ABNT 30- malha 0,125mm), lavadas com água destilada e 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 da secagem foi estabelecido na temperatura final de 25°C por 2 horas (ciclo completo de 48 horas). O material seco foi peneirado, acondicionado em frascos com tampa e mantidos em refrigeração.

2.5. Caracterização físico-química

2.5.1 Distribuição de tamanho e diâmetro médio

O tamanho das micropartículas foi determinado por microscopia óptica, com captação de imagens por câmera digital, usando objetiva 12,5X e optovar 1,25X e a utilização do programa Global Lab Image e Scion Image (www.scioncorp.com). A medida foi feita em 300 micropartículas de cada amostra. A captação das imagens foi feita em óleo para micropartículas secas e em água para as micropartículas hidratadas.

2.5.2 Morfologia e microestrutura

A morfologia das micropartículas foi observada por microscópio ótico (NIKON, Eclipse E800, Japão), utilizando-se objetivas de 10X e 20X, e captação de imagens com o *software* Image Pro Plus 4.0 (Media Cibernetics, EUA).

A microestrutura das micropartículas lipídicas e de gel liofilizada foi observada em microscópio eletrônico de varredura (SEM) Jeol (JMS T300, Japão), nas voltagens de 5kV e 10 kV, respectivamente. As amostras foram fixadas em "*stubs*" e recobertas com uma fina camada de ouro (40mA/150s) por meio de um evaporador Baltzer (Baltec SCD50, Áustria).

A observação dos compostos hidrofóbicos (lipídeos) e hidrofílicos (proteínas) nas micropartículas foi feita por microscópio de varredura laser Confocal (CLSM) Olympus (LSM-Fluoview 3.2 version). O corante FITC foi usado para caracterização das de proteínas [LAMPRECH *et al.,* 2000] e o *Nile red* na caracterização dos grupos hidrofóbicos [BERTSCH, 2003], produzindo compostos fluorescentes. A proteína foi corada com FITC a 40^{o}C/1hora (1mg/mL para cada 2,5g de proteína) e os compostos hidrofóbicos corados com *Nile red* (1mg/30g de composto hidrofóbico). Depois da reação com os corantes, as micropartículas foram preparadas da mesma forma descrita no item 2.3.

2.5.3 Capacidade de hidratação

A hidratação foi acompanhada pela captação de imagens, em microscópio óptico, da partícula de gel seca e hidratada (após 5 minutos de contato com a água), comparando-se os diâmetros das partículas hidratadas em relação aos diâmetros iniciais.

2.5.4 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (E.E) foi calculada pela diferença entre a quantidade de proteína ou glicose presente nas micropartículas após sua produção e a quantidade inicial adicionada na solução ou emulsão formadora das micropartículas, sendo expressa em porcentagem (%). A determinação da glicose foi feita por método colorimétrico enzimático (espectrofotômetro, 505nm), de acordo com HENRY *et al.*

[1974], e a proteína, de acordo com KJELDAHL [A.O.A.C., 1998]. A E.E. foi calculada para cada ensaio do planejamento experimental, sendo realizada em triplicata.

2.5.4.1 Eficiência de encapsulação das micropartículas contendo glicose

As micropartículas lipídicas (0,1g) foram adicionadas em água destilada (5mL), aquecidas em banho maria (70°C) por 15 minutos para liquefação da mistura lipídica, seguidas de agitação em agitador de tubos por 5 segundos, e resfriamento à temperatura ambiente. O teor de glicose foi determinado na fração aquosa da solução, através do método enzimático (glicose oxidase), e construção de curva-padrão com a mesma glicose utilizada nas micropartículas.

Para as micropartículas de gel contendo a glicose na forma de emulsão ou em micropartículas lipídicas usou-se previamente uma solução de EDTA 0,1M (15mg de partículas/mL de solução) para desestabilização da matriz de gel, sendo mantidas por 30 minutos em agitador rotativo de tubos Phoenix (AP22) e, em seguida, aquecidas, conforme o procedimento descrito anteriormente, determinando-se a glicose presente na fração aquosa filtrada (papel Whatman n°1).

Para verificação de possíveis interferências na reação colorimétrica, foi testada uma solução de EDTA contendo glicose livre, em quantidade conhecida, e em micropartículas de gel contendo apenas lipídeos (brancos).

2.5.4.2 Eficiência de encapsulação das micropartículas contendo proteína

A medida da quantidade de proteína presente tanto nas micropartículas lipídicas como de gel foi feita por KJELDAHL (fator de correção: 6,25), utilizando, como branco, micropartículas produzidas sem adição de proteínas.

2.5.5 Eficiência de Inclusão

A Eficiência de Inclusão (IE) foi expressa pela porcentagem (p/p) de mistura lipídica adicionada no preparo das micropartículas de gel e que foi incorporada à

micropartícula após a sua produção. A quantidade de gordura presente foi determinada por BLIGH & DYER [1959].

2.5.6 Perfis de liberação

As micropartículas lipídicas contendo glicose ou proteína foram colocadas em tubos com tampa rosqueável, na concentração 10mg/mL de água destilada, e as micropartículas de gel, na concentração de 15mg/mL e 150mg/mL de água destilada, para partículas úmidas e secas, respectivamente.

A liberação desses compostos (glicose ou proteína) foi acompanhada durante um período de 1 hora, para todos os ensaios do planejamento experimental das micropartículas lipídicas contendo glicose ou proteína, em intervalos de até 4 horas (aos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos, com tubos individuais) para os ensaios que apresentaram a melhor relação, entre a eficiência de encapsulação e o perfil de liberação. O perfil de liberação em água, foi acompanhado durante 4 horas para todas as micropartículas de gel úmidas e secas. As amostras foram agitadas em agitador rotativo de tubos Phoenix (AP22), nos períodos estabelecidos, sendo determinada a proteína (Kjeldahl, fator de correção: 6,25) ou glicose (método enzimático - glicose oxidase) presente em solução. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

2.6. Análise estatística

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção das micropartículas lipídicas (MPLs)

Como mostra a Tabela 5, a mistura de gordura de peixe (GP) e ácido esteárico (AE), que levou a menor proporção do ácido graxo (9:1), apresentou-se liquefeita na temperatura de 35°C, enquanto a mistura com maior quantidade de ácido esteárico (7:3) manteve-se sólida até a temperatura de 45°C, apresentando um aspecto mais rígido que as outras misturas, conforme característica desse ácido graxo. Com o aumento da quantidade de gordura de peixe na mistura lipídica, houve diminuição dessa rigidez e do ponto de fusão da mistura. A mistura de gordura de peixe e ácido esteárico, na proporção de 8:2, respectivamente, resultou em um ponto de fusão aproximado de 40°C, com produção e obtenção de micropartículas lipídicas sólidas em temperatura ambiente, sem adesão e aglomeração das micropartículas dentro da câmara de produção, após a sua produção. Baseando-se nessas observações, a proporção de 8:2 (GP:AE) foi escolhida para produção das micropartículas lipídicas.

Tabela 5. Ponto de fusão das misturas de gordura de peixe (GP) e ácido esteárico (AE).

GP: AE (%)	Temperatura (°C)				
	25	35	40	45	50
7:3	S	S	S	S	**L**
8:2	S	S	**L**	**L**	**L**
9:1	S	**L**	**L**	**L**	**L**

S= Sólido; L= liquido

O baixo ponto de fusão apresentado por essa blenda lipídica forma partículas macias e esses lipídeos também podem apresentar melhor digestibilidade para as larvas de peixe, com características funcionais de formar com facilidade emulsões, de acordo com ÖNAL e LANGDON [2004]. FONTAGNE *et al.* [1999] observaram uma

eficiência de digestão de 75,4%, para carpa comum (*Cyprinus carpio*), quando utilizaram óleo de peixe hidrogenado com ponto de fusão de 38°C, com diminuição da digestibilidade quando o ponto de fusão foi aumentado. Outros estudos, envolvendo a produção de micropartículas para alimentação de larvas de peixes marinhos, conduzidos por BUCHAL & LANGDON [1998] mostraram que o perfil da mistura lipídica teve influência na eficiência de encapsulação e no perfil de liberação de compostos hidrossolúveis, como vitaminas e peptídeos. Os autores também observaram que a dureza das partículas de gordura interferiu na ação digestiva e na absorção dos nutrientes encapsulados, indicando que partículas menos rígidas (com baixo ponto de fusão) são mais adequadas para alimentação das larvas.

3.1.1 Otimização do processo

Os planejamentos experimentais apresentados nas Tabelas 6 e 7 mostram as condições estudadas para produção das micropartículas lipídicas. Foi observado que todos os ensaios conduzidos, conforme os planejamentos experimentais, utilizando como recheio os compostos hidrofílicos glicose e proteína, produziram micropartículas lipídicas. As respostas obtidas de E.E. e liberação, após 60 minutos em meio aquoso, mostram altos valores de eficiência de encapsulação, tanto para as micropartículas lipídicas contendo glicose (Tabela 6) como daquelas contendo proteína (Tabela 7), com ampla variação dos valores de liberação. A alta eficiência observada pode estar associada à técnica de atomização a frio utilizada para produzir as micropartículas sólidas à temperatura ambiente, que evitou a perda do material de recheio durante o processo de produção.

Também foi observado que o aumento da concentração de proteína em solução produziu um acréscimo na eficiência de retenção. O comportamento sobre a retenção, causado pela proporção de material lipídico e concentração de recheio em solução, parece estar associado à estabilidade das emulsões formadas, a partir das diferentes proporções, entre o material lipídico e o recheio, podendo influenciar a distribuição e a liberação do recheio a partir da matriz. Altos valores de eficiência de encapsulação (80-

90%) foram observados por MAGEE & OLSON [1981], quando uma solução de glicose foi encapsulada em matrizes lipídicas, utilizando blenda de emulsificantes de monoestearato e triestearato de sorbitana para estabilização da emulsão água em óleo.

Tabela 6. Planejamento experimental (variáveis numéricas e codificadas) e respostas de eficiência de encapsulação (E.E) e liberação em 60 minutos (LIB60'), para avaliação da produção de micropartículas lipídicas contendo glicose.

	Variáveis *		Respostas	
Ensaio	**Glicose (%)**	**Lipídeo/Glicose (%)**	**E.E. (%)**	**LIB60'(%)**
1	80(+1)	40/60 (+1)	93,89	65,25
2	80(+1)	20/80 (-1)	97,85	41,11
3	50(-1)	40/60 (+1)	98,43	33,53
4	50(-1)	20/80 (-1)	100,00	26,75
5	65(0)	30/70 (0)	97,55	13,70
6	65(0)	30/70 (0)	96,10	15,57
7	65(0)	30/70 (0)	96,10	11,69

* Os números entre parênteses representam as variáveis codificadas.

O planejamento, envolvendo a produção de micropartículas contendo glicose, apresentou as menores liberações para os ensaios 5, 6 e 7, pontos centrais do experimento, constituídos de uma proporção de lipídeos/glicose de 30/70 e concentração de solução de glicose de 65%, apresentando 13,7 %, 15,6 % e 11,7 % de glicose liberada, respectivamente (Tabela 6). Esses ensaios apresentaram maior concentração de glicose encapsulada, após permanecerem em sistema aquoso, durante o período estudado. As maiores liberações de glicose observadas foram representadas pelos ensaios 1 e 2, quando se utilizou a solução mais concentrada

(80%), para produção das micropartículas, com valores de 65,2% e 41,1%, respectivamente.

No planejamento experimental para produção das micropartículas lipídicas contendo proteína, as menores liberações foram observadas nos ensaios 2 e 4 (Tabela 7), com 22,1% e 28,5% de proteína liberada, respectivamente, quando se utilizou a menor proporção de proteína em relação ao lipídeo (10:90). Os ensaios 5, 6 e 7 (pontos centrais) apresentaram as maiores liberações, 76,5%, 87,0% e 87,5%, respectivamente, em que a proporção de lipídeo/proteína utilizada foi de 20/80, com solução de proteína 24%. Altos valores de liberação também foram observados para o ensaio 1, que foi constituído da maior proporção e concentração de proteína se comparado aos demais ensaios. Esse ensaio também apresentou a maior quantidade de proteína remanescente encapsulada, após o período de liberação estudado.

Tabela 7. Planejamento experimental (variáveis numéricas e codificadas) e respostas de eficiência de encapsulação (E.E) e liberação em 60 minutos (LIB60'), para avaliação da produção de micropartículas lipídicas contendo proteína.

Variáveis *			Respostas	
Ensaio	**Proteína (%)**	**Lipídeo/Proteína (%)**	**E.E. (%)**	**LIB60'(%)**
1	40(+1)	30/70 (+1)	100,00	59,11
2	40(+1)	10/90 (-1)	81,99	22,08
3	8 (-1)	30/70 (+1)	87,20	44,36
4	8 (-1)	10/90 (-1)	94,41	28,50
5	24 (0)	20/80 (0)	97,23	76,48
6	24 (0)	20/80 (0)	93,13	86,97
7	24 (0)	20/80 (0)	93,49	87,51

*Os números entre parênteses representam as variáveis codificadas.

As análises dos efeitos dos fatores E.E, liberação, e a importância relativa desses efeitos, representadas graficamente, por meio de gráficos de Pareto, podem ser observadas nas Figuras 3 e 4. Para a resposta EE da glicose, a Figura 4 mostra que somente a variável proporção entre a mistura lipídica e a solução de glicose apresentou efeito significativo ($p<0,05$). Analisando a mesma resposta, nas micropartículas com proteína observa-se que todas as variáveis (concentração da solução de proteína, proporção entre mistura lipídica e solução de proteína, e a interação entre essas duas variáveis) apresentaram efeitos significativos ($p<0,05$) sobre a resposta de E.E.

A análise na resposta de liberação, obtida para os tratamentos com glicose e proteína, mostra que os efeitos foram significativos ($p<0,05$) para ambas as variáveis: proporção de lipídeo/composto e concentração de composto em solução (Figura 4 e 5). Já a interação entre as variáveis foi significativa somente para os ensaios com proteína.

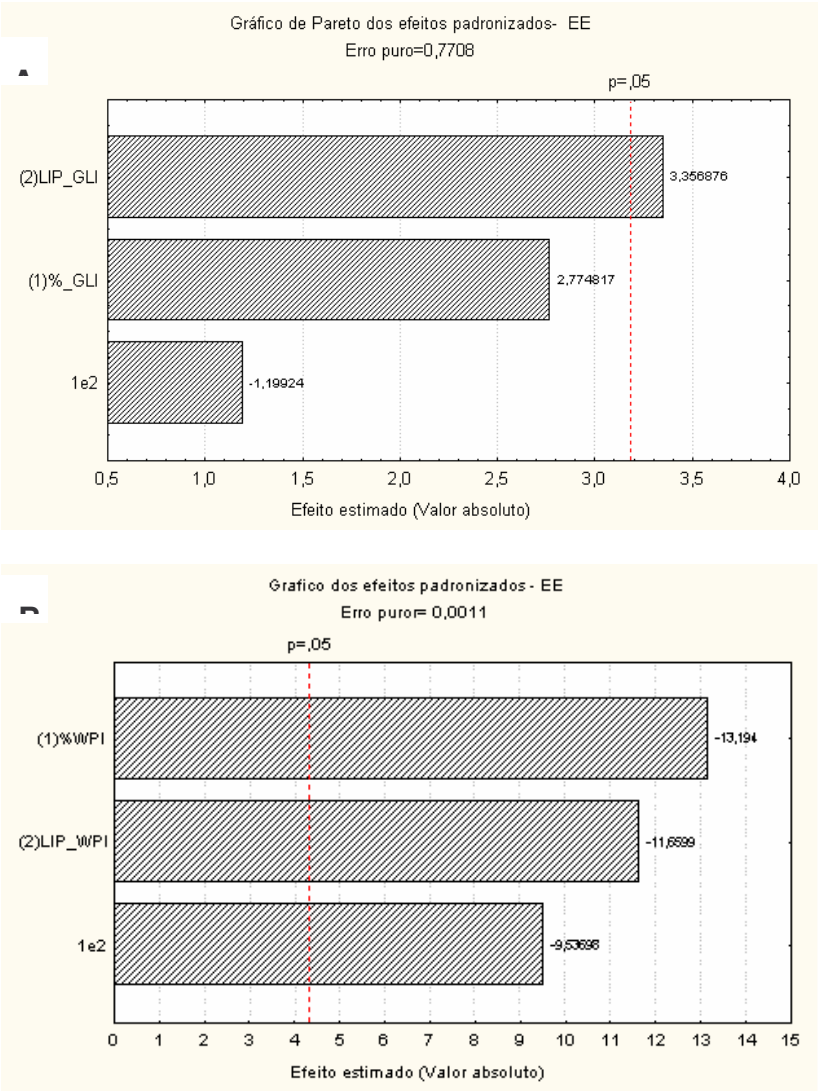


Figura 4. Gráficos de Pareto com valores estimados dos efeitos padronizados e suas interações para as variáveis estudadas sobre a eficiência de encapsulação (EE) na produção das micropartículas lipídicas, ao nível de 95% de confiança (p=0,05). A – micropartículas contendo glicose; B – micropartículas contendo proteína; %GLI – concentração da solução de glicose; LIP_GLI – proporção de lipídeo e glicose; %WPI – concentração da solução de proteína; LIP_WPI – proporção de lipídeo e proteína.

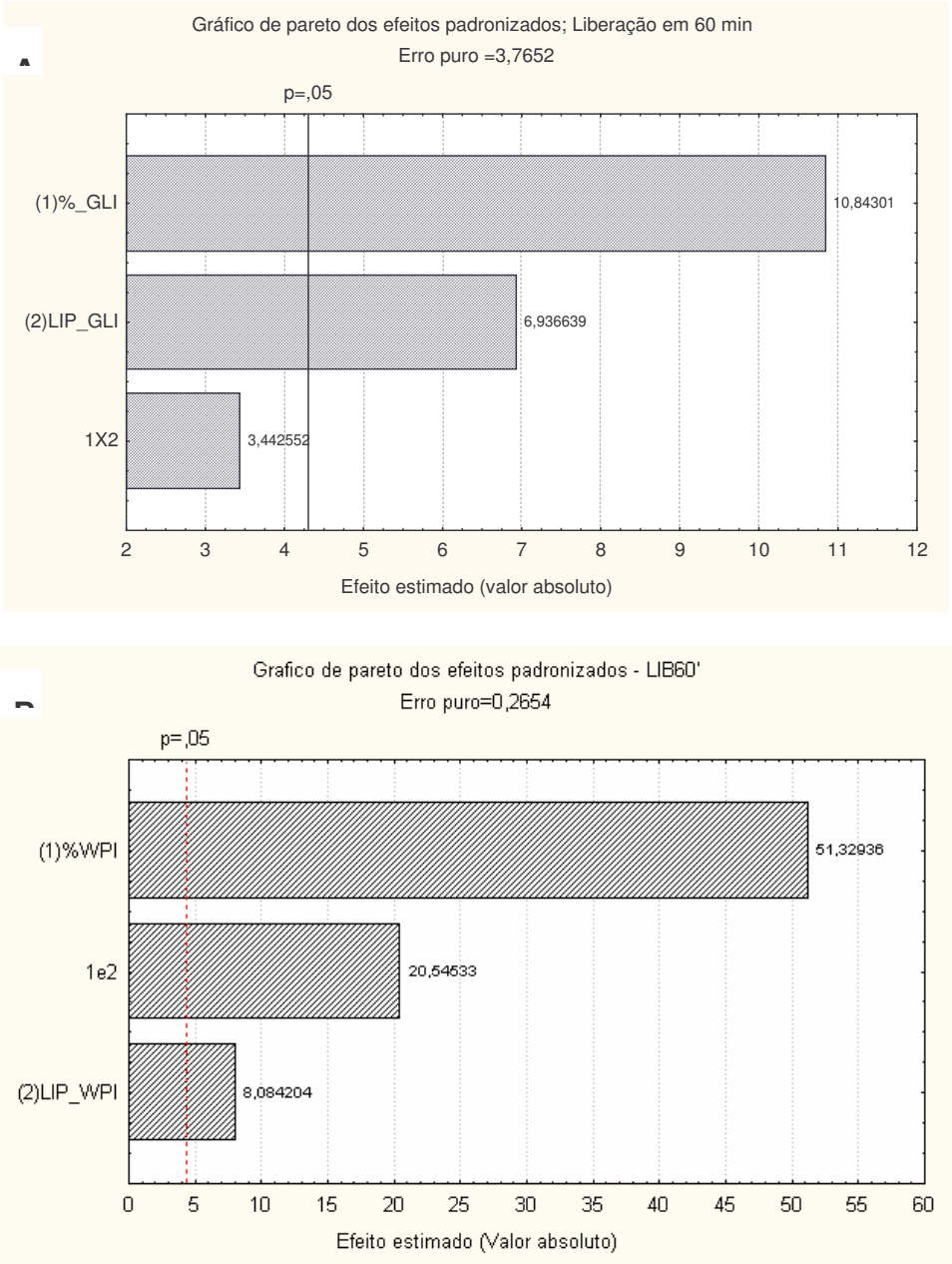


Figura 5. Gráficos de Pareto com valores estimados dos efeitos padronizados e suas interações para as variáveis estudadas sobre a liberação de glicose após 60 minutos de experimento (LIB60'), ao nível de 95% de confiança (p=0,05). A – micropartículas contendo glicose; B – micropartículas contendo proteína; %GLI – concentração da solução de glicose; LIP_GLI – proporção de lipídeo e glicose; %WPI - concentração da solução de proteína; LPI_WPI - proporção de lipídeo e proteína.

Os resultados obtidos dos ensaios com glicose mostram que as condições utilizadas no ponto central do planejamento (ensaios 5, 6, e 7) são satisfatórias como método de produção das micropartículas lipídicas, contendo glicose, pois apresentam baixa liberação e maior concentração de glicose encapsulada após permanecerem em sistema aquoso por 60 minutos. Para os ensaios com proteína, o ensaio 1, apesar de não apresentar uma baixa liberação, foi o que manteve a maior quantidade de proteína remanescente encapsulada após o período de liberação estudado.

Através dos resultados de E.E. e liberação de glicose e proteína das micropartículas lipídicas produzidas, segundo os planejamentos experimentais (Tabela 6 e 7), um ensaio para cada composto foi selecionado para produção das micropartículas lipídicas, caracterização e análise de seus perfis de liberação. Esses ensaios apresentaram como característica maior quantidade de composto retido (g de proteína ou glicose/g de micropartícula) após a permanência em sistema aquoso (60 minutos).

Para a produção das micropartículas contendo glicose foram adotadas as condições: proporção de lipídeo/glicose de 30/70 (p/p), concentração de solução 65% (p/v) (ensaio 5, Tabela 6); e, para as contendo proteína: proporção de lipídeo/wpi de 30/70 (p/p), concentração da solução de proteína de 40% (p/v) (ensaio 1, Tabela 7).

3.1.2 Produção das micropartículas geleificadas

3.1.3 Eficiência de encapsulação

Na Tabela 8 podem-se observar os valores de eficiência de encapsulação (EE), eficiência de inclusão (IE) e sólidos totais (%), para os sistemas pectina (PE) e a mistura pectina/gelana/alginato (PEGEAL), contendo os compostos hidrofílicos (glicose e proteína) incorporados na forma de emulsão ou em micropartículas lipídicas. Nota-se uma ampla faixa de variação de EE, com valores de 1,2 a 68,0% e 3,7 a 75,0% para os sistemas PE e PEGEAL, respectivamente. Os sistemas poliméricos contendo a glicose

incorporada na forma de micropartículas lipídicas apresentaram valores variando entre 63 a 74% de E.E.

Os valores para a eficiência de inclusão (IE) variaram de 57,1 a 100% para o sistema polimérico com PE e de 62,8 a 98,5% para o sistema PE/GE/AL, sendo os menores valores observados para os sistemas contendo glicose incorporada em micropartículas lipídicas. Os valores observados na I.E. e E.E., na produção dos sistemas poliméricos contendo micropartículas lipídicas com glicose, indicam que parte da glicose foi perdida tanto na incorporação das micropartículas lipídicas como por lixiviação, durante o processo de preparo dos sistemas gelificados. Os sistemas gelificados contendo micropartículas com proteína mostram altos valores de IE (>98%) e valores de E.E. em torno de 70%, indicando que ocorreu pequena perda da proteína por lixiviação durante o processo de produção das micropartículas gelificadas.

Tabela 8. Valores médios e respectivos desvios padrões de eficiência de inclusão (IE), eficiência de encapsulação de glicose e proteína (EE), eficiência de processo (EP) e sólidos totais (%) dos sistemas gelificados contendo micropartículas (MP) ou emulsão lipídica (EM) com glicose (GLY) ou proteína (WPI).

Sistema	Tratamento	IE (%)	EE (%)	Sólidos totais (%)
PECTINA	GLY-MP	57,14±9,95	47,97±6,46	5,40±0,56
	GLY-EM	94,69±6,55	1,16±0,21	4,96±0,29
	WPI-MP	98,69±3,65	67,82±7,56	5,15±0,29
	WPI-EM	100,00±0,1	63,89±1,89	5,14±0,08
PEGEAL*	GLY-MP	62,84±7,89	62,74±7,3	5,11±0,2
	GLY-EM	95,87±4,66	3,66±0,22	5,48±0,17
	WPI-MP	98,55±8,26	70,56±5,23	4,36±0,36
	WPI-EM	96,60±0,07	74,65±2,39	5,2±0,016

*PE/GE/AL – pectina/gelana/alginato.

Os sistemas gelificados, contendo os compostos hidrofílicos (glicose e proteína) preparados na forma de emulsão, mostram altos valores de IE (>94%) para ambos os sistemas, valores intermediários de E.E. (entre 64 e 74%), para a proteína, e baixos valores de EE (<4%), para o sistema contendo glicose, indicando que houve grande perda desse composto durante o processo de preparo da emulsão, causado talvez pela rápida difusão, em razão do alto gradiente de concentração entre a solução formadora das micropartículas, em que se encontrava dispersa a glicose e a solução iônica, utilizada para obtenção e enrijecimento das micropartículas de gel. Para as micropartículas de gel contendo a proteína, pode-se observar que tanto o preparo na forma de emulsão lipídica como em micropartículas os valores de I.E. foram superiores a 95% (Tabela 8) e valores de E.E. maiores que os observados para a glicose.

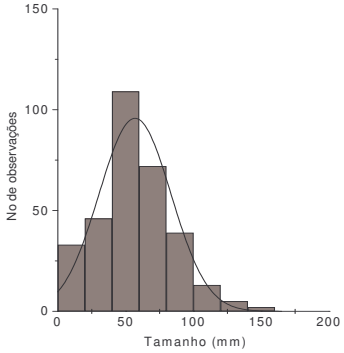
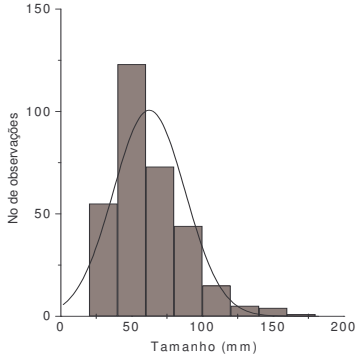
Os valores médios de sólidos totais foram similares para todos os tratamentos estudados, situando-se em torno de 5%, indicando grande quantidade de água presente nas micropartículas de gel.

3.1.4 Distribuição de tamanho e diâmetro médio

A Tabela 9 apresenta os histogramas de tamanho das micropartículas lipídicas, contendo os compostos hidrofílicos (glicose e proteína), e mostra uma distribuição normal de tamanho, com ampla faixa, compreendida entre 1 e 160µm, com maioria das partículas situadas entre 50 e 100µm. O diâmetro médio foi de 36,7 e 57,5µm para as micropartículas lipídicas contendo glicose e proteína, respectivamente.

A distribuição de tamanho apresentou um perfil semelhante à variação de tamanho, obtida geralmente por micropartículas produzidas pela técnica de secagem por atomização (5 a 100µm). Resultados similares também foram encontrados em outros trabalhos com micropartículas lipídicas [MAGEE & OLSON 1981; OZKIZILCIK & CHU, 1996; LANGDON, 2003].

Tabela 9. Diâmetros médios, respectivos desvios padrões e distribuição de tamanho das micropartículas lipídicas (MPL) contendo compostos hidrofílicos (glicose e proteína).

Tratamento	Diâmetro médio (μm)	Distribuição de tamanho
MPL - glicose	36,74±25,38	
MPL- proteína	57,55±28,02	

Como observado na Tabela 10, as micropartículas gelificadas apresentaram um diâmetro médio cerca de três vezes maior que o observado para as micropartículas lipídicas, com maioria das micropartículas com tamanho entre 100 e 200 μm e distribuição normal para todos os tratamentos estudados. Os sistemas gelificados,

contendo micropartículas lipídicas, abrangeram um tamanho de 50 a 870 µm e de 25 a 800µm para as produzidas com pectina, contendo glicose e proteína, respectivamente, e de 12 a 770 µm e 12 a 650 µm para as produzidas com a matriz de gel ternária (PEGEAL) contendo glicose e proteína. As preparadas pelo método de emulsão apresentaram uma variação de tamanho entre 12 a 550 µm para glicose e 48 a 800 µm para proteína no sistema com pectina, e de 12 a 800 µm e 50 a 600 µm para o sistema PEGEAL. Micropartículas poliméricas contendo micropartículas lipídicas produzidas por ONAL & LANGDON [2005] apresentaram uma faixa de diâmetro de 20 a 500µm.

Em geral, os sistemas preparados com emulsão apresentaram um diâmetro médio menor do que os sistemas contendo micropartículas lipídicas (Tabelas 11). Por outro lado, os sistemas formados por matrizes de pectina, contendo a proteína incorporada, tanto em micropartículas lipídicas como em emulsão, apresentaram diâmetros médios de tamanho ligeiramente maiores que os outros sistemas. Segundo MUKAI-CORRÊA *et al.* [2004] e ONAL & LANGDON [2005], o tamanho da partícula pode ser manipulado pela variação do tamanho do orifício do bico pulverizador, pela taxa de fluxo de ar e de solução a ser pulverizada, e pela relação entre os mesmos. A viscosidade da solução também pode ter uma ligação direta e pode estar associada, neste caso, ao tipo de emulsão formada na produção das micropartículas gelificadas.

Tabela 10 Diâmetros médios, respectivos desvios padrões e distribuição de tamanho das micropartículas de gel (MPGEL) contendo micropartículas lipídicas (MPL) com os compostos hidrofílicos glicose (GLY) e proteína (WPI).

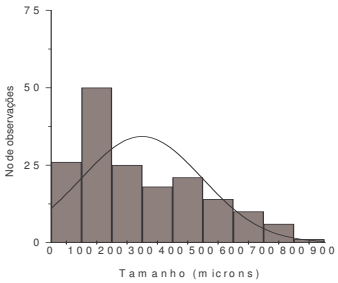
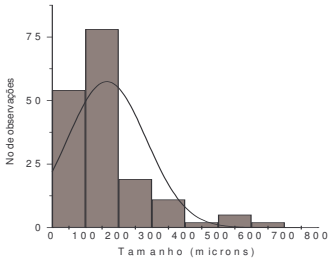
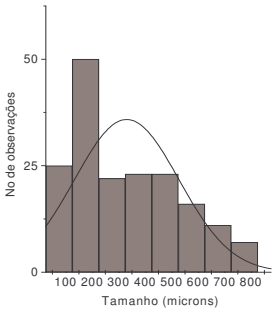
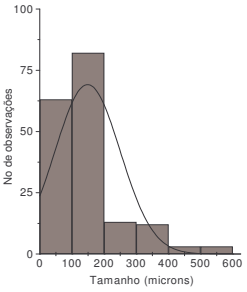
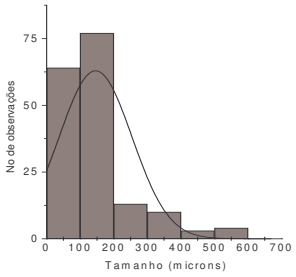
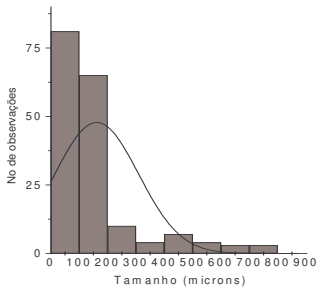
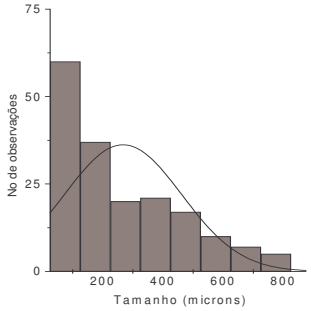
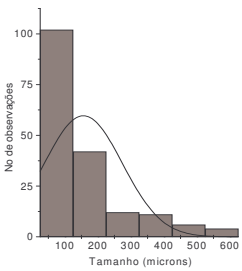
Tratamento	Diâmetro médio	Distribuição de tamanho
MPGEL – MPLGLY PECTINA	296,23±199,23	
MPGEL – MPLGLY PE/GE/AL	164,58±145,84	
MPGEL – MPLWPI PECTINA	330,42±196,97	
MPGEL – MPLWPI PE/GE/AL	149,11±111,32	

Tabela 11. Diâmetros médios, respectivos desvios padrões e distribuição de tamanho das micropartículas de gel (MPGEL) contendo emulsão lipídica (EM) com os compostos hidrofílicos glicose (GLY) e proteína (WPI).

Tratamento	Diâmetro médio	Distribuição de tamanho
MPGEL -EMGLY PECTINA	145,84±118,80	
MPGEL- EMGLY PE/GE/AL	161,72±147,72	
MPGEL – EMWPI PECTINA	273,91±200,10	
MPGEL – EMWPI PE/GE/AL	155,77±118,35	

3.1.5 Capacidade de rehidratação

As micropartículas gelificadas (pectina e pectina/gelana/alginato) desidratadas, contendo micropartículas lipídicas, apresentaram um aumento de 2,5 vezes no diâmetro médio após suas hidratações em água enquanto, que nos sistemas preparados com emulsão, a elevação desse valor foi de 4 vezes. Conforme a Tabela 12, os sistemas desidratados preparados com emulsão apresentaram os menores diâmetros médios, se comparados àqueles preparados com micropartículas lipídicas, mostrando a mesma tendência observada na distribuição de tamanho, com micropartículas lipídicas e emulsionadas (Tabela 10 e 11).

Tabela 12. Valores de diâmetro médio (µm) dos sistemas secos e hidratados, com emulsão (EM) ou micropartículas lipídicas (MPL) contendo proteína.

Tratamentos		**Diâmetro (µm)**	
		secas	*hidratadas*
Pectina	MPL	80,10 ± 58,49	220,86± 57,22
	EM	45,12 ± 36,29	186,33± 70,30
PEGEAL	MPL	60,10±55,15	151,19±60,29
	EM	35,12±36,28	147,25±45,19

Em geral, as micropartículas de gel desidratadas, quando colocadas em água, expandiram seu volume de forma muito rápida (hidratação instantânea). Fatores como a expansão do volume em solução aquosa, a absorção de água e a hidratação das cápsulas devem ser considerados no controle da taxa de liberação de compostos retidos, uma vez que a permeabilidade da cápsula é afetada pelo aumento no tamanho do poro e também pela área de superfície disponível para o contato com a solução aquosa (POLK *et al.,* 1994).

3.1.6 Morfologia e microestrutura

A Figura 6 mostra observações feitas, por meio da microscopia óptica, das micropartículas lipídicas contendo os compostos hidrofílicos. Nota-se uma apresentação na forma esférica para ambos os compostos utilizados como conteúdo (glicose e proteína), sem diferenças morfológicas entre as micropartículas lipídicas.

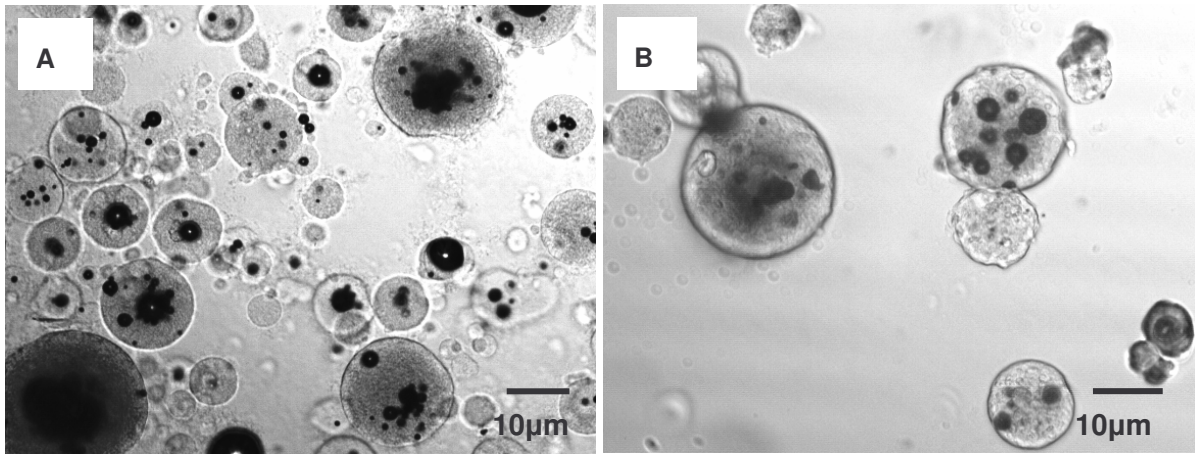


Figura 6 Imagens obtidas por microscopia óptica das micropartículas lipídicas. A – conteúdo de glicose; B – conteúdo de proteína. Aumento de 12,5x (barra = 10µm).

As micropartículas de gel contendo a mistura lipídica com os compostos hidrofílicos (proteína e glicose), na forma de micropartículas, observadas nas Figuras 7 e 8 e representadas pelos sistemas pectina e PEGEAL, respectivamente, apresentaram a maioria das partículas na forma esférica e multinucleada. A incorporação das micropartículas lipídicas parece ter sido eficiente, como também encontrado nos valores de IE (Tabela 8), com exceção dos sistemas gelificados contendo glicose, em que uma distribuição muito heterogênea foi observada, notando-se grande quantidade de micropartículas lipídicas em algumas matrizes de gel e sua ausência em outras. Os outros sistemas estudados também apresentaram a mesma tendência, mas em menor intensidade, indicando a necessidade de estudos de otimização do processo de sua

produção. Distribuição heterogênea de micropartículas lipídicas também foi observada por ALVIM [2005], em micropartículas produzidas por coacervação, atribuindo-se esse efeito às condições não otimizadas de produção das microcápsulas, principalmente na etapa de dispersão das micropartículas lipídicas.

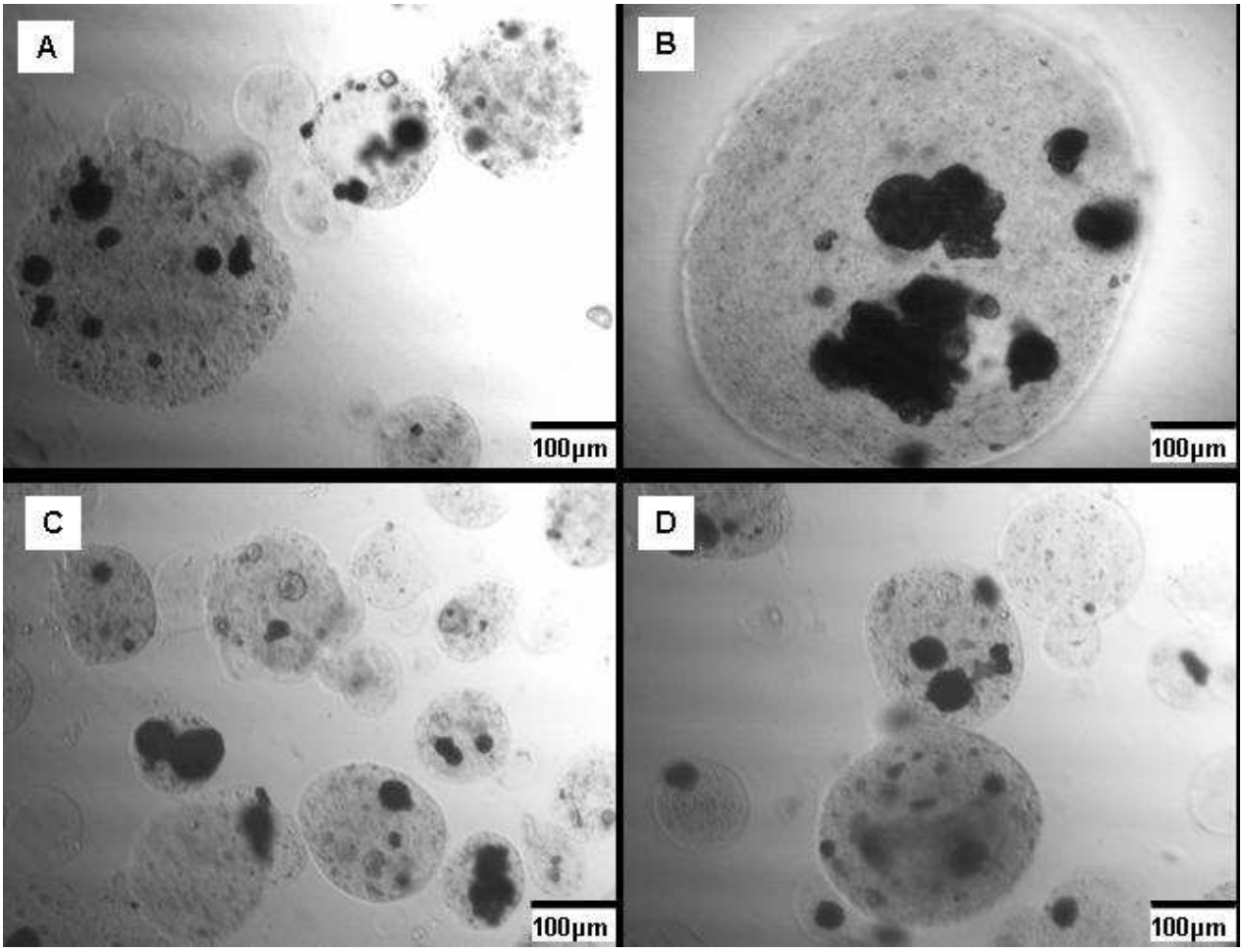


Figura 7 Imagens obtidas por microscopia óptica das micropartículas gelificadas com pectina contendo micropartículas lipídicas. A e B – contendo glicose; C e D – contendo proteína. Aumento de 12,5x em A e C, e 25x em B e D. Barra = 100µm.

A Figura 9 mostra os compostos incorporados na forma de emulsão lipídica nas micropartículas de gel e revela uma matriz com distribuição de conteúdo bem diferente

do que aquela produzida contendo micropartículas lipídicas. O tamanho e a distribuição das gotículas de gordura foram uniformes, formando uma matriz bem homogênea com forma esférica em sua maioria, para ambos os sistemas e compostos estudados. A morfologia observada foi semelhante às microcápsulas fabricadas em trabalhos anteriores [MUKAI-CORRÊA *et al*., 2005].

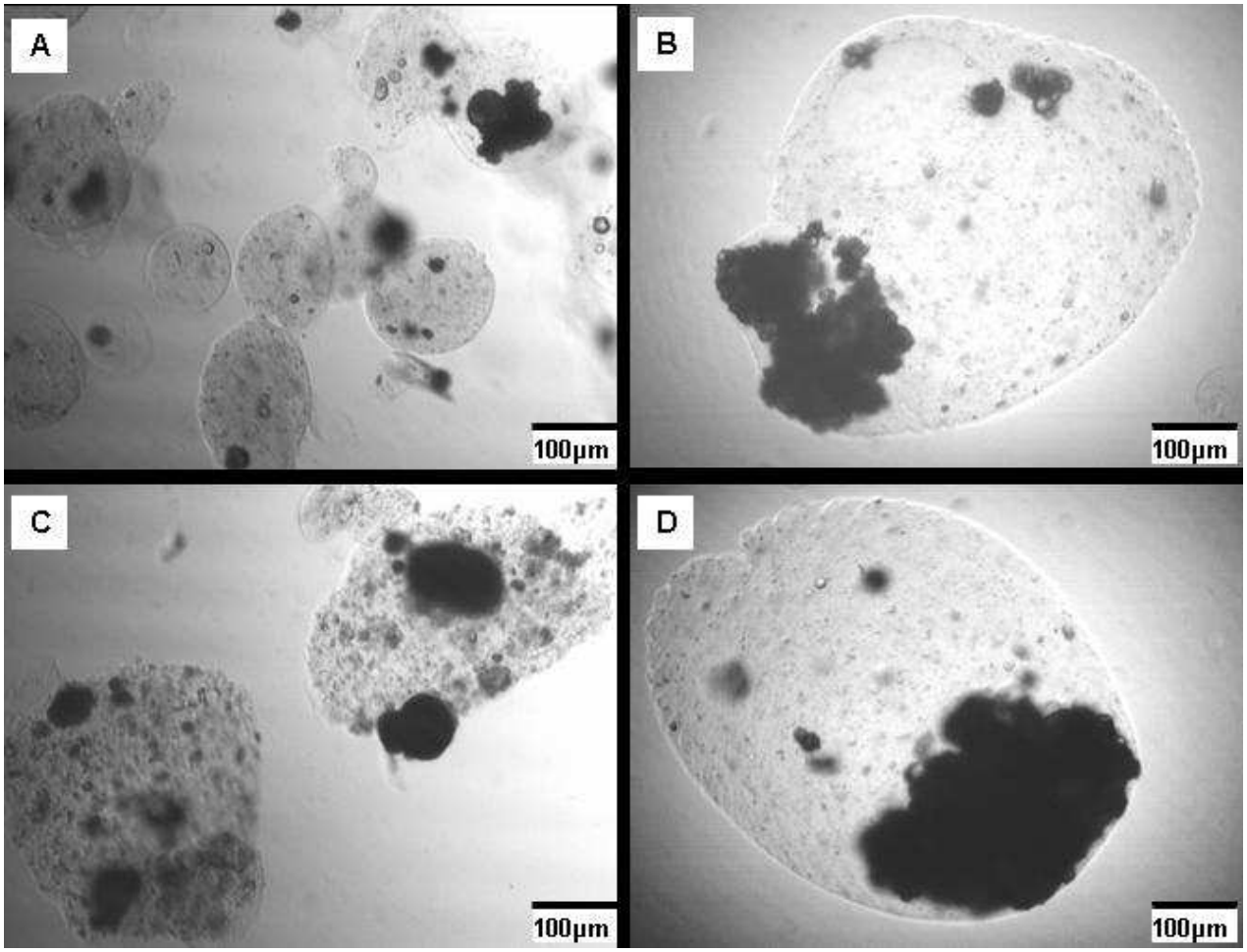


Figura 8 Imagens obtidas por microscopia óptica das micropartículas gelificadas com a mistura pectina/gelana/aginato, contendo micropartículas lipídicas. A e B – com glicose; C e D – com proteína. Aumento de 12,5x para A e C, e 25x para B e D. Barra = 100µm.

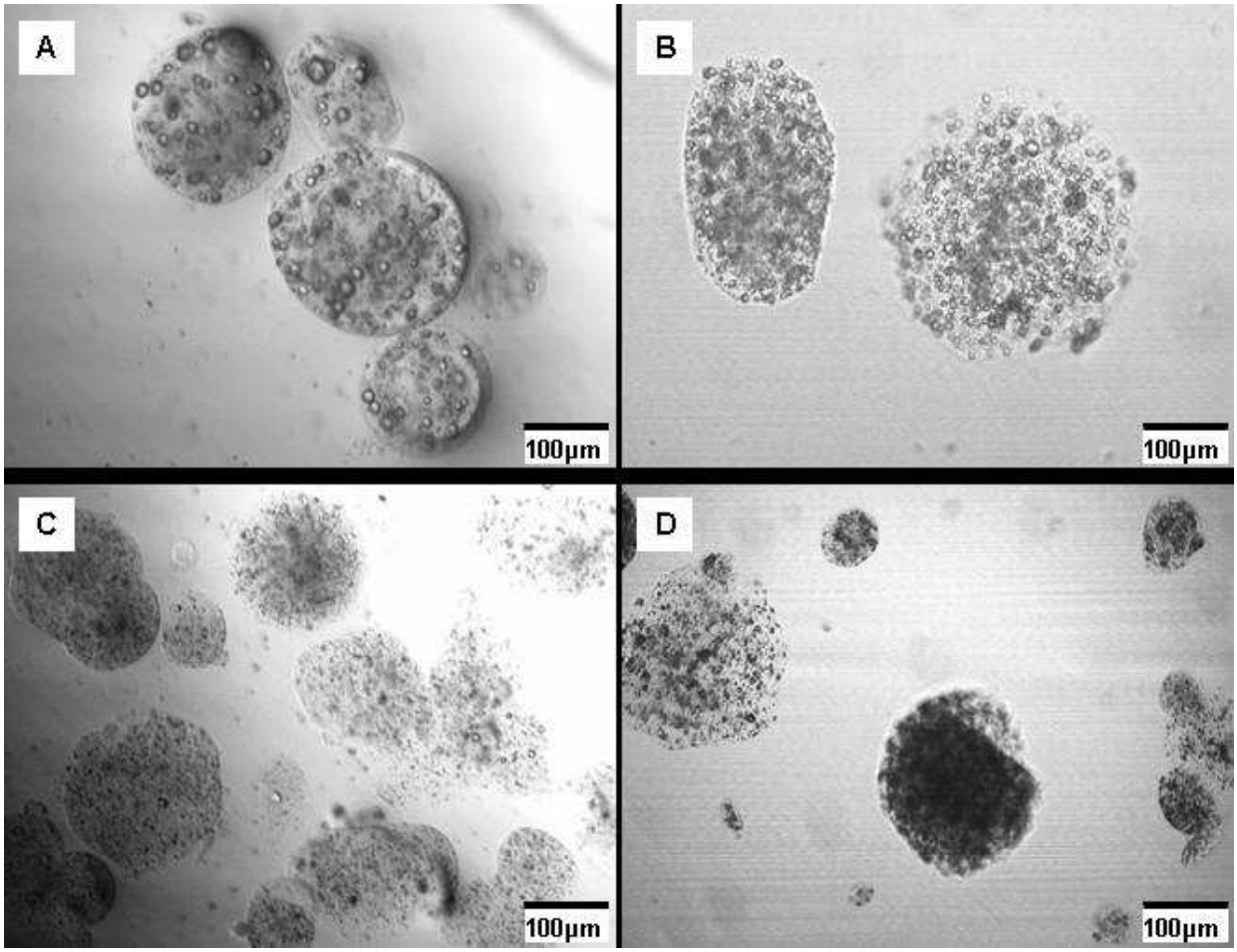


Figura 9. Imagens obtidas por microscopia óptica das micropartículas gelificadas contendo mistura lipídica em emulsão. A e B – matriz de pectina com glicose e proteína, respectivamente; C e D – matriz de pectina/gelana/alginato contendo glicose e proteína. Aumento de 12,5x. Barra = 100µm

A observação por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas lipídicas, apresentadas na Figura 10, revelou uma morfologia com superfície rugosa e forma esférica, sem diferenças visuais entre as micropartículas, contendo glicose e as contendo proteína, conforme também observado na microscopia ótica (Figura 5). As microparticulas de gel contendo micropartículas lipídicas, ilustradas na Figura 11, mostram uma morfologia externa em forma esférica na sua maioria, com matriz

contínua e ausência de fissuras em sua superfície, para ambos os métodos de preparo (micropartículas ou emulsão) adotados.

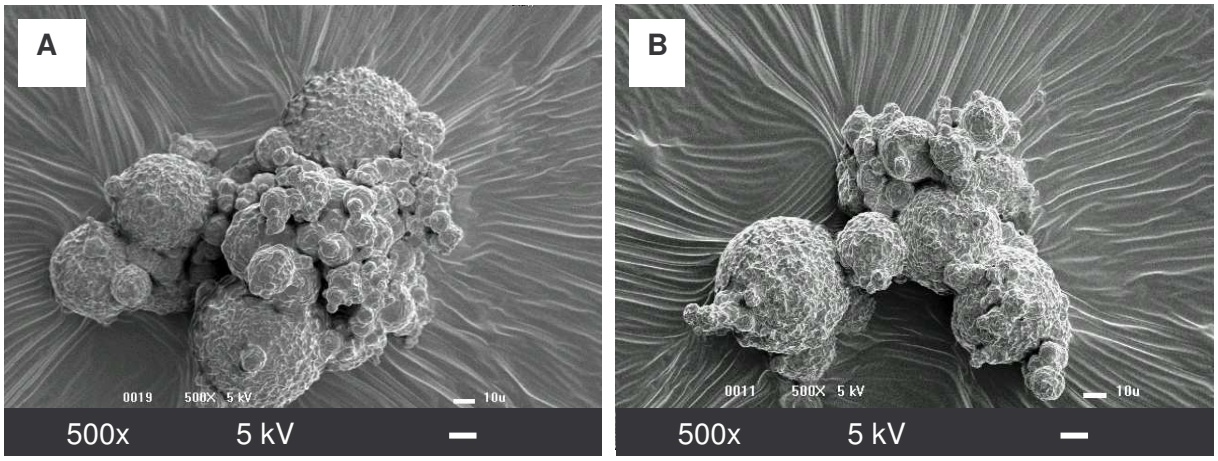


Figura 10. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas lipídicas. A - com glicose; B – com proteína. Barras = 10µm.

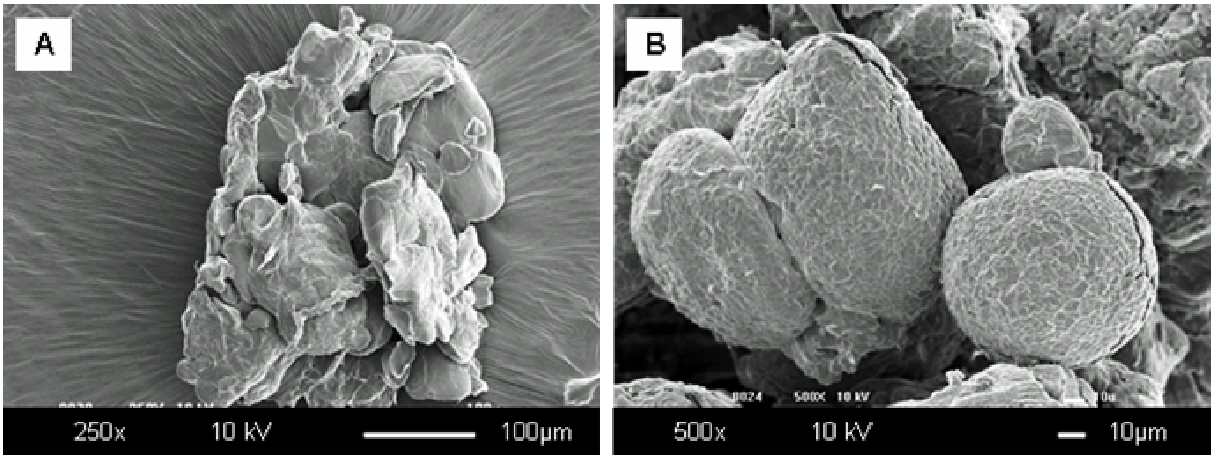


Figura 11. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas gelificadas com pectina contendo micropartículas lipídicas. A – com glicose; B – com proteína; Barras = 10µm e 100 µm.

Por outro lado, o método de preparo que envolveu a emulsão com proteína mostra uma superfície lisa e mais homogênea quando comparada aos outros sistemas estudados, como pode ser observado na Figura 12.

Segundo ROSENBERG *et al.* [1993], reportado por MUKAI-CORRÊA *et al.* [2004], a estrutura das microcápsulas pode estar relacionada à capacidade de proteção apresentada por diferentes biopolímeros, em que as indicações dessa capacidade são fornecidas pelo grau de integridade e porosidade das microcápsulas. Entretanto, em trabalhos anteriores [MUKAI, 2003] utilizando os mesmos biopolímeros (pectina e PE/GE/AL) na fabricação de microcápsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada foram observadas depressões e rugosidades na superfície da matriz e considerável perda da forma esférica.

No preparo das micropartículas de gel, neste estudo, as concentrações de polissacarídeos e íons cálcio foi dobrada, passando de 1 para 2%, o suficiente para provocar mudanças na morfologia EE e liberação dos compostos retidos nessas matrizes. Essas mudanças observadas podem estar relacionadas, ao aumento da força do gel e ao aumento do entrelaçamento da rede de gel formada, que é relativamente proporcional à concentração de polissacarídeo e íons utilizados [MARTINSEN *et al.,* 1989*;* SRIAMORNSAK, 1999], desde que não ocorra o fenômeno de sinérese. A mudança na morfologia também sugere relação com a composição dos lipídeos utilizados (gordura de peixe e ácido esteárico) e o surfactante utilizado como dispersante, além de interações entre esses compostos.

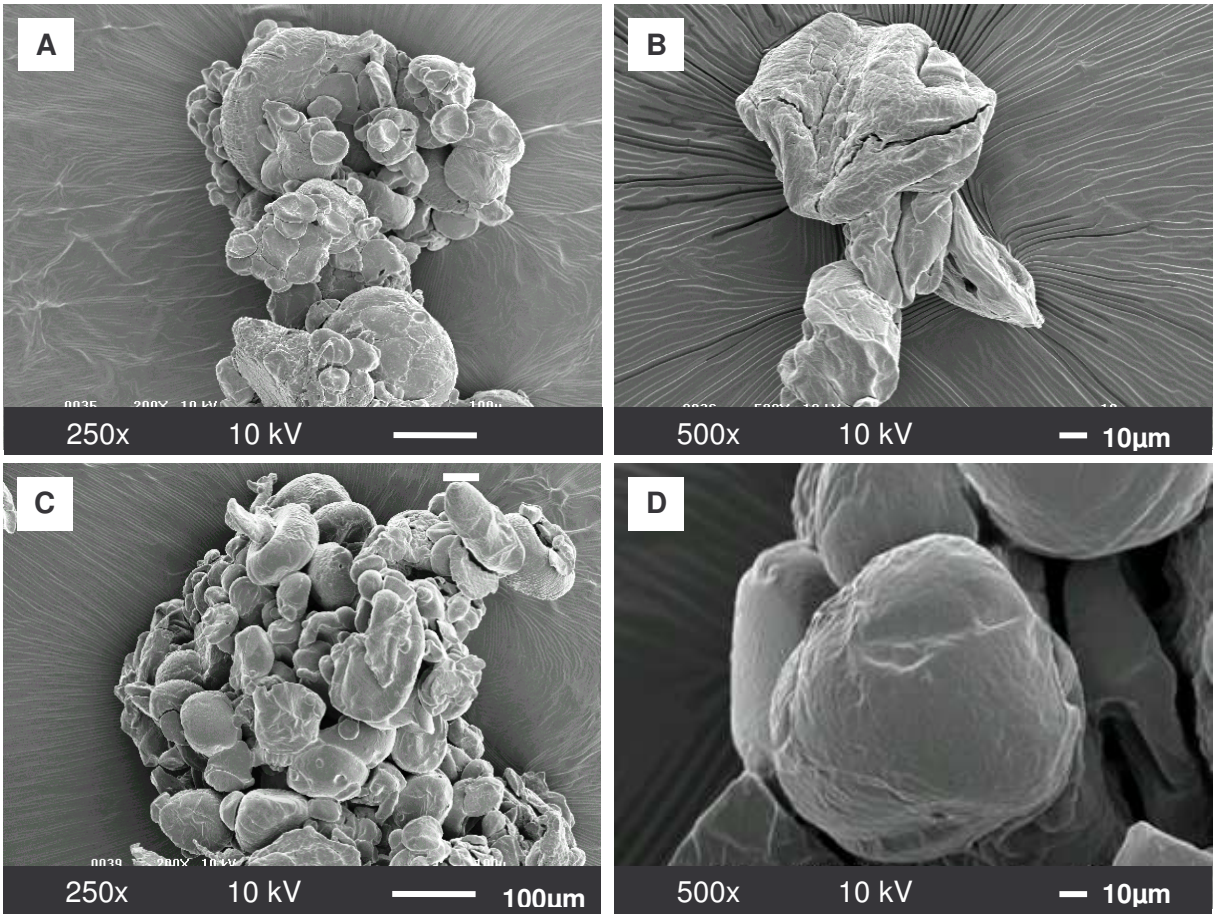


Figura 12 Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de micropartículas gelificadas com pectina contendo a mistura lipídica em emulsão. A e B – com glicose; C e D – com proteína. Barras = 10µm e 100 µm.

As Figuras 13, 14 e 15, captadas por microscopia laser confocal, mostram as micropartículas lipídicas e de gel coradas com os corantes *Nile red* (cor vermelha), nos lipídeos, e FITC (cor verde), nas proteínas. Tanto a proteína como os lipídeos foram coloridos antes da formação das micropartículas lipídicas e de gel.

Por ser uma técnica de observação não invasiva, com o seu uso foi possível avaliar as morfologias internas das micropartículas lipídicas e gelificadas sem provocar danos a suas estruturas. Essa técnica vem sendo aplicada em estudos de microencapsulação, onde uma considerável melhora vem sendo notada na observação dos componentes que constituem a micropartícula [LAMPRECHT *et al.*, 2001; ZIMMERMANN *et al.,* 2001; MUKAI-CORRÊA *et al.*, 2005; ALVIM, 2005; PRATA, 2006].

A série 13 (a, b, c, e d) representa, respectivamente, a observação por reflexão a laser, a proteína corada com o FITC, os lipídeos corados com *Nile red* e a sobreposição das imagens, todas efetuadas aproximadamente no meio da altura da micropartícula lipídica. Pode-se notar que os lipídeos constituem uma matriz bem formada e homogênea, com contornos esféricos, e a proteína apresenta-se dispersa homogeneamente por toda superfície da matriz observada.

Na série 14 e 15 os sistemas de pectina e PE/GE/AL, respectivamente, contendo emulsões foram observados pela técnica confocal (a) com proteínas coradas com FITC (b), lipídeos corados com *Nile red* (c) e a sobreposição das imagens (d). Por meio dessas figuras pode-se notar detalhes da distribuição das gotículas lipídicas e de proteína que revelam uma matriz multinucleada, conforme também observado nas imagens de microscopia óptica (Figura 9). O material lipídico encontra-se distribuído homogeneamente em toda a estrutura de gel, indicando que a emulsão inicialmente formada manteve-se bem distribuída nas partículas. Algumas interações do tipo proteína-polissacarídeo, proteína-lipídeos, associações hidrofóbicas, entre outras, podem explicar a aparente estabilidade da emulsão. Segundo BUCHAL & LANGDON [1998], tanto a fonte de lipídeos como as suas misturas podem afetar a estabilidade e

características físicas de emulsões lipídicas que, por sua vez, influenciam a produção de micropartículas.

Como já mencionado em trabalhos anteriores [MUKAI- CORRÊA *et al.,* 2004], a inativação e lavagem para retirada do excesso do reagente livre, utilizado para a microscopia confocal, não foi efetuada pela possibilidade de alteração da funcionalidade gelificante dos polissacarídeos (pectina, gelana e o alginato) e de uma possível desnaturação das proteínas. Essa técnica mostrou-se muito adequada para observação, tanto das micropartículas lipídicas quanto as de gel, em relação a sua morfologia e microestrutura, permitindo uma melhor visualização e localização das proteínas e dos lipídeos distribuídos espacialmente nas matrizes.

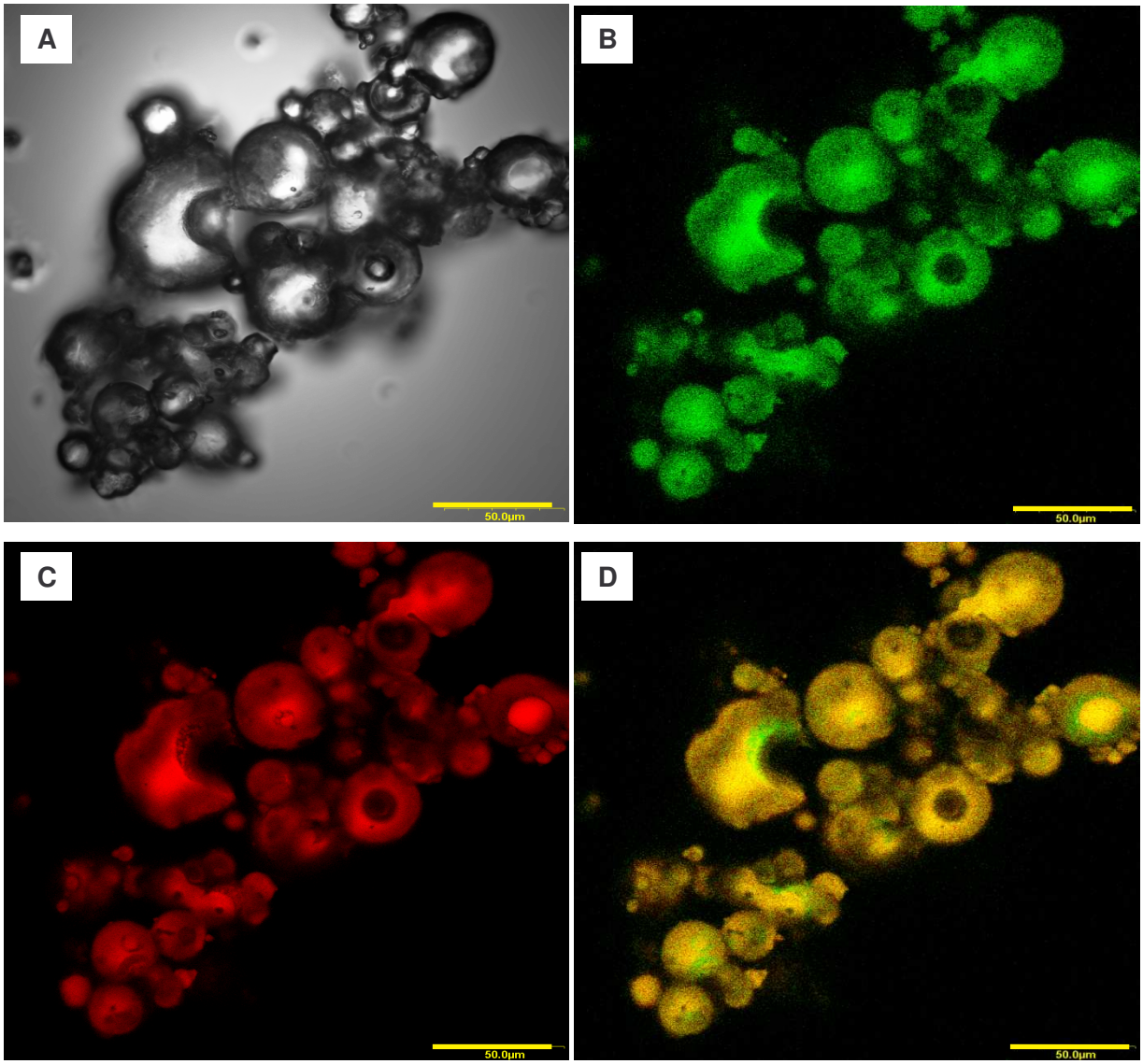


Figura 13 Imagens obtidas por microscopia confocal: Micropartículas com parede lipídica - *Nile red* (fluorescência observada na cor vermelha) contendo proteína -FITC (fluorescência na cor verde). A – Observação por transmitância (DIC); B – proteína – FITC; C – micropartículas lipídicas - *Nile red* e D – sobreposição de B e C. Barras = 50µm.

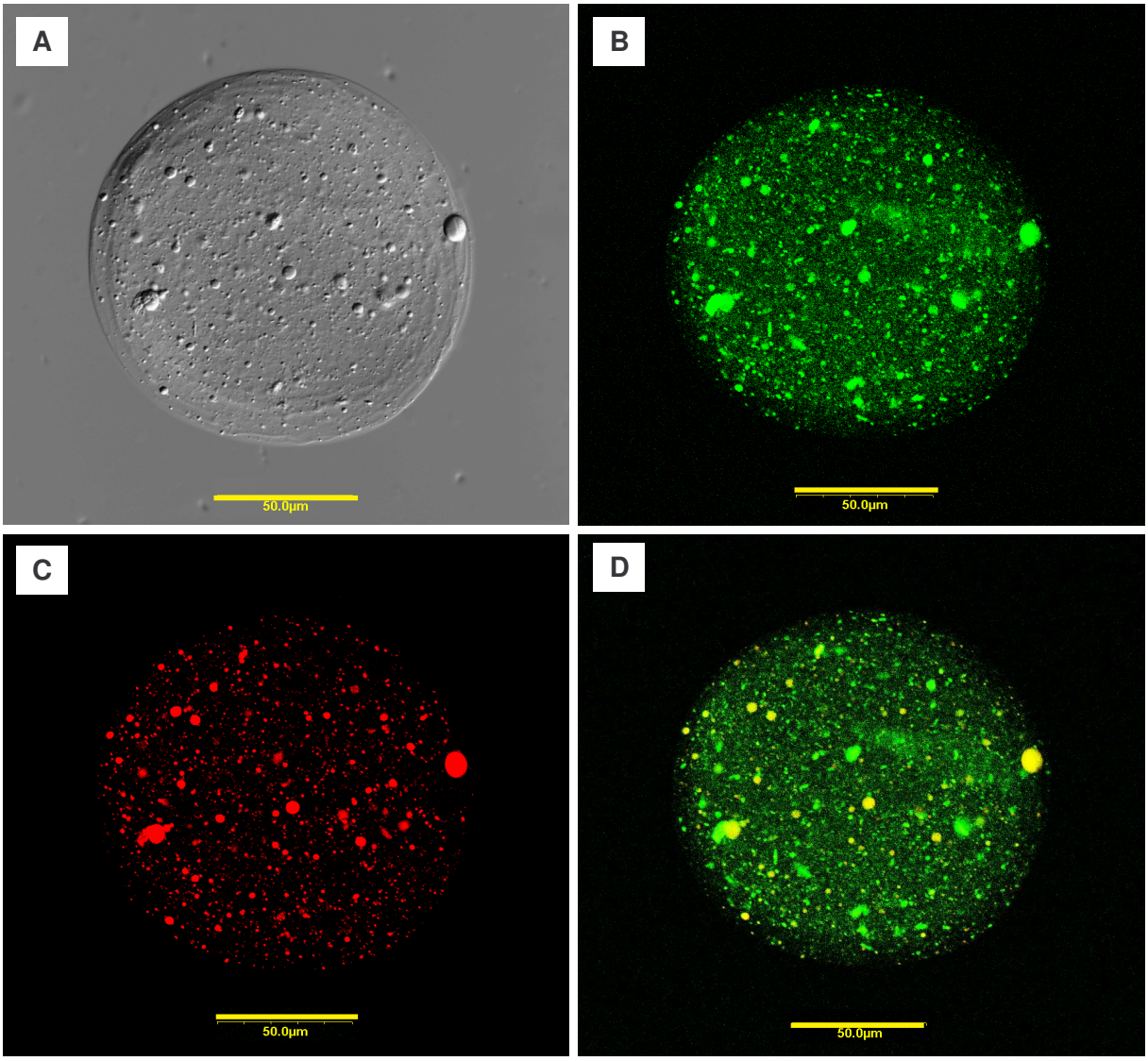


Figura 14 Imagens obtidas por microscopia confocal: Sistema pectina (sem coloração) contendo emulsão lipídica - *Nile red* (fluorescência observada na cor vermelha) com proteína - FITC (fluorescência na cor verde). A – Observação por transmitância (DIC); B – proteína-FITC; C – micropartículas lipídicas- *Nile red* e D – sobreposição de B e C. Barras = 50µm.

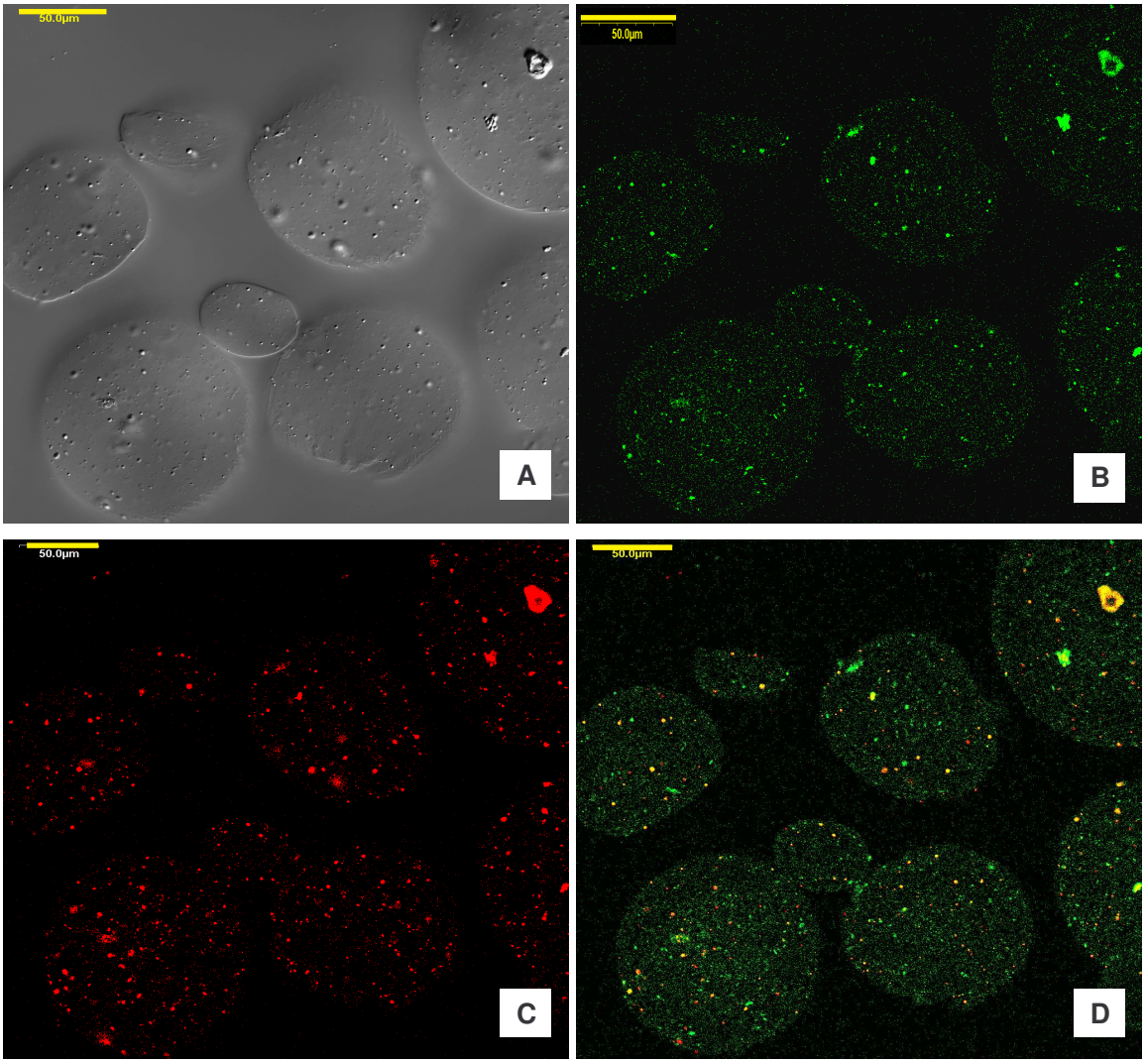


Figura 15. Imagens obtidas por microscopia confocal: Sistema pectina/gelana/alginato (sem coloração) contendo emulsão lipídica - *Nile red* (fluorescência observada na cor vermelha) com proteína - FITC (fluorescência na cor verde). A – Observação por transmitância (DIC); B – proteína - FITC; C – micropartículas- *Nile red* e D – sobreposição de B e C. Barras = 50µm.

3.1.7 Perfis de liberação

A Figura 16 mostra o perfil de liberação das micropartículas lipídicas contendo os compostos hidrofílicos (proteína e glicose) durante 240 minutos de imersão em água. Observa-se que a liberação de glicose foi linear (*Y=0,170 x+10,93 – R^2 0,9625*) durante o tempo estudado, apresentando valores de aproximadamente 20, 30 e 50%, após 30, 120 e 240 minutos, respectivamente. ÖNAL & LANGDON [2000] sugerem que o padrão desejável de liberação para micropartículas lipídicas suspendidas em água seja de ordem zero, para manter uma taxa fixa de liberação dos compostos retidos. O padrão de liberação linear ou de ordem zero significa que a quantidade de material que é liberada das micropartículas por unidade de tempo é constante e independente da concentração de material de recheio. Esse tipo de liberação é geralmente controlado pela parede da micropartícula e por suas propriedades [ONAL & LANGDON, 2004]. Uma equação de regressão linear foi mais bem descrita para o perfil de liberação de micropartículas lipídicas compostas de metil palmitato+monopalmitato de sorbitana+etil celulose, indicando uma liberação de ordem zero [ONAL & LANGDON, 2004].

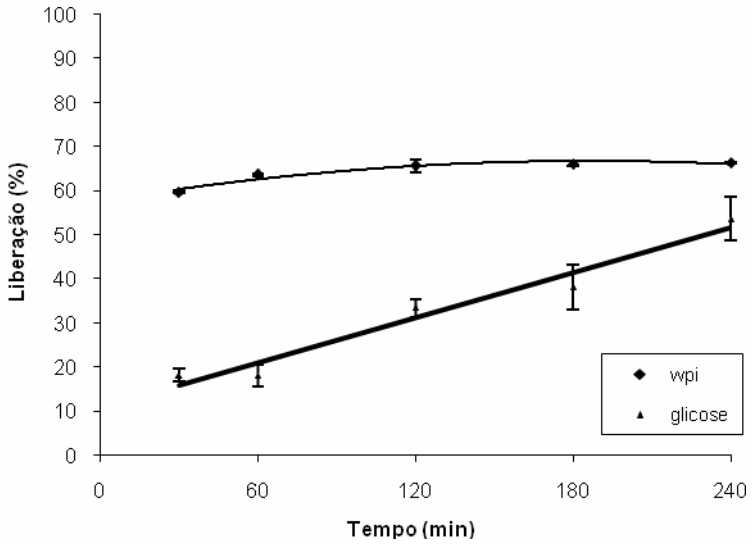


Figura 16. Liberação das micropartículas lipídicas em sistema aquoso em função do tempo. Sistemas contendo proteína ou glicose.

A liberação de proteína foi significativamente maior ($p<0,05$) e não linear ($Y=-0,0003\ x^2+0,096\ x+57,88$ – $R^2\ 0,9354$), em relação à glicose, sendo praticamente constante durante o período estudado, com 60% de proteína liberada nos primeiros 30 minutos. Era esperado que a glicose apresentasse maior liberação frente à proteína utilizada (isolado protéico de soro de leite), em razão de sua alta solubilidade e baixa massa molar (180Da). Entretanto, a liberação da proteína pode ter sido influenciada pela sua interação com o surfactante e com a mistura lipídica utilizada, de acordo com que afirmam segundo NOKHODCHI *et al.* [2002]. Diferenças entre a concentração de glicose e proteína encapsulada também podem ter influenciado o perfil de liberação das micropartículas [DUBERNET *et al.*, 1990; ÖNAL e LANGDON, 2004]. ALVIM [2005] observou um comportamento semelhante, com liberação de 80% de proteína, utilizando mesma fonte protéica em matrizes lipídicas constituídas de gordura vegetal hidrogenada, ácido esteárico e tensoativos. LANGDON & ÖNAL [2004] obtiveram uma retenção de 34% de glicina após 1 hora de imersão em água, de micropartículas lipídicas produzidas com óleo de savelha.

A liberação dos compostos (glicose e proteína) retidos em micropartículas lipídicas, ou emulsão lipídeo-proteína encapsulados nas matrizes de gel, são mostrados na Figura 17. Pode-se observar, nos primeiros 30 minutos, que houve pouca liberação (~10%) dos compostos, sem diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos estudados, exceto para o sistema PEGEAL, que apresentou a menor liberação (~5%). Após 60 minutos, os sistemas contendo micropartículas lipídicas apresentaram um perfil de liberação significativamente maior ($p<0,05$) para os compostos estudados. LANGDON & ONAL [2005] encontraram altas taxas de liberação de aminoácidos livres em micropartículas preparadas com mistura lipídica e zeína (87%, após 2 minutos de suspensão aquosa), se comparadas às preparadas com micropartículas lipídicas (56%).

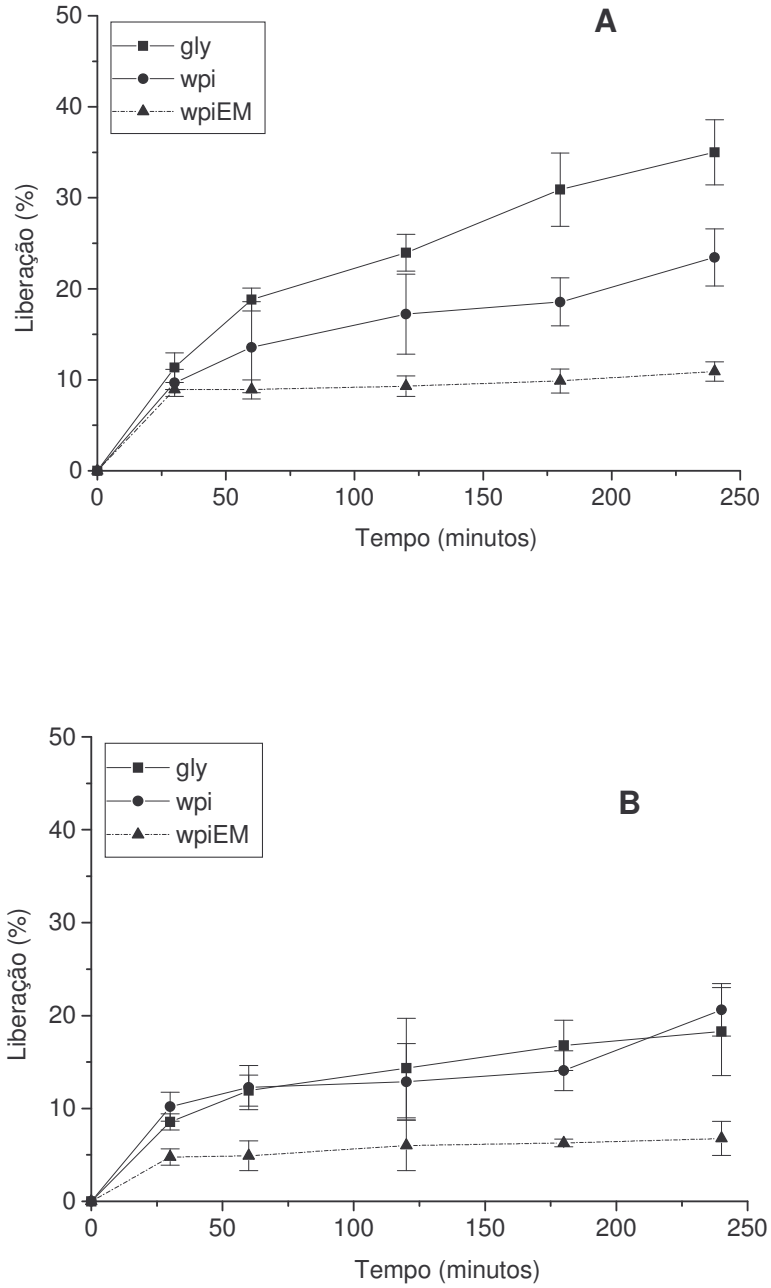


Figura 17. Liberação (%) da glicose (gly) e da proteína (wpi) retida em micropartículas lipídicas ou em emulsão lipídeo+proteína (wpi-EM) encapsuladas em matrizes de gel, ao longo do tempo. A – sistema com pectina; B – sistema com pectina/gelana/alginato.

Comparando-se os sistemas gelificados, nota-se uma redução da liberação dos compostos encapsulados nas matrizes produzidas com a mistura PEGEAL. Resultados semelhantes de ordem de liberação, com maior liberação para o sistema com matrizes formadas com pectina do que aquelas formadas com uma mistura de polissacarídeos, foram observados em trabalhos anteriores [MUKAI-CORRÊA *et al*, 2005], onde 90% da proteína encapsulada foi retida durante o mesmo período estudado. Analisando e comparando os resultados obtidos neste estudo e os obtidos por MUKAI-CORRÊA *et al.* [2005], a concentração de polissacarídeos usada para produção das micropartículas neste estudo mostrou maior influência nas características de liberação da mistura PEGEAL que a concentração polissacarídica utilizada anteriormente (1%).

Segundo MESTDAGH & AXELOS [1998], tanto a concentração de polissacarídeos e de íons cálcio como a força iônica e o pH determinam a cinética de formação do gel que influenciam diretamente o volume, estabilidade e porosidade das partículas formadas e, através disso, a difusão dos compostos encapsulados. Por outro lado, quando polissacarídeos são misturados, podem produzir diferentes tipos de estruturas [CAIRNS *et al.*,1987], o que pode melhorar as características do gel resultante.

O efeito *burst*, geralmente observado no comportamento de liberação para este tipo de micropartículas, atribuído ao material encapsulado, que se encontra próximo ou na superfície da microcápsula, aparentemente não ocorreu nos dois tipos de micropartículas de gel estudados.

As micropartículas de gel, contendo micropartículas lipídicas, formadas com o sistema de pectina mostram um perfil de liberação da glicose muito parecido (com mesma grandeza) com o produzido pelas micropartículas lipídicas, contendo o mesmo composto. Todavia, o perfil de liberação protéica teve uma redução de 60% quando as micropartículas lipídicas foram encapsuladas nas matrizes de gel. O mesmo comportamento foi observado por LANGDON & BUCHAL [2005], que atribuíram o comportamento, às diferenças de características das matrizes lipídicas. Outra hipótese seria a relação com o tamanho dos poros das micropartículas de gel e sua influência no

perfil de liberação, uma vez que a molécula de glicose, por ser de pequeno tamanho, não encontrou restrições no processo de difusão para o meio aquoso, enquanto, o mesmo pode não ter ocorrido para as proteínas presentes no isolado protéico de soro de leite, com maior tamanho, em relação a molécula de glicose. Dessa maneira, a rede de gel formada nas micropartículas pode não ter sido eficiente para retardar ou conter a difusão de glicose, incorporada nas micropartículas lipídicas, para o meio aquoso, enquanto que, as moléculas de proteínas podem ter encontrado alguma dificuldade para difundir-se, explicando o perfil de liberação observado.

A liberação da glicose a partir das micropartículas de gel que utilizaram lipídeos na forma de emulsão não pode ser observada em razão da dificuldade de reter esse composto nesse tipo de matriz (valores de eficiência de encapsulação <3%) (Tabela 8), inviabilizando os experimentos de liberação.

A Figura 18 mostra os perfis de liberação das micropartículas secas formadas com pectina e a mistura PEGEAL. Observa-se que ambos os sistemas apresentaram praticamente os mesmos perfis de liberação, quando comparados aos sistemas hidratados, com um pequeno aumento na liberação (~10%) dos compostos durante o tempo estudado. A diferença observada pode estar relacionada à possibilidade de algum tipo de dano físico causado pela secagem da matriz, ou ainda, pela rápida entrada de água na matriz. Em estudos conduzidos anteriormente por MUKAI-CORRÊA *et al.* [2004], utilizando os mesmos polissacarídeos pectina e a mistura PEGEAL em menores concentrações (1%), a secagem reduziu a liberação em relação às partículas úmidas quando a gordura vegetal hidrogenada foi utilizada em grande concentração na formulação, atribuindo-se o comportamento à integridade da microcápsula e à adição de grande quantidade de gordura na formulação utilizada para fabricação das micropartículas.

De acordo com os resultados obtidos, acredita-se que a introdução de gordura parece influenciar fortemente o comportamento de liberação de matrizes polissacarídicas produzidas por gelificação iônica, conforme também observado por MUKAI-CORRÊA *et al.* [2004]. Da mesma maneira, a quantidade de material de

recheio, de íons e de polissacarídeos utilizados nas micropartículas pode determinar diferentes eficiências de encapsulação e perfis de liberação. O tipo e a maneira pela qual esses lipídeos são incorporados em matrizes de gel também podem influenciar o comportamento de liberação.

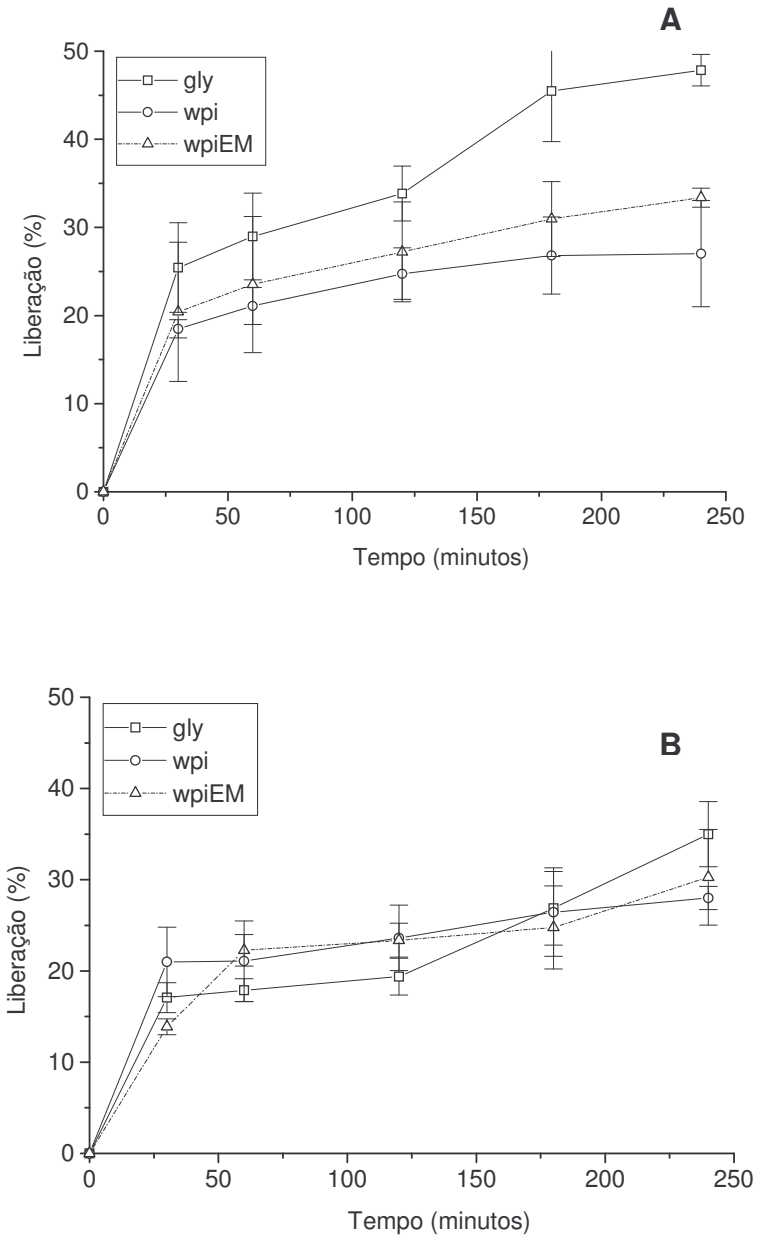


Figura 18. Liberação (%) de micropartículas secas contendo glicose (gly) ou proteína (wpi), retidas em micropartículas lipídicas ou em emulsão lipídeo+proteína (wpi-EM), ao longo do tempo. A – sistema com pectina; B - sistema com pectina/gelana/alginato.

4. CONCLUSÕES

O planejamento experimental possibilitou a otimização do processo de produção de micropartículas lipídicas, nas condições estudadas, resultando uma proporção de 70/30, para gordura de peixe e ácido esteárico, respectivamente, e concentrações de soluções de 65% para glicose e 40% para proteína.

Através da eficiência de encapsulação, tamanho, morfologia e perfis de liberação observados, as micropartículas lipídicas podem ser uma alternativa para encapsular compostos solúveis de baixa massa molar.

Os sistemas modelos compostos pelas micropartículas gelificadas contendo a mistura lipídica e os compostos hidrofílicos na forma de emulsão parecem ser mais eficientes que os preparados com micropartículas lipídicas, de acordo com a morfologia e perfis de liberação (<10%) observados.

Na comparação entre os sistemas gelificados, as matrizes produzidas com a mistura PEGEAL apresentaram uma redução da liberação dos compostos encapsulados.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE DIETAS MICROPARTICULADAS PARA LARVAS ALTRICIAIS DE PEIXE.

RESUMO

O presente estudo foi dividido em duas partes. Na primeira foi realizado o preparo de duas dietas experimentais microparticuladas por gelificação iônica, utilizando pectina e íons cálcio. Elas foram otimizadas em relação ao conteúdo de proteínas, lipídeos e matéria seca, numa tentativa de alcançar o perfil nutricional equivalente ao dos náuplios de *Artemia*; e caracterizadas em relação à sua composição, tamanho, hidratação, morfologia, eficiência de encapsulação e liberação/retenção das proteínas. O preparo das dietas envolveu a obtenção e caracterização da gordura de peixe (pacu - *Piaractus mesopotamicus*), concentrado protéico de peixe (tilápia – *Oreochromis niloticus*) e dos náuplios de *Artemia*, utilizados na composição das dietas. Na segunda parte, a eficiência das dietas foi avaliada em experimentos *in vivo*, por meio de respostas de crescimento e sobrevivência utilizando larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), e *in vitro* pela digestibilidade dos compostos protéicos encapsulados. A obtenção dessas dietas tem como objetivo reduzir o uso do alimento vivo durante o estágio larval de peixes altriciais. Os resultados mostraram baixa oxidação lipídica e alto teor de ácidos graxos saturados na gordura do pacu. A maioria das proteínas possuía baixa massa molar (<16 kDa), com grande quantidade de aminoácidos polares ionizados e não-ionizados no concentrado protéico de peixe. A produção das dietas microparticuladas DM (somente proteína de peixe) e DMA (75% de proteína de peixe e 25% de náuplios liofilizados) foi bem sucedida, apresentando altos valores de eficiências de encapsulação (> 97%) e perfis de composição protéica, lipídica e de matéria seca, mais baixos que os dos náuplios de *Artemia* (alimento vivo). A distribuição de tamanho foi de 12 a 700 µm (compatível com alimento vivo), apresentando boa formação das matrizes,

com formas variadas, conteúdo multinucleado e distribuição uniforme. A integridade após reabsorção de água foi mantida pelas micropartículas, que apresentaram baixas liberações (10% para micropartículas secas). Os ensaios *in vivo* e *in vitro* mostraram boa digestibilidade da massa protéica das dietas, manutenção da taxa de crescimento e razoáveis valores de sobrevivência (~50%), porém, ainda não suficientes para suportar um crescimento similar ao alcançado quando se utilizou alimento vivo. Todas essas características tornam essas micropartículas potenciais para estudos futuros de substituição do alimento vivo por dieta inerte. Os resultados de crescimento e sobrevivência, combinados com os de digestibilidade *in vitro*, de composição de aminoácidos e perfil eletroforético do concentrado protéico de peixe forneceram informações importantes para o desenvolvimento de micropartículas mais adequadas à alimentação de larvas.

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF MICROPARTICULATED FEEDS FOR ALTRICIAL FISH LARVAE

ABSTRACT

This study was divided into two phases.. In the first, two emulsified microparticulated diets were produced using ionic gelation (pectin plus calcium ions). The approach was to mimetic the composition of *Artemia nauplii* with respect to the content of proteins, lipids and dry matter. The particles were characterized as follow: average size, sweeling capacity, morphology, encapsulation efficiency and proteins release/retention properties. To produce the fish feeds, first were obtained: fish fat, fish protein concentrate plus nauplios of *Artemia* used inside the formulations. In the second step, the microparticulated diets were evaluated *in vivo,* measuring survival and growing using larval fish pacu (*Piaractus mesopotamiicus*). Also *in vitro,* digestibility of the feed fish were measured with respect to the protein fraction of the feeds. The results had shown low oxidation level considering the lipidic fraction and high level of saturated fatty acids. Eletrophorisis thecnique allowed to identify low molecular size (< 16 kD) considering the protein fraction. The diets production DM (only fish protein) and DMA (75% fish protein and 25% liofilized nauplii) were successful, showing high encapsulation efficiency (> 97%) and was lower than the *Artemia* composition. Size range was from 12 – 700 µm, showing multivarieted and homogeneous core distribution. After drying and swelling, microparticles presented low release profiles (< 10%) considering the protein fraction. *In vivo* and *in vritro* assays showed razonable digestibility, growing rates and also survival rates. However the microparticles could not sustained the same growing profile obtained when *Artemia* was used as the source of feed (alive feed). The results indicated that these particles can be improved as substitutes for live food (*Artemia*).

1. INTRODUÇÃO

A dependência do fornecimento de alimento vivo (rotíferos, náuplios de *Artemia*), como alimentação inicial é o fator mais importante em uma larvicultura intensiva, em que os custos de produção 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 redução dos custos de produção, bem como para manter a qualidade e a produção constante das larvas.

Diversas micropartículas têm sido desenvolvidas para várias espécies de peixes, numa tentativa de substituir o alimento vivo [LAZO *et al*., 2000; TAKEUCHI *et al*., 2001, YÚFERA *et al*., 2000, 2003; LANGDON, 2003]. Esse procedimento apresenta características muito interessantes, como a possibilidade de entregar a dieta íntegra à larva, evitando problemas de lixiviação de nutrientes e deterioração da qualidade de água dos tanques, entre outras. Entretanto, a completa substituição do alimento vivo se tem mostrado limitada, sendo os resultados negativos atríbuídos a uma variedade de fatores, como a baixa ingestão das dietas, pobre desenvolvimento do trato digestório, inadequada composição nutricional entre outros [KOLKOVSKI *et al*.,1997].

Diversos aspectos devem ser focados para o desenvolvimento das dietas, tanto nas características físico-químicas: liberação/retenção dos nutrientes, textura, cor, tamanho e densidade; como nos aspectos ligados a sua composição: palatibilidade e qualidade dos ingredientes empregados, disponibilidade e balanço nutricional adequado [TESHIMA *et al.,* 2000]. Também devem ser considerados o comportamento da larva ante dietas inertes e estudos fisiológicos da digestão [KOLKOVISKI, 2001; CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 2001; ÖNAL & LANGDON, 2004; OSTASZEWSKA *et al.,* 2005].

Adicionalmente, a maioria das micropartículas foram desenvolvidas com o intuito de conter uma alta quantidade de proteínas e de matéria seca, como as produzidas por BASKERVILLE-BRIDGES & KLING [2000]. No entanto, KOLSKOVSKI [2001] acredita que a dificuldade de a larva digerir as dietas está relacionada, principalmente, à

quantidade de matéria seca (60 a 90%) presente na maioria delas, muito diferente do alimento vivo (cerca de 12%).

A técnica de encapsulação por gelificação iônica é simples e de baixo custo, onde uma matriz de gel é formada pelo contato de uma solução de polissacarídeos contendo os nutrientes com uma solução iônica, em concentrações adequadas, podendo-se obter partículas de diferentes formas e tamanhos e com boa capacidade de conteúdo. Estudos utilizando esse tipo de micropartícula em larvas de *S. aurata* e *S. senegalensis* mostraram capacidade das larvas para suportar crescimento e sobrevivência, exibindo diferentes estágios de desenvolvimento e comportamento [RIBEIRO *et al.*, 1999; PARRA e YÚFERA, 2001]. Micropartículas desenvolvidas por MUKAI-CORRÊA *et al.* [2005], utilizando a mesma técnica, apresentaram perfis semelhantes de matéria seca, quando comparados aos rotíferos e *Artemia* sp, mas níveis de proteína inferiores às quantidades presentes nos alimentos vivos. Entretanto, o comportamento funcional apresentado por essas micropartículas, incluindo insolubilidade em água, altos rendimentos de encapsulação, digestibilidade da proteína encapsulada frente à tripsina (ensaios *in vitro*) e perfis de liberação, com retenção de proteína de quase 90% após 4 horas de imersão em água, mostraram potencialidade para a substituição do alimento vivo. O aprimoramento de formulações balanceadas, a avaliação de liberação/retenção de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos de baixa massa molar e ensaios *in vivo* das micropartículas são necessários para melhorar a retenção dos materiais encapsulados e as características nutricionais da micropartícula diante das necessidades das larvas.

Este estudo descreve a metodologia de preparo, morfologia, distribuição de tamanho, curvas de liberação, hidratação e digestibilidade *in vitro* de dietas microparticuladas feitas por gelificação iônica, utilizando matriz de pectina reticulada com íons cálcio. Essas dietas possuem formulação baseada na composição de náuplios de *Artemia* e têm como objetivo reduzir o uso do alimento vivo durante o estágio larval de peixes altriciais. Para testar sua eficiência foram avaliadas a sobrevivência e o desempenho de crescimento em larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo das dietas

2.1.1 Obtenção das matérias-primas

A gordura de peixe foi utilizada como fonte lipídica nas dietas e extraída de exemplares de pacu adulto (*Piaractus mesopotamicus*) a partir de cortes feitos no corpo do peixe (eviscerado) em cubos pequenos e imersão dos pedaços em água destilada, aquecida a 80°C, para fusão e liquefação da gordura. A massa foi prensada e filtrada para extração do caldo e separação de fases: gordura e água. A a gordura foi retirada do sobrenadante e novamente aquecida com água destilada. Após o resfriamento, a gordura solidificada e foi separada e armazenada em *freezer*.

O concentrado protéico de peixe usado como fonte protéica foi extraído a partir de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) adultas, variedade Supreme, obtidas no pesqueiro comercial Planet Fish (Campinas, SP). Os peixes foram abatidos, eviscerados, filetados e, em seguida, realizada a extração das proteínas (pré *rigor mortis*), com algumas modificações no método de SOBRAL e MONTERREY-QUINTERO [2000], sem descarte do sobrenadante. A moagem foi feita num *cutter* e a pasta foi passada em peneira fina (ABNT 30-0,59 mm), com o intuito de eliminar o tecido conectivo. A solução resultante, contendo as proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares foi congelada com nitrogênio (N_2) líquido e liofilizada.

Os náuplios foram utilizados como parte da substituição da fonte protéica das dietas e obtidos de cistos de *Artemia* sp (Inve, Bélgica), hidratados em água doce por 2 horas em forte aeração, submetidos à solução de hipoclorito de sódio por 5 minutos (2% w/v), depois concentrados em peneira (malha 0,25 mm) e lavados em água corrente para remoção do hipoclorito. Os cistos descapsulados foram incubados em água salinizada (12 g/L) com forte aeração e iluminação na temperatura de 28°C±0,2, por um período médio de 16 horas, depois concentrados novamente em peneira, sendo congelados e liofilizados.

A astaxantina foi utilizada na tentativa de realçar a cor e o sabor das micropartículas. Foi extraída a partir da casca seca de camarão sete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*), fornecida pela comunidade de pescadores da cidade de Ubatuba (Ubatuba, SP). A extração foi feita em óleo de soja, pela adição de 2 partes de casca em 1 parte de óleo (p/p), seguindo o método de CHEN & MEYERS [1982]. A mistura foi agitada e aquecida (90°C) por 30 minutos, centrifugada (12.000 *g*/4°C/10 min) e fração oleosa separada.

2.1.1.1 Caracterização da matéria-prima

A gordura de peixe extraída foi analisada em relação ao teor de lipídeos totais [BLIGH & DYER, 1959], índice de peróxidos [AOCS NP-90], perfil de ácidos graxos em cromatografia gasosa [A.O.A. C., 1998], umidade e cinzas [A.O.A.C., 1998].

O concentrado protéico de peixe foi analisado em relação à composição centesimal [A.O.A.C ,1998], solubilidade em água [MORR, *et al*., 1993], distribuição de massa molar (eletroforese em SDS-PAGE) e composição de aminoácidos [WHITE *et al.,*1986; HAGEN, *et al., 1989*].

Os náuplios liofilizados foram caracterizados pela sua composição centesimal em proteínas [KJELDAHL, fator 6,25x], lipídeos [BLIGH & DYER, 1959], cinzas e umidade [A.O.A.C ,1998].

2.1.1.2 Perfil de ácidos graxos da gordura de pacu

Os ácidos graxos foram esterificados com metanol, usando como catalisador o trifluoreto de boro (BF_3). Após a metilação, os ésteres metílicos foram conservados a 4ºC, até a sua análise. O perfil de ácidos graxos foi determinado utilizando cromatógrafo a gás (CG6000, Veja Serie 2 Carlo Erba) com detector de ionização de chama (FID) e injetor *split*. Os compostos foram separados em uma coluna capilar HP - SIMDIST (15m x 0,53mm x 0,15µm, J & W - Scientific) nas condições de operação: temperatura do detector = 350ºC, injetor = 300ºC, gás Hélio para arraste = 10 mL/minuto; programação de temperatura: 140ºC, 8°C/min, 360°C/10 min. A composição

qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos de saída com o tempo de retenção do padrão (óleo de algas marinhas comercial - VOTAG, lote 10803V11). A composição quantitativa foi feita por normalização de área, sendo expressa como porcentagem em massa.

2.1.1.3 Eletroforese em SDS-PAGE

A eletroforese foi feita de acordo com LAEMMLI [1970] e SVASTI & PANIJPAN [1997], conduzida em gel 10% (SDS-PAGE) a 120 V, com amostras de 0,1mg de proteína dispersas em tampão redutor (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 5% de ß-mercaptoetanol; 20% glicerol; SDS 10%; azul de bromofenol 0,1%) e desnaturadas a 95ºC por 5 min. A análise foi conduzida em um sistema miniprotean II (Biolaboratories Ltda, cod.165-2940) com gel de 0,75mm de espessura. O gel foi corado em solução contendo metanol (40%), ácido acético (10%) e comassie Brilhant Blue - G250 (0,1%), sendo o excesso de corante removido com a mesma solução, sem o corante. As massas molares das bandas observadas foram estimadas por comparação com padrão de massa molar contendo fosforilase b (97kDa), albumina serina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29KDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), lizozima (16,5kDa) e aprotina (6,5kDa) (padrões, BIO RAD).

2.1.2 Produção das dietas microparticuladas

Antes do preparo das dietas, foram feitos ensaios preliminares na tentativa de ajustar a composição das dietas ao perfil nutricional dos náuplios de *Artemia*, em base seca, em relação ao teor de proteínas, lipídeos e matéria seca. Entretanto, tomou-se o cuidado de manter os mesmos níveis de pectina e solução de cloreto de cálcio, responsáveis pela formação da matriz da micropartículada, utilizados para geração das micropartículas em sistemas modelos produzidos anteriormente como protótipos desse estudo (Capítulo 2).

Para formação da micropartícula foi utilizada uma solução de pectina (2% p/p) e uma solução de cloreto de cálcio dihidratado (2%p/p) contendo proteína em igual concentração ao da solução formadora das micropartículas. Os recheios foram compostos por duas dietas experimentais, diferentes na fonte de proteína utilizada. A dieta denominada **DM**, continha como fonte protéiica somente proteína de peixe, enquanto que a dieta **DMA** foi composta por 80% de proteína de peixe mais 20% de proteína de *Artemia sp* como substituta da fonte protéica. Na formulação das dietas também foi considerada tanto a contribuição de lipídeos presentes no concentrado protéico de peixe, como os provindos da *Artemia*. As formulações das dietas se encontram na Tabela 13.

Tabela 13. Composição percentual das dietas experimentais em base seca.

Ingredientes (%)	**Dietas**	
	DM	***DMA***
Concentrado protéico de peixe	66,0	50,0
Náuplios de *Artemia* liofilizados	-	16,0
Gordura de peixe	8,2	8,2
Ácido esteárico [a]	3,6	4,0
Astaxantina	0,4	-
Pectina cítrica [b]	20,0	20,0
Mistura mineral [c]	1,0	1,0
Outros [d]	0,8	0,8

[a] ácido esteárico (Vetec, São Paulo, Brazil); [b] pectina cítrica – (baixo teor de metoxilação: 26-30%, grau de amidação: 15- 21%, Citrus Colloids S/A); [c] Mistura mineral (Níveis/Kg do produto) - Fe,40mg; Cu, 8mg; Mn, 70mg; Co, 0,5mg; I, 2mg; Se, 0,2mg e Zn, 50mg.[d] – surfactantes: monoestearato de sobitana (S60, Dhaytan, São Paulo), triestearato de sorbitana (TS60 Dhaytan, São Paulo) e poliglicerol polirricinoleato (PGPR - Dhaytan, São Paulo).

As dietas microparticuladas foram produzidas de acordo com MUKAI-CORRÊA *et al*. [2004], com adaptações. A solução polissacarídica e a mistura lipídica (gordura de peixe/ácido esteárico: 70/30 p/p, respectivamente) foram aquecidas individualmente a 60ºC e combinadas à solução de proteínas, sendo homogeinizadas (ultraturrax IKA – 14.000 rpm/1 min) e pulverizadas na solução iônica. Após o banho iônico, as dietas foram transferidas para uma peneira (ABNT 30 - malha 0,125mm), lavadas com água destilada e secas em liofilizador (Edwards Pirani 501). A proteína de peixe foi previamente solubilizada em pH 4,0 com ácido citrico 1N (p/p), seguido de adição de Premix (1 g/100 g de solução). A mistura lipídica teve a adição de monoestearato de sorbitana + triestearato de sorbitana (5g/100 g de lipídeos) e a solução de pectina adição de poliglicerol polirricinoleato (1g/100 g de solução). A dieta DM teve a substituição de 5% da gordura de peixe pelo óleo de astaxantina, numa tentativa de realçar a cor e o sabor dessa dieta.

Para o ensaio de liberação das proteínas, as dietas foram separadas em peneira (ABNT 30 - malha 0,125 mm), sendo utilizada somente a fração retida na peneira e, para os ensaios de crescimento e sobrevivência, as dietas foram fracionadas nos tamanhos: 150 a 350 µm; 350 a 650 µm; 650 a 850 µm para alimentação das larvas, conforme seu estágio de desenvolvimento; e estocadas a - 20°C até o momento da utilização.

2.1.2.1 Caracterização físico-química

2.1.2.2 Composição centesimal

As micropartículas foram caracterizadas em relação ao conteúdo total de proteína, umidade, cinza, segundo A.O.A.C. [1998] e lipídios pelo método de BLIGH & DYER [1959].

2.1.2.3 Distribuição de tamanho e diâmetro médio

O tamanho das partículas úmidas foi determinado por microscopia óptica, com captação de imagens por câmera digital, usando objetiva 12,5X e optovar 1,25X e a utilização do programa Global Lab Image e Scion Image (www.scioncorp.com). A medida do diâmetro foi feita em 300 micropartículas para cada amostra.

2.1.2.4 Morfologia e microestrutura

As morfologias das micropartículas úmidas e secas foram observadas em microscópio óptico NIKON (Eclipse E800, Japão), utilizando-se objetivas de 10X e 20X e captação de imagens pelo *software* Image Pro Plus 4.0 (Media Cibernetics, EUA).

A microestrutura das micropartículas secas foi observada em microscópio eletrônico de varredura (SEM) Jeol (T300, Japão), na voltagem de 10kV. As amostras foram fixadas, presas em "*stubs*" e recobertas com uma fina camada de ouro (40mA/150s) por meio de um evaporador Baltzer (SCD50, Áustria).

2.1.2.5 Capacidade de hidratação

A capacidade de hidratação foi determinada pela alteração do diâmetro médio das micropartículas, após 30 minutos de imersão em água, comparando-se os diâmetros das micropartículas hidratadas em relação aos diâmetros iniciais das micropartículas secas observadas pela captação de imagens em microscópio óptico.

2.1.2.6 Eficiência de encapsulação e perfil de liberação

A eficiência de encapsulação (E.E.) foi calculada através da determinação de proteína remanescente nas micropartículas, após o processo de cura e lavagem, comparado à quantidade inicial presente na solução formadora das micropartículas, sendo expressa em porcentagem (%).

O perfil de liberação das proteínas contidas nas micropartículas úmidas e secas foi acompanhado pela determinação de sua concentração no sistema aquoso durante o

período de 15, 30, 60 e 120 min. Para os ensaios com micropartículas úmidas, pesou-se 3 g de amostra e, para as microcapartículas secas, 0,3 g. As amostras foram colocadas em tubos com tampa, seguida de adição de 20 mL de água destilada e agitadas em agitador rotativo de tubos Phoenix (AP22), na velocidade de 20 rpm/min. Nos tempos definidos anteriormente, o material foi filtrado, determinando-se a quantidade de proteína (Kjeldahl, fator 6,25X) presente na solução. Os ensaios foram feitos em triplicata, utilizando tubos individuais para cada tempo.

A proteína liberada foi calculada pela quantidade determinada em cada tempo de liberação, em relação ao valor de proteína inicial presente na massa da micropartícula, em base seca e expressa em porcentagem.

2.1.3 Ensaios *in vivo* e *in vitro*

2.1.3.1 Desempenho de crescimento e sobrevivência larval

Os ensaios biológicos foram conduzidos no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *campus* Jaboticabal, SP. Larvas de pacu provenientes de um único casal de reprodutores, obtidas por reprodução induzida, foram estocadas em tanques (100 litros) com aeração e circulação de água contínua, pH médio de 8,1±0,3 e temperatura de 29,5±1 ºC, na densidade de 5 larvas/L, totalizando 500 larvas/tanque, e alimentadas à vontade com náuplios de *Artemia* até alcançarem peso médio de 10 mg [JOMORI, 2005]. Após esse período, as larvas foram contadas individualmente e distribuídas em 20 tanques de polietileno, na densidade de 10 larvas/L, totalizando 300 larvas/tanque. Os tanques eram abastecidos com água proveniente de poço artesiano, em fluxo contínuo, aeração artificial constante, com temperatura média de 30±2ºC. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, constituído de 5 tratamentos com 4 repetições e duração de 25 dias. Foram testados os seguintes tratamentos: **A** - larvas alimentadas somente com náuplios de *Artemia* recém eclodidos, Instar I (controle positivo); **J** - larvas mantidas em jejum por todo o período experimental (controle negativo); **DM** - larvas alimentadas com a dieta DM; **DMA** - larvas alimentadas com a

dieta DMA; **DMC** - larvas alimentadas com dieta comercial (dados fornecidos pelo fabricante: tamanho: 400 e 700µm, 55% de proteína, 10% de lipídeos e 13% de cinzas).

O experimento teve início com a substituição do alimento vivo pelas dietas microparticuladas (tratamentos **DM**, **DMA** e **DMC**), com exceção do tratamento **A**, que recebeu o alimento vivo durante todo o período experimental. A substituição foi feita por meio de uma fase de alimentação conjunta de náuplios de *Artemia* + dieta por 3 dias consecutivos, com início de 2000 náuplios/Larva, e diminuição gradual do alimento vivo, até sua substituição total (1500 náuplios/Larva no 2° dia, 500 náuplios/Larva no 3°dia). A quantidade de dieta administrada nessa fase foi de 4mg/Larva. Após a transição alimentar, a quantidade de *Artemia* e dieta fornecidas às larvas foi corrigida a cada 5 dias, com aumento de 1000 náuplios/larva para o tratamento A (início de 2000 náuplios/larva) e 2 mg de dieta/Larva para os tratamentos DM, DMA e DMC. A quantidade de dieta fornecida foi calculada baseada no peso seco do náuplio (0,2 µg) e na quantidade em peso oferecida de náuplios. A porção alimentar total diária foi dividida em 5 refeições diárias. Os tanques eram sifonados diariamente para retirada dos resíduos remanescentes em seus fundos. A temperatura era monitorada diariamente pela manhã e à tarde e, periodicamente, os valores de pH, oxigênio dissolvido e condutividade da água.

O desempenho de crescimento das larvas foi avaliado através de quatro biometrias realizadas no 1°, 7°, 12°, 19°, 25° dias de experimento, com amostras de 20 larvas por tanque, medindo-se o comprimento total (mm) e o peso individual (mg). No primeiro dia de experimento foi realizada uma biometria com 50 larvas e no 25º dia, a última biometria, precedida pela contagem total das larvas remanescentes em cada repetição, para determinação da taxa de sobrevivência, biomassa final e taxa de crescimento específico (TCE), conforme as seguintes expressões:

Taxa de sobrevivência = n° final de larvas x 100/n° inicial de larvas - n° de larvas sacrificadas para análises;

TCE = 100 x ((*Ln* peso final – *Ln* peso inicial)/período em dias);

Biomassa = número final de sobreviventes × peso médio final

Para medida do comprimento utilizou-se microscópio estereoscópico (SZ51, Olympus, Japão), dotado de ocular micrométrica e paquímetro digital, e, para avaliação do peso dos animais, a balança analítica.

2.1.3.2 Taxa de ingestão

A taxa de ingestão, definida como a incidência de larvas que comeram as dietas microparticuladas, foi determinada pela observação do conteúdo do intestino de 10 larvas, por intermédio de um microscópio óptico (CX31 Olympus, Japão), pela detecção da presença ou ausência das dietas. A avaliação foi feita em 3 etapas de desenvolvimento: I – larvas com 6mg de peso; II – larvas com 15mg; III – larvas com 25 mg de peso. As larvas eram colocadas em recipientes opacos (10 larvas/120mL/unidade), submetidas a um jejum de 12 horas e depois oferecidas, em recipientes distintos, as dietas DMC, DMA e DM à vontade. Após 30 minutos, as larvas foram sacrificadas e analisadas, sendo a taxa de ingestão expressa pela porcentagem de larvas que ingeriram a dieta, no período de 30 minutos.

2.1.3.3 Digestibilidade *in vitro*

A digestibilidade das amostras foi avaliada pelo grau de hidrólise da proteína (LEMOS *et al*., 2004; NANKERVIS e SOUTHGATE, 2006), com o uso de mistura de enzimas comerciais: tripsina (Sigma T0134), quimiotripsina (α-quimiotripsina, Sigma C-4129); e o uso de um titulador automático (pHStat - Mettler Toledo DL25). As enzimas foram dispersas em água deionizada gelada (1,6 mg de proteína/mL de tripsina e 3,1mg/mL de quimiotripsina), mantidas em banho gelado até o momento de seu uso e o pH ajustado para 8,0 com solução NaOH 0,1N. Antes de iniciar a reação de hidrólise, as amostras foram dispersas em 50mL de água destilada (6,25mg de proteína/mL), o pH ajustado para 8,0 (solução NaOH 1N), e depois mantidas por 1 hora sob agitação. A hidrólise teve início com a adição de 5 mL da solução de enzimas e foi interrompida após 60 minutos de corrida. A temperatura foi de 30°C e todas as medidas feitas em

triplicata. O grau de hidrólise foi calculado segundo ADLER-NISSEN [1986], pela equação:

$$GH = \frac{h}{h_{total}} \times 100 \quad = \frac{B \times N_b}{MP \times \alpha \times h_{total}}$$

onde h_{total} é o número total de ligações peptídicas antes da hidrólise, *B* é o volume do álcali consumido (mL), N_b é a normalidade da solução do álcali (N), *MP* é a massa protéica do substrato (g) e *α* é a média dos grupos α-NH_2 liberados durante a hidrólise.

2.1.4 Análise estatística

Para verificar diferenças significativas entre os valores obtidos para os perfis de liberação protéica, para digestibilidade *in vitro* e para os resultados de crescimento e sobrevivência, utilizou-se ANOVA através do programa Statistica® 5.5 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Nos resultados que apresentaram diferenças significativas ($P<0,05$), as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey. Todas as variáveis biométricas foram submetidas ao teste de Barlett para verificação da homocedasticidade das variâncias. Os dados de sobrevivência sofreram transformação y = arc sen$\sqrt{x}/100$, onde x foi o valor da porcentagem de sobrevivência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização da matéria-prima

3.1.1 Gordura de peixe

As análises realizadas na gordura de peixe mostraram condições satisfatórias para o seu uso como fonte nutricional lipídica. Como mostra a Tabela 14, o índice de peróxido que mede o estado de oxidação de óleos e gorduras foi baixo (2,5%), indicando pouca oxidação da gordura.

Tabela 14. Caracterização do Índice de peróxido (mg/100g), cinzas (%) e umidade (%) da gordura de pacu extraída. Valores médios e respectivos desvios padrão.

Análise	Resultados
Índice de peróxido(mg/100g)	2,5 ± 0,4
Cinzas (%)	0,02 ± 0,01
Umidade (%)	5,5 ± 0,3

O perfil de ácidos graxos, conforme a Tabela 15, apresentou alto teor de ácidos graxos saturados em sua composição (34,8%), com maior quantidade do ácido palmítico (22%). Os ácidos poliinsaturados foram representados pela maior parte dos ácidos linoléico (15%) e linolênico (1,5%) e os ácidos graxos altamente insaturados aparecem em quantidade muito pequena (valores individuais menores do que 1%). Resultados semelhantes para a composição de ácidos graxos do pacu foram encontrados por MAIA *et al*. [1995].

De acordo com PORTELLA *et al.* [2002], os peixes de água doce necessitam tanto de ácidos graxos da família dos linolênicos (LNA, 18:3 n-3) como dos linoléicos (LA, 18:2 n-6) e araquidônico (AA, 20:4 n-6) e, a partir deles, sintetizam, por dessaturação, os ácidos graxos ômega-3, principalmente o EPA, para suprir seus

requerimentos [SARGENT *et al.*, 1999]. No caso do pacu, o ácido graxo linoléico é considerado essencial.

Tabela 15. Perfil de ácidos graxos dos lipídeos totais da gordura de pacu. Os valores médios foram obtidos a partir da duplicata da amostra e expressos em porcentagem de área.

Ácidos graxos	Nomenclatura	Gordura Pacu (%)
14:0	Mirístico	1,5±0,02
15:0	Pentadecaenóico	0,2±0,01
16:0	Palmítico	22±0,1
16:1n-7	Palmitoléico	5,4±0,02
17:0	Margárico	0,5±0,01
17:1	Heptadecaenóico	0,3±0,02
18:0	Esteárico	10,1±0,05
18:1n-9	Oléico	38,2±0,1
18:2n-6	Linoléico	15,0±0,08
18:3n-3	Linolênico	1,5±0,04
20:0	Araquídico	0,2±0,02
20:1n-9	Gadolênico	1,3±0,02
20:2n-6	Eicosadienóico	0,7±0,02
20:3n-9	Eicosatrienóico	0,9±0,01
20:4n-6	Araquidônico	0,7±0,02
20:5n-3	Eicosapentaenóico	0,30±0,01
22:6n-3	Docosahexaenoico	0,2±0,01
22:5n-6	Docosapentaenóico	0,1±0,01
saturados		34,8
monoinsaturados		43,6
poliinsaturados		18,5

3.1.2 Concentrado de proteínas de peixe (CPP)

O CPP mostrou boa concentração de proteínas (77%) e uma quantidade de gordura (4,78%) geralmente encontrada em concentrados protéicos de peixe. Segundo CANDIDO [1998] e SOBRAL & MONTERREY-QUINTERO [2000], a composição dos

concentrados protéicos de peixe pode variar amplamente, dependendo do tratamento a que são submetidos, cujos valores esperados variam de 0,5 até 5,0% de gordura total. Baixos valores lipídicos e altas concentrações de proteínas são alcançados quando há a remoção da gordura com o uso de solventes, entretanto, essa técnica não foi utilizada. Além disso, a remoção da gordura poderia alterar as características organolépticas, como cheiro e sabor, do concentrado protéico de peixe e, por sua vez, das dietas microparticuladas. Adicionalmente, a gordura oriunda desse concentrado ainda poderia complementar o balanço nutricional como fonte lipídica.

A Figura 19 ilustra o perfil de aminoácidos obtido do concentrado protéico de peixe e o padrão de aminoácidos considerados essenciais em dietas para larvas de peixes, segundo BASKERVILLE-BRIDGES [2000]. Em comparação ao padrão de aminoácidos considerados essenciais, os presentes no concentrado protéico apresentaram valores superiores ao padrão, com exceção dos valores de leucina, valina e triptofano, não determinado neste estudo. Os resultados do aminograma indicam uma grande quantidade de aminoácidos polares ionizados (arginina, asparigina, glutamina, histidina e lisina) e não-ionizados (ácido aspártico, cisteína, glicina, treonina e serina), com maiores concentrações presentes de treonina (7,6 %), arginina (6,0%), ácido aspártico (5,68) e cistina (5,51%). Segundo SOBRAL & MONTERREY-QUINTERO [2000], esses aminoácidos são responsáveis pela hidrofilicidade das proteínas e contribuem para a alta solubilidade em água em condições de baixo pH. A curva de solubilidade obtida, apresentada na Figura 20, indica que uma maior solubilidade das proteínas do concentrado protéico de peixe foi observada em condições de baixo pH (<4,0).

A maior solubilidade em água das proteínas do concentrado foi observada em pH 3,5, atingindo valores próximos de 60%. Uma solubilidade mínima foi observada no pH 5,5 e, acima dessa faixa de pH, observou-se um ligeiro aumento da solubilidade, indicando que pH 5,5 representa proximidade do ponto isoelétrico. Os resultados apresentados por CANDIDO *et al.* [1998] e SOBRAL & MONTERREY-QUINTERO [2000], também mostraram um perfil semelhante de solubilidade para proteínas miofibrilares obtidas a partir de tilápias.

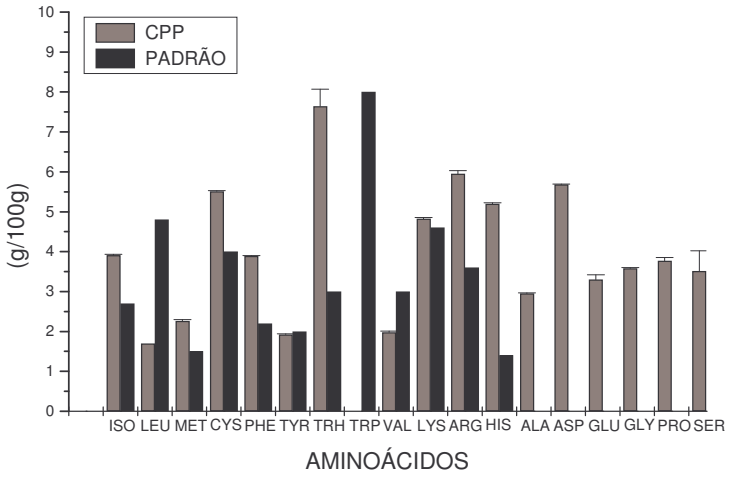


Figura 19. Perfil de aminoácidos totais (g/100 g de proteína) do concentrado protéico de peixe (CPP), comparado ao padrão utilizado em dietas para larvas de peixe [BASKERVILLE-BRIDGES 2000]. As barras indicam os desvios padrão obtidos da triplicata da amostra.

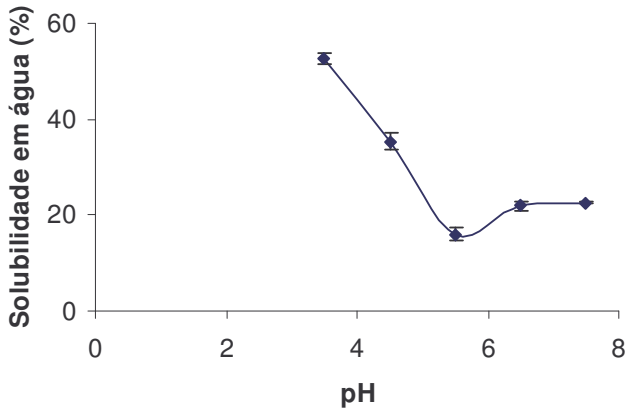


Figura 20. Solubilidade em água (%) do concentrado de proteínas liofilizado em função do pH.

A Figura 21 mostra as bandas protéicas observadas do concentrado protéico de peixe e de um padrão de proteínas correspondentes às massas molares obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida. O perfil das amostras (1 e 2) do concentrado indicou a presença de diversas bandas protéicas, identificadas com as letras: a, b, c, d, e, f, g, h, e i. Comparando-se o perfil apresentado das amostras 1 e 2 ao perfil do padrão de proteínas, podemos observar duas bandas protéicas, identificadas como a e b, situadas entre 97 kDa (padrão fosforilase b) e 66 kDa (padrão albumina sérica). A banda protéica c parece ter uma massa molar de 45kDa, similar ao padrão ovoalbumina e a banda d massa molar entre 20kDa (padrão inibidor de tripsina) e 16,5 kDa (padrão lisozima). As bandas e, f, g, h e i, apresentam massas molares entre 16,5 kDa e 6,5 kDa (padrão aprotina). A maior parte das frações protéicas das amostras do concentrado parece ser de baixa massa molar, pois apresentam maior intensidade das bandas, entre 16,5 kDa e 6,5kDa. De modo geral, a massa molar das proteínas variou de 6,5 kDa a 97kDa.

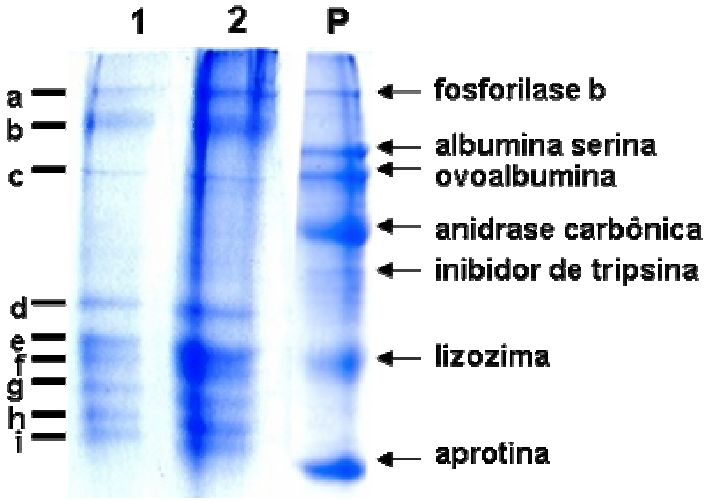


Figura 21. Eletroforese em gel SDS-PAGE do concentrado protéico de peixe: 1 e 2 – amostras do concentrado protéico; P - padrões de peso molecular; a,b,c,d,e,f,g,h e i – bandas protéicas observadas.

3.2. Produção das dietas

3.2.1 Caracterização físico-química

Como mencionado no item 2.1.2., ensaios preliminares foram feitos no sentido de estudar-se a capacidade de armazenar proteínas nas micropartículas, através de sistemas que produzissem uma boa eficiência de encapsulação. Os ensaios utilizaram a mesma proteína estudada nos sistemas modelos (Capítulo 2), isolado protéico de soro leite, como modelo de proteínas. Após essa etapa, foi feito o ajuste, em relação à quantidade de matéria seca, lipídeos, carboidratos e sais minerais, baseado na composição centesimal dos náuplios de *Artemia sp*. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 16. Quando foi empregada uma concentração de proteína para fabricação da microcápsula de 50% (MC50), obteve-se valores de eficiência de encapsulação (E.E.) de proteínas inferiores a 60%. O mesmo efeito foi observado quando a concentração de proteína foi elevada para 60% (MC60), apresentando valor da E.E. de 50%, indicando que pelo menos metade da proteína foi perdida durante o processo de fabricação das micropartículas.

Tabela 16. Valores médios percentuais de eficiência de encapsulação (E.E.), proteínas, lipídeos e matéria seca total. O valor estimado (V.E) representa o valor teórico do composto (proteína, lipídeo ou matéria seca) na formulação e o valor experimental (EXP) representa o resultado obtido dos ensaios em triplicata.

Ensaio	E.E.	Proteína (%)		Lipídeos (%)		Matéria seca (%)	
		V.E	***EXP***	***V.E***	***EXP***	***V.E.***	***EXP***
MC50*[1]	59,3	50	29,67±0,25	20	28,39±0,06	10	7,01±0,08
MC60*[2]	50,1	60	30,05±0,15	20	27,59±0,01	10	8,62±0,08
MC65*[3]	93,4	65	60,72±0,19	15	18,84±0,01	10	10,03±0,16

*[1] MC50 = micropartículas preparadas com 50% de proteína total. *[2] MC60= micropartículas preparadas com 60% de proteína total. *[3] MC65= micropartículas preparadas com 65% de proteína total na solução formadora das micropatículas e na solução iônica.

Já no ensaio com a adição da proteína na solução iônica (MC65) em igual concentração à solução formadora das micropartículas a E.E. mostrou-se alta, maior que 90%, mantendo também os níveis de lipídeos e matéria seca muito próximos do valor estimado (calculado). Assim, a formulação do ensaio MC65, que teve a adição de proteína também na solução iônica, mostrou-se adequada à substituição do sistema modelo pela dieta real, posteriormente utilizada nos experimentos *in vivo* e *in vitro*. A substituição do isolado protéico de soro de leite, fonte proteíca do ensaio MC65 (Tabela 16), pelas dietas formuladas DM e DMA Tabela 13, item 2.1.3) foi realizada com sucesso, apresentando como resultados altos valores de eficiência de encapsulação, 97 e 100%, respectivamente, e composição centesimal protéica e lipídica mais baixas que a composição dos náuplios de *Artemia*. A quantiadade de cinzas mostrou-se acima do valor observado para a *Artemia* e a quantidade de matéria seca um pouco abaixo, conforme mostra a Tabela 17. A Tabela também mostra os resultados da composição dos náuplios de *Artemia* utilizados como matéria-prima na fabricação da dieta micropartículada DMA.

Tabela 17. Composição centesimal percentual das dietas microparticuladas e dos náuplios de *Artemia* expressos em base seca.

Composição	*Artemia*[1]	DM[2]	DMA[3]
E.E. (%)	-	97,10±0,30	100,0±1,63
Proteína (%)	60,22±1,11	51,70±1,63	48,20±0,24
Lipídeos (%)	19,00±1,42	15,80±0,27	18,69±0,11
cinzas (%)	2,50±0,20	9,3±0,32	10,25±0,56
Matéria seca totais (g/100g)	16,50±0,82	12,90±0,20	12,25±0,23

[1] náuplio de *Artemia* liofilizado; [2] DM = dieta micropartículada;[3] DMA = dieta micropartículada contendo náuplios de *Artemia*.

3.2.1.1 Distribuição de tamanho e diâmetro médio

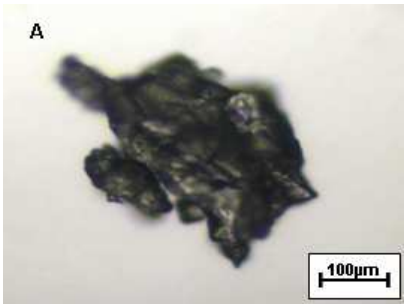
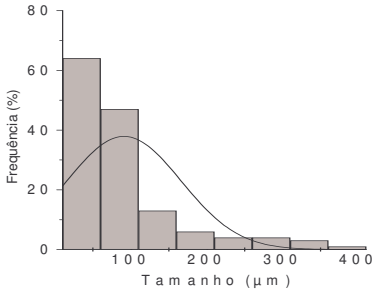
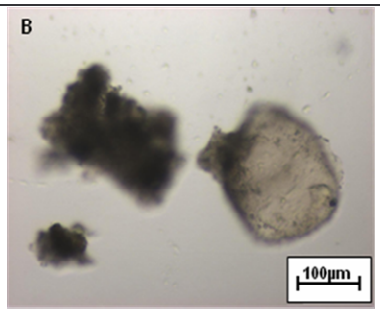
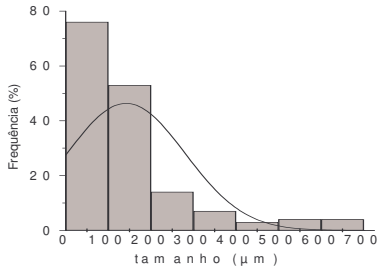
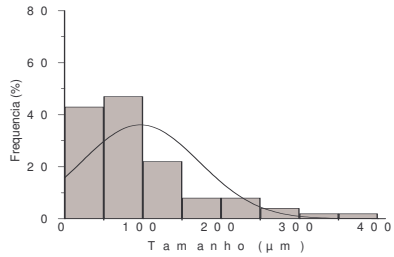
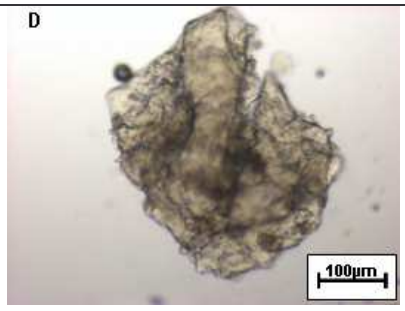
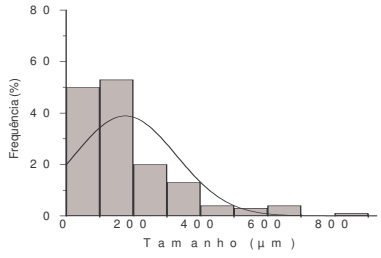
A Tabela 18, que apresenta a distribuição de tamanho das dietas microparticuladas, mostra uma distribuição unimodal tanto para as dietas hidratadas como para secas. As dietas DM e DMA, depois de secas, apresentaram em média um diâmetro menor e maior concentração de partículas no intervalo entre 50 e 100µm. Após a hidratação em água, a curva normal indicou maior concentração de tamanho no intervalo entre 150 µm e 200 µm e aumento do diâmetro médio de 1,7 vezes para ambas as dietas DM e DMA, em relação ao diâmetro médio seco.

A distribuição de tamanho das micropartículas DM e DMA produzidas abrangeu uma faixa entre 12 e 700 µm, apresentando tamanhos compatíveis ao alimento vivo, rotíferos (80 a 280 µm) e dos náuplios de *Artemias* (350 a 530 µm), comumente utilizados, quando o cultivo de peixes é feito de maneira intensiva. [VILLAMAR E LANGDON, 1993].

Através de imagens obtidas da hidratação (Tabela 18, figura A, B, C, e D) pode-se observar nitidamente o aumento de tamanho das dietas microparticuladas secas e depois de hidratadas. Na captação dessas imagens de hidratação, com o uso de microscópio óptico, observou-se uma mudança instantânea de tamanho após o contato da dieta com a água, causada pela sua rápida entrada na matriz da micropartícula.

A grande alteração de tamanho das dietas secas para dietas úmidas é justificada pela elevada quantidade de água que essas matrizes apresentavam quando úmidas (cerca de 90% de água), perdida durante o processo de secagem e recuperada após o processo de hidratação em água. Conforme a Tabela 19, os diâmetros médios determinados não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$), entre as dietas secas DM e DMA e entre as mesmas hidratadas.

Tabela 18. Aspecto morfológico e distribuição de tamanho das dietas microparticuladas secas e após hidratação.

Tratamento	Morfologia*	Distribuição de tamanho
Dieta micropartículada (DM) *Seca*		
Dieta micropartículada (DM) *Hidratada*		
Dieta micropartículada (DMA) *Seca*		
Dieta micropartículada (DMA) *Hidratada*		

* Morfologia obtida por microscopia ótica das dietas microparticuladas secas e hidratadas. A – partícula da dieta DM seca; B- partícula (DM) hidratada após 5 minutos de imersão em água; C- partícula de dieta DMA seca; D – partícula DMA hidratada.

Tabela 19. Valores de diâmetro médio (µm) das dietas microparticuladas úmidas, secas e hidratadas.

Tratamentos	Diâmetro (µm)*[1]		
	Úmidas	***Secas***	***Hidratadas***
DM*[2]	125,25[a] ± 57,76	83,45[a] ± 44,95	146,33[a] ± 70,34
DMA*[3]	151,96[a] ± 58,32	97,95[a] ± 55,37	165,25[a] ± 68,00

*[1] Média de 300 microcápsulas. *[2] DM = dieta microparticulada formulada; *[4] DMA = dieta microparticulada contendo náuplios de *Artemia* em sua formulação. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

3.2.1.2 Morfologia e microestrutura

A morfologia das dietas microparticuladas, observada por meio de microscopia óptica e ilustrada na Figura 22, revelou sucesso na substituição dos sistemas modelos pelas dietas experimentais reais, como demonstra a boa formação das matrizes e altos valores de eficiência de encapsulação (Tabela 18). As micropartículas apresentaram formas variadas, desde esféricas até amorfas, com conteúdo (recheio) em divisão multinucleada, distribuído uniformemente. Resultados semelhantes à morfologia observada foram apresentados por MUKAI-CORRÊA *et al.* [2004] para microcápsulas produzidas utilizando matriz de pectina como agente encapsulante e conteúdo composto por proteína (caseína) e gordura (gordura vegetal hidrogenada).

Nas observações do conteúdo dessas micropartículas pode-se notar uma elevada quantidade de dieta encapsulada, conforme também observado nos resultados apresentados de composição e eficiência de encapsulação (Tabela 17) dessas dietas.

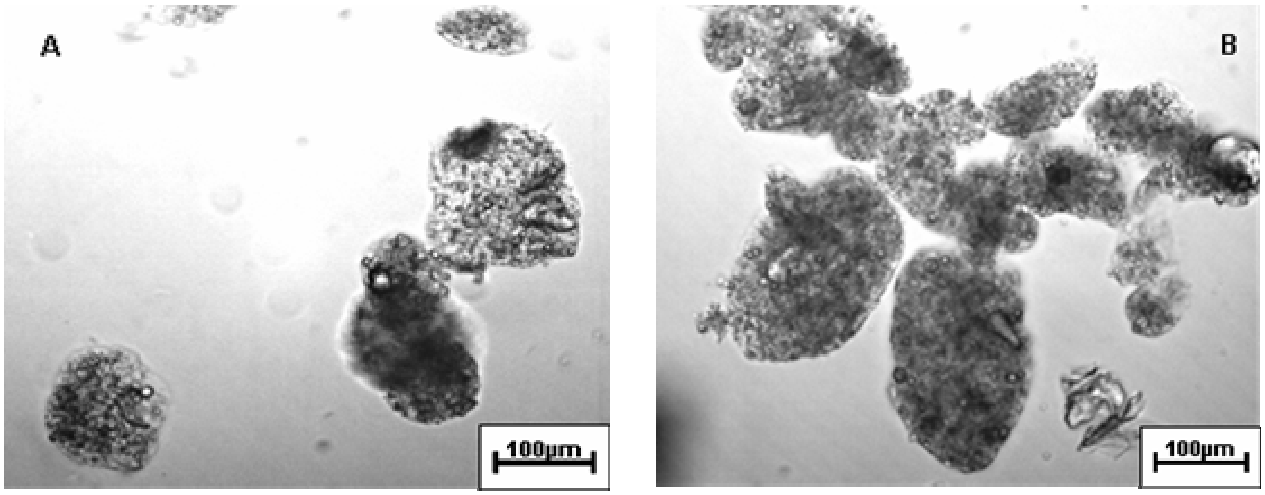


Figura 22. Fotomicrografias da morfologia das dietas microparticuladas, observadas por microscopia óptica. A – Dieta micropartículada (DM); B – Dieta microparticulada contendo náuplios de *Artemia* (DMA). Captação em água em aumento de 12,5X . Barra = 100 µm.

A observação em microscopia eletrônica de varredura, apresentada nas Figuras 23 e 24, mostra que as dietas microparticuladas DM têm tendência a uma forma mais regular que as dietas DMA, mantendo a integridade após a secagem. O detalhamento da superfície das dietas revela uma superfície lisa sem fissuras na dieta DM, e uma superfície lisa, mas com a existência de algumas fissuras na dieta DMA. Por outro lado, ambas as dietas mantiveram sua integridade após o processo de secagem.

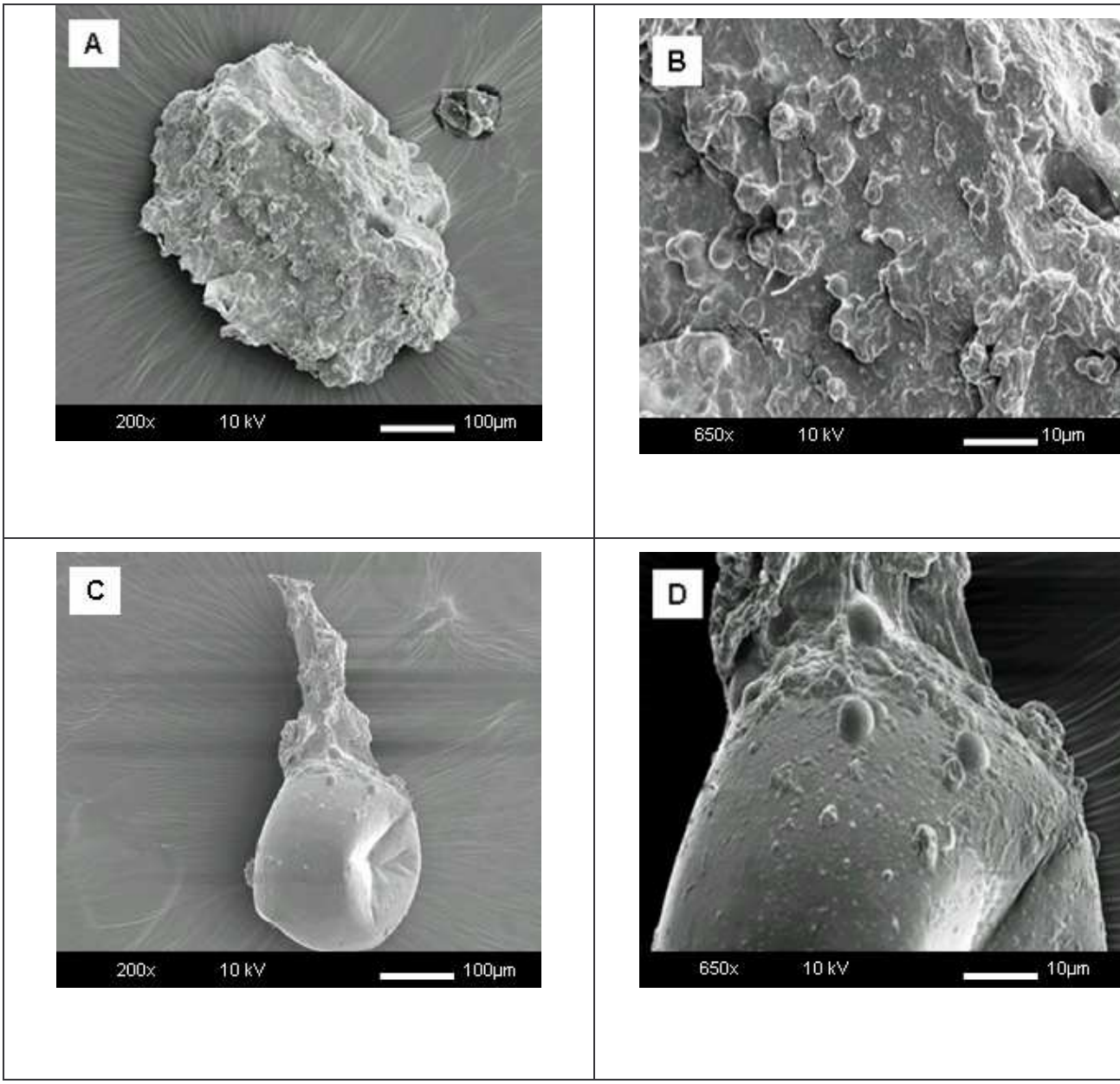


Figura 23. Morfologia externa da dieta microparticulada formulada DM, obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Micrografias A e C – aspecto geral da micropartícula (aumento 200x); B e D – detalhamento da parede da micropartícula (aumento 650x). Barras = 10 e 100 µm.

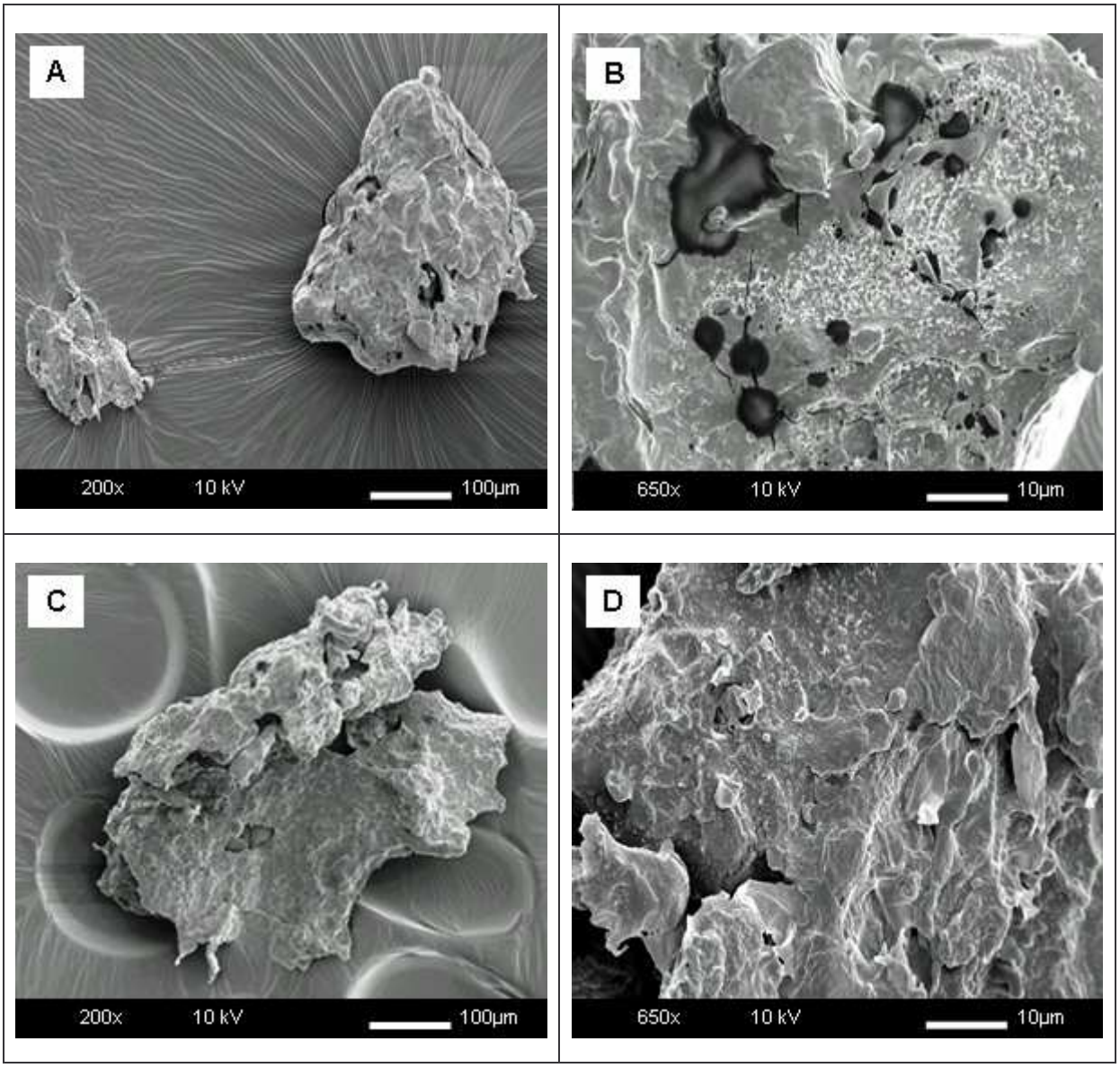


Figura 24. Morfologia externa da dieta micropartículada DMA (contendo náuplios de *Artemia* liofilizados na formulação como substituição parcial da fonte protéica), obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Micrografias A e C – aspecto geral da microcápsula (aumento 200x); B e D – detalhamento da parede da micropartícula (aumento 650x). Barras = 10 e 100 µm.

3.2.1.3 Eficiência de encapsulação e perfil de liberação

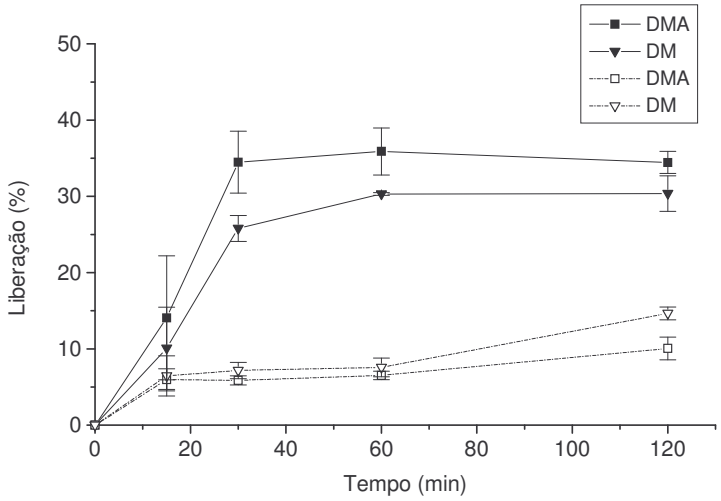


Figura 25. Perfil de liberação da proteína das dietas microparticuladas ao longo do tempo. Os tratamentos DM e DMA com símbolos cheios representam as dietas microparticuladas úmidas e os tratamentos com símbolos abertos, representam as dietas secas.

A Figura 25 apresenta os perfis de liberação ao longo do tempo das dietas microparticuladas úmidas e secas. Nos primeiros 30 minutos de permanência em água, as dietas microparticuladas úmidas DM e DMA apresentaram liberações de 25% e 35% da proteína, respectivamente, em relação à proteína total presente. A diferença de liberação observada, um pouco maior da dieta DMA, pode ser explicada pela presença de maior quantidade de aminoácidos livres oriundos da pequena porcentagem de náuplios de *Artemia* adicionado nessa dieta.

Entre 30 e 120 minutos, a dieta DMA praticamente não apresentou mais liberação da proteína, enquanto a dieta DM apresentou ainda uma pequena liberação. A liberação total de proteína, após 120 minutos de experimento, foi de 30% para a dieta

microparticulada DM e 35% para dieta DMA, com diferença de liberação entre dietas de 5%, sem diferença significativa (p>0,05) entre elas.

Os perfis de liberação das dietas microparticuladas úmidas também apresentaram maior grau de inclinação das curvas de liberação, nos primeiros 30 minutos de experimento, indicando um pequeno efeito *burst.* Como já observado em trabalho anterior [MUKAI-CORRÊA *et al*., 2004], estudando a liberação da proteína em sistemas modelos, em microcápsulas produzidas com a mesma matriz de pectina, o efeito *burst* pode ter ocorrido pela liberação da proteína localizada sobre ou próxima à superfície da micropartícula. Esse comportamento também foi observado por outros autores [COPPI *et al*., 2002; YÚFERA *et al*., 2002; LANGDON 2003] e parece ser provável em microcápsulas fabricadas a partir de biopolímeros, independentemente da técnica de encapsulação empregada. Ainda, no perfil de liberação das proteínas, nota-se uma segunda fase, compreendida entre 30 e 120 minutos, em que a liberação praticamente permaneceu estacionária.

Nas dietas microencapsulas secas DM e DMA, observaram-se perfis semelhantes de liberação, com sensível diminuição da porcentagem de proteína liberada ao longo do tempo, em relação às dietas úmidas. Todos os valores de liberação foram menores que os de dietas úmidas, apresentando cerca de 20% de diferença, após 120 minutos. A liberação média de proteína para ambas as dietas foi de aproximadamente 10%, sem diferenças significativas entre dietas (p>0,05), demonstrando que a maioria das proteínas presentes no concentrado protéico de peixe e nos náuplios, em sua maioria com baixa massa molar (<16KDa), foram retidas nas matrizes. Em estudos realizados nessas matrizes com os sistemas modelos (Capitulo 2), a glicose, composto de baixa massa molar, teve apenas 30% de liberação, após 4 horas de permanência em água. Embora não tenha sido testada a liberação de compostos pequenos como a glicose, após a substituição pelas dietas formuladas, acredita-se que a matriz de gel apresente o mesmo comportamento observado no sistema modelo. Pela eficiência de encapsulação das proteínas utilizadas pode-se ter uma idéia de que tipo e tamanho de compostos serão retidos pela micropartícula, em um determinado período de tempo. Dessa maneira, essas dietas foram capazes de

reter praticamente seu conteúdo inicial de proteínas (90%), mostrando-se satisfatórias para o propósito de servirem como alimento de larvas de peixe.

Os perfis apresentados pelas dietas secas mostraram que tanto a secagem como reidratação não provocaram danos potenciais à matriz de gel da micropartícula, conforme também observado pela análise morfologica obtida por microscopia óptica (Tabela 20 – Figuras A, B, C e D) e microscopia eletrônica de varredura (Figuras 23 e 24). A baixa liberação de proteína observada pode ser explicada pela possível mudança na diminuição no tamanho dos poros da micropartícula ocorrido após a secagem. De acordo com a afirmação de SMIDSROD [1973] citada em MUKAI-CORRÊA [2003], a porosidade de um gel pode ser significativamente reduzida pela secagem parcial das esferas, dificultando a difusão mesmo para pequenas moléculas. Adicionalmente, outro fator importante que está relacionado e foi observado nos ensaios de hidratação (Tabela 20 – Figuras A, B, C e D), é que o inchamento das micropartículas secas, após o contato com a solução aquosa (em razão da absorção de água), pode determinar um controle da taxa de liberação dos compostos encapsulados. CHU & OZKIZILCIK [1996], analisando um complexo microencapsulado com parede protéica, atribuíram as diferenças de taxa de liberação ao tempo de hidratação das microcápsulas, onde um aumento do tempo promoveu uma queda da taxa de lixiviação. Outra hipótese para a redução na liberação observada nas micropartículas secas seria atribuída a alterações físico-químicas que as proteínas possam ter sofrido durante o processo de secagem, diminuindo sua solubilidade em água.

3.3. Ensaios biológicos

3.3.1 Crescimento e Sobrevivência

Os resultados de crescimento das larvas de pacu, em peso e comprimento, obtidos por meio de biometrias, encontram-se representados nas Figuras 26 e 27, respectivamente.

Na primeira biometria, realizada no 7° dia de experimento, não houve diferenças significativas (p>0,05) de crescimento em peso das larvas de pacu, entre os diferentes tratamentos utilizados.

As larvas que permaneceram em jejum (tratamento J) apresentaram crescimento inferior em peso (p<0,05) e em comprimento (p<0,05), quando comparadas às dos demais tratamentos, indicando crescimento superior das larvas dos outros tratamentos, inclusive das que receberam as dietas microparticuladas DM e DMA. A mortalidade total das larvas ocorreu logo depois da segunda biometria realizada no 12° dia de experimento.

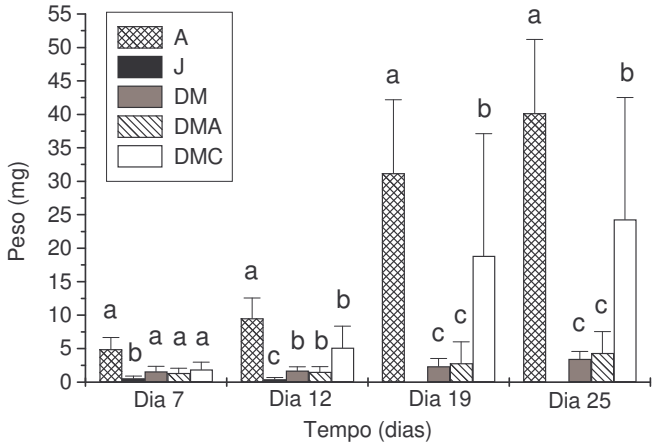


Figura 26. Desempenho de crescimento em peso (g) das larvas de pacu durante o período experimental. A – náuplios de *Artemia*; DM – dieta micropartículada; DMA - dieta micropartículada contendo náuplios de *Artemia*; DMC – dieta comercial. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Entre as larvas do tratamento A, que receberam somente náuplios de *Artemia* como alimentação, o crescimento em peso foi superior (p<0,05) em relação às larvas dos tratamentos em que foram oferecidas as dietas microparticuladas, e essa tendência

se manteve até o final do experimento, tanto para a variável peso (Figura 26), como para o comprimento total (Figura 27).

Entre as larvas dos tratamentos DM, DMA e DMC não foram observadas diferenças de peso ($p>0,05$) até o 12° dia do experimento. A partir do 19° dia, as larvas do tratamento DMC (dieta comercial) apresentaram maior desempenho de crescimento em peso ($p<0,05$), em relação às larvas dos tratamentos DM e DMA que receberam as micropartículas produzidas neste trabalho. Nos resultados de comprimento total observou-se a mesma tendência que o desempenho em peso; entretanto, no 12° dia, já foram notadas diferenças significativas ($p<0,05$) das larvas do tratamento DMC, em relação aos dos tratamentos DM e DMA.

Entre as larvas dos tratamentos DM e DMA não foram observadas diferenças em peso ($p>0,05$) e em comprimento ($p>0,05$) em todas as avaliações biométricas realizadas.

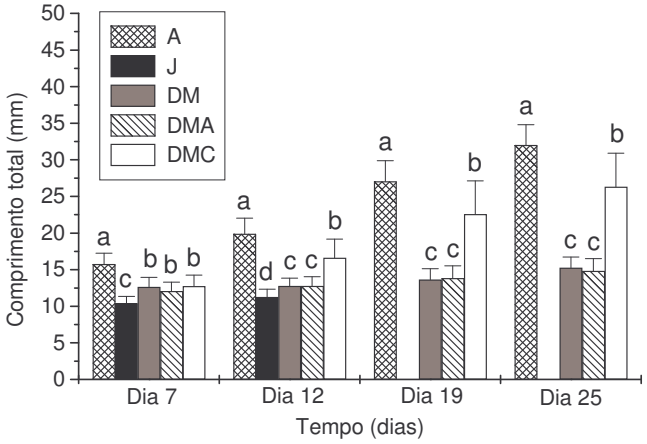


Figura 27. Desempenho em comprimento total (mm) das larvas de pacu, durante o período experimental. A – náuplios; DM – dieta microparticulada; DMA – dieta microparticulada, contendo náuplios de *Artemia*; DMC – dieta comercial. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

O desenvolvimento das larvas durante o período de experimento também é monstrado na Figura 28, de acordo com as biometrias realizadas para cada tratamento. Pela observação das fotografias pode-se notar o crescimento superior das larvas dos tratamentos A e DMC, em relação às larvas do tratamento DM e DMA.

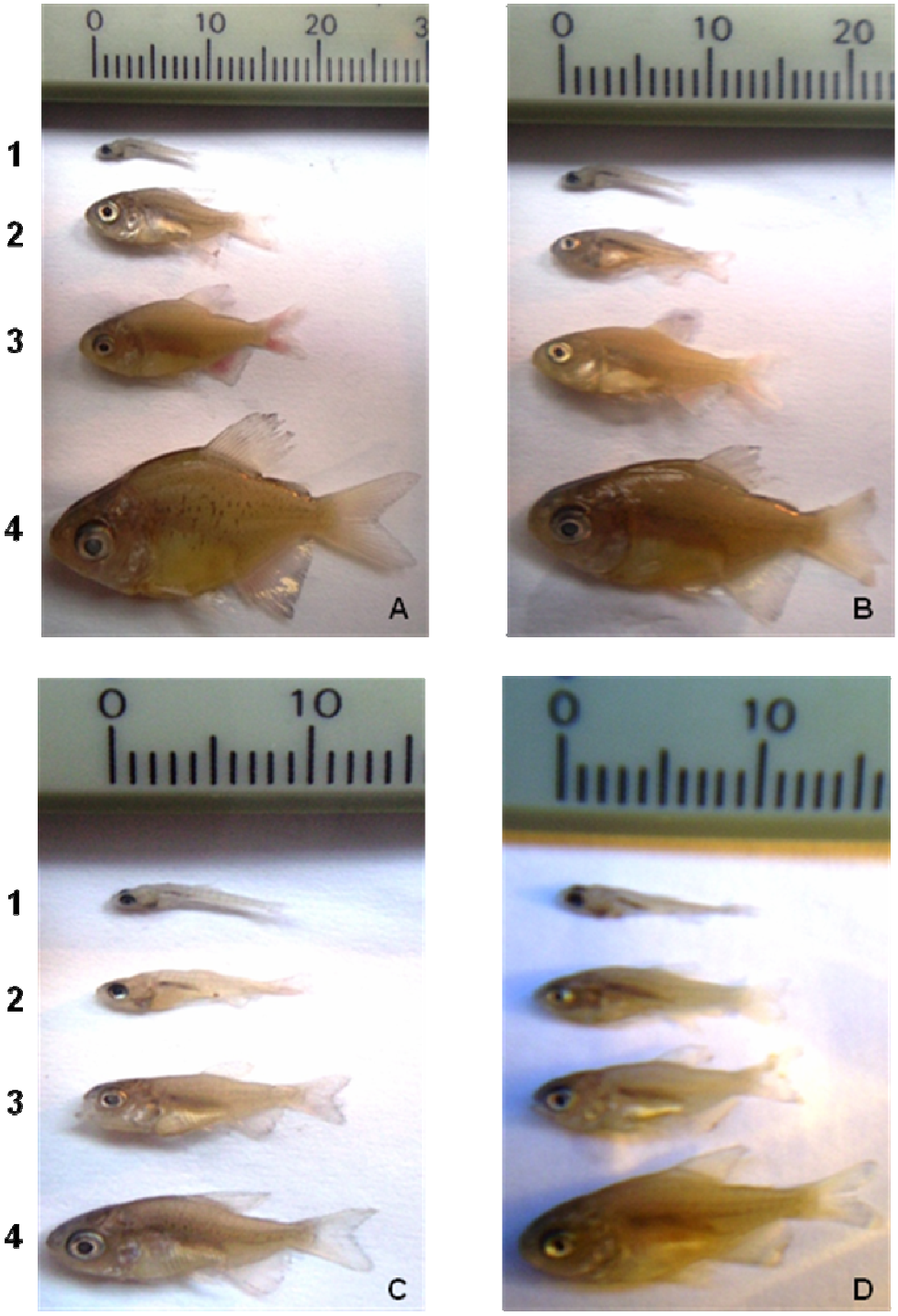


Figura 28. Fotografias de larvas de pacu em diferentes estágios de desenvolvimento, de acordo com as biometrias realizadas. A – tratamento com *Artemia*; B – tratamento com dieta DMC; C – tratamento com dieta DM; D – tratamento com dieta DMA. Os números à esquerda das Figuras correspondem às biometrias realizadas.

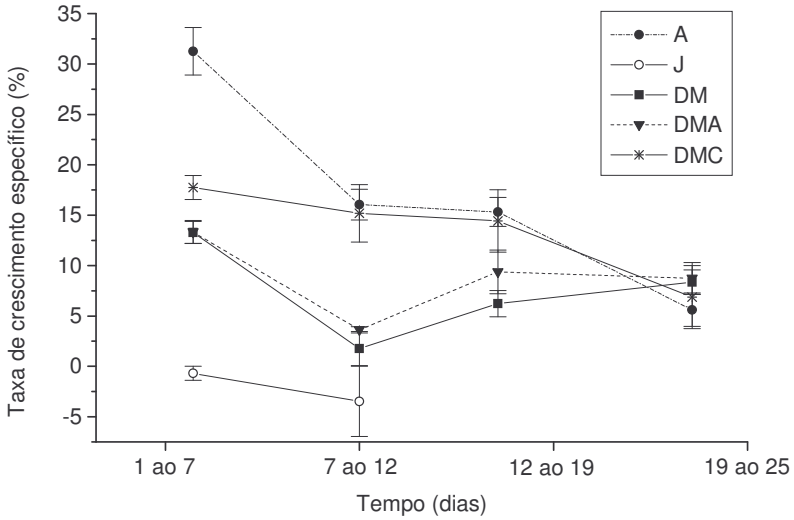


Figura 29. Taxa de crescimento específico (%) das larvas de pacu durante o período experimental dos tratamentos estudados. A – nauplios de *Artemia*; J – jejum; DM – dieta microparticulada; DMA – dieta microparticulada contendo *Artemia*; DMC – dieta comercial.

Na Figura 29 é mostrada a taxa de crescimento específico das larvas de pacu para os diferentes tratamentos alimentares. No início do experimento (entre o 7° e o 12° dia) ocorreu uma diminuição da porcentagem diária de crescimento das larvas de todos os tratamentos, com destaque para o crescimento negativo observado para as larvas do tratamento J, mantidas em jejum. Após o 12° dia houve uma recuperação de crescimento das larvas de todos os tratamentos (entre o 12° e o 19° dia), com exceção ao tratamento J que, como já mencionado, apresentou mortalidade total nesse dia. Nesse mesmo período também se observou que as larvas dos tratamentos A e DMC apresentaram uma diminuição da taxa de crescimento. Em geral, as porcentagens diárias de crescimento das larvas dos tratamentos que receberam as dietas microparticuladas DM e DMA foram menores que dos tratamentos A e DMC, que receberam *Artemia* e dieta comercial, respectivamente, mas apresentaram tendência de

aumento a partir da segunda semana, contrariamente ao observado nos tratamentos A e DMC.

Tabela 20. Valores médios e respectivos desvios padrão de ganho de peso (g), biomassa (g) e sobrevivência (%) das larvas de pacu submetidas aos diferentes tratamentos alimentares, após 25 dias de experimento.

Tratamento	Ganho de peso[1] (g)	Biomassa Final[3] (g)	Sobrevivência %
A	39,60[a] ± 2,93	35,77 [a] ± 1,94	89,03 [a] ± 3,39
DM	2,87[c] ± 0,52	1,64 [c] ± 0,93	47,64 [b] ± 18,69
DMA	3,76[c] ± 1,30	1,83 [c] ± 0,39	42,08 [b] ± 20,67
DMC	23,70[b] ± 3,70	12,14 [b] ± 4,00	50,00 [b] ± 16,93

[1] Ganho de peso = peso final – peso inicial. [2] Biomassa = peso x sobrevivência. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste e Tukey ($p>0,05$). A – *Artemia*; DM – dieta microparticulada; DMA – dieta microparticulada contendo náuplios liofilizados; DMC – dieta comercial.

Através da Tabela 20, que apresenta os valores médios de ganho de peso, biomassa final e sobrevivência das larvas de pacu entre os tratamentos testados, pode-se observar um ganho de peso e biomassa maior nas larvas do tratamento A ($p<0,05$), seguidas do tratamento DMC e pelas larvas dos tratamentos DM e DMA, que não diferiram entre si ($p>0,05$). Apesar de se observar-se uma taxa de crescimento específico ascendente (Figura 29), após o 12° dia, para os tratamentos DM e DMA, esta taxa foi pequena, entre 5 a 10%.

Os resultados da taxa de sobrevivência das larvas (Tabela 20) mostram que as que receberam somente *Artemia* (Tratamento A) apresentaram a maior porcentagem de sobrevivência ($p<0,05$). As larvas dos tratamentos DM, DMA e DMC, que receberam

dietas formuladas, não apresentaram diferenças de sobrevivência entre si ($p>0,05$), apresentando valores médios de porcentagem de sobrevivência ao redor de 50%.

A manutenção da taxa de crescimento, embora pequena, e os razoáveis níveis de sobrevivência observados, indicam que as larvas de pacu conseguiram em algum grau ingerir, digerir e assimilar as dietas formuladas, porém essas, ainda não foram suficientes para suportar um crescimento similar ao do alimento vivo. Resultados de sobrevivência similares aos obtidos no presente estudo foram encontrados por YÚFERA *et al.* [2005] em larvas de *Solea senegalensis* (38,6 e 46,3% para dieta com 55% de proteína e 62% de proteína, respectivamente), alimentadas com micropartículas obtidas com técnica de microencapsulação semelhante. JOMORI [1999] avaliou em larvas de pacu, com diferentes estágios de desenvolvimento, a substituição total de *Artemia* por microdietas, observando taxas de sobrevivência que variaram de 11% a 76%, atribuídas à eficiência da dieta e idade em que se encontravam as larvas. Segundo a autora, dietas inadequadas podem atrasar o ínicio dos mecanismos de secreção do pâncreas e, por sua vez, a síntese de enzimas digestivas [JOMORI, 2005], o que explica os resultados observados com o tratamento com dieta comercial que, apesar da baixa sobrevivência, mostraram um crescimento significativamente maior (Tabela 20) em relação às que receberam as dietas experimentais. Mais tarde, estudos conduzidos por JOMORI *et. al*. [2008] com larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus)* de ~10mg mostraram que as larvas foram eficientemente capazes de metabolizar uma dieta comercial, apresentando crescimento e sobrevivência satisfatórios. Com relação à idade das larvas, TESSER *et al.* [2005] avaliou a substituição do alimento vivo por dieta em larvas de pacu, utilizando uma alimentação conjunta de *Artemia*+dieta microparticulada durante 3, 6 e 9 dias, e obteve como resultados de sobrevivência 26,7%, 63,6% e 80,2%, respectivamente. O mesmo autor também observou que larvas de pacu, com peso úmido acima de 7,0 mg, podem ser submetidas à transição alimentar para dietas sem comprometimento da sobrevivência final [TESSER *et al.* 2006], no entanto, ajustes nutricionais da dieta e o uso de atrativos devem ser realizados para que o crescimento seja comparável ao de larvas alimentadas com náuplios de *Artemia*.

A partir dos experimentos de crescimento e sobrevivência com larvas que possuíam peso similar, acredita-se que as dietas experimentais (DM e DMA) foram digeridas pelas larvas, especialmente pelos resultados de sobrevivência observados, entretanto, a eficiência dessas dietas pode ter sido comprometida, em razão da limitação ou falta de nutrientes essenciais, uma vez que o balanço nutricional foi baseado somente no ajuste no perfil de proteínas, carboidratos, lipídeos e matéria seca, explicando assim o baixo crescimento observado. Outra possibilidade seria a quebra e digestão incompleta das dietas formuladas pela larva de pacu, devido à ausência de sistema digestório completo. Adicionalmente, OSTASZEWSKA *et al.* [2005] acreditam que tanto a efetiva digestão como a absorção do alimento estão relacionados à sua composição, principalmente no conteúdo de aminoácidos e ácidos graxos essenciais às larvas. A forma em que as proteínas são adicionadas às dietas também são importantes [CAHU *et al*., 1999]. KOLKOVSKI *et al*. [1997], testando o efeito de várias suplementações em microdietas extraídas de frações de *Artemia*, encontraram que a adição de náuplios e classes de lipídeos polares ou frações não lipídicas, separadamente e em combinação, aumentaram significativamente a assimilação de microdietas de 10-20% em larvas com 22 dias de idade. No entanto, o efeito de suplementação diminuiu em larvas com idade mais avançada, indicando que os fatores nutricionais presentes e outros não identificados na *Artemia*, mas ausentes nas microdietas formuladas, influenciaram negativamente a ingestão e a assimilação das microdietas. Logo, a identificação desses fatores no alimento vivo e sua consideração no desenvolvimento de microdietas podem contribuir no desempenho de alimentos inertes como as micropartículas.

Outra hipótese, também apresentada por ROSELUND *et al.* [1997] e TESSER *et al.* [2005], sugere que o número de partículas de dieta necessária a otimização do crescimento tenha excedido a capacidade máxima de ingestão, em outras palavras, a quantidade de dieta que a larva necessita comer para suprir sua necessidade nutricional é maior que a quantidade que ela conseguiu ingerir.

O baixo desempenho de crescimento das dietas experimentais frente à dieta comercial e os resultados das larvas alimentadas com alimento vivo também podem

estar relacionados à qualidade dos ingredientes utilizados. Em contrapartida, as matrizes de gel formadas por essa técnica são porosas e podem ter sido incapazes de prevenir, de forma eficiente, a oxidação e degradação dos materiais encapsulados por um período, após a sua fabricação.

Dessa forma, o real conhecimento de como a dieta microparticulada é digerida no trato digestório da larva e a sua relação com a digestão e absorção dos nutrientes são de grande importância para futuras formulações de rações, na tentativa de substituição do alimento vivo. Análises histológicas, segundo BENGSTON [1993] e TESSER *et al.*[2005], podem ser uma forma de avaliar-se o valor nutricional de cada dieta, principalmente quando o crescimento larval e/ou sobrevivência não são suficientes para avaliar o efeito de diferentes dietas.

3.3.2 Taxa de ingestão

A taxa de ingestão alimentar (Tabela 21) mostra que a ingestão das dietas testadas em larvas com peso médio de 6 mg (estágio I) foi baixa, com pequena presença das dietas no trato digestório das larvas de pacu (Figura 30). Com o crescimento das larvas, a taxa de ingestão aumentou, apresentando boas porcentagens de ingestão em larvas com peso médio de 25 mg. O maior valor observado foi para o tratamento DMC, seguidos pelos tratamentos DM e DMA ($p<0,05$).

Tabela 21. Valores médios de taxa de ingestão (%) das dietas microparticuladas pelas larvas de pacu durante o período de experimento.

Tratamentos	**Estágios de desenvolvimento**		
	I	**II**	**III**
DM	10^{a}	$36,67^{c}$	$80,00^{b}$
DMA	$13,33^{a}$	$43,33^{b}$	$73,33^{c}$
DMC	10^{a}	$50,00^{a}$	$86,67^{a}$

DM – dieta microparticulada; DMA – dieta microparticulada contendo náuplios de *Artemia*; DMC – dieta comercial. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Características de cor e sabor das dietas podem ter influência nos resultados de aceitação de dietas. A introdução de nutrientes específicos, como alguns aminoácidos e outros atrativos, pode contribuir para uma melhora na aceitação das dietas por larvas que possuem um sistema digestivo ainda imaturo. Pesquisas adicionais no comportamento dessas larvas, em relação às dietas microparticuladas, são necessárias para que se possa melhorar a aceitação dessas dietas.

KOLKOVSKI *et al*. [1993] observaram que larvas de *Spaurus aurata* ingeriam pouca dieta microparticulada, sendo suficiente apenas para sua manutenção, mas, com a adição de enzimas digestivas na dieta aumentou, sua assimilação em 30%, com crescimento superior (200%) quando comparadas às larvas que receberam apenas dieta microparticulada sem enzimas. Os mesmos autores [KOLKOVSKI *et al.* 1997] também observaram, mais tarde, que estímulos químicos e visuais tiveram influência na taxa de ingestão de microdietas, onde alguns aminoácidos livres foram responsáveis pelos estímulos químicos. TESSER *et al.*[2006] observaram o mesmo comportamento, através de estímulos químicos e visuais em larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

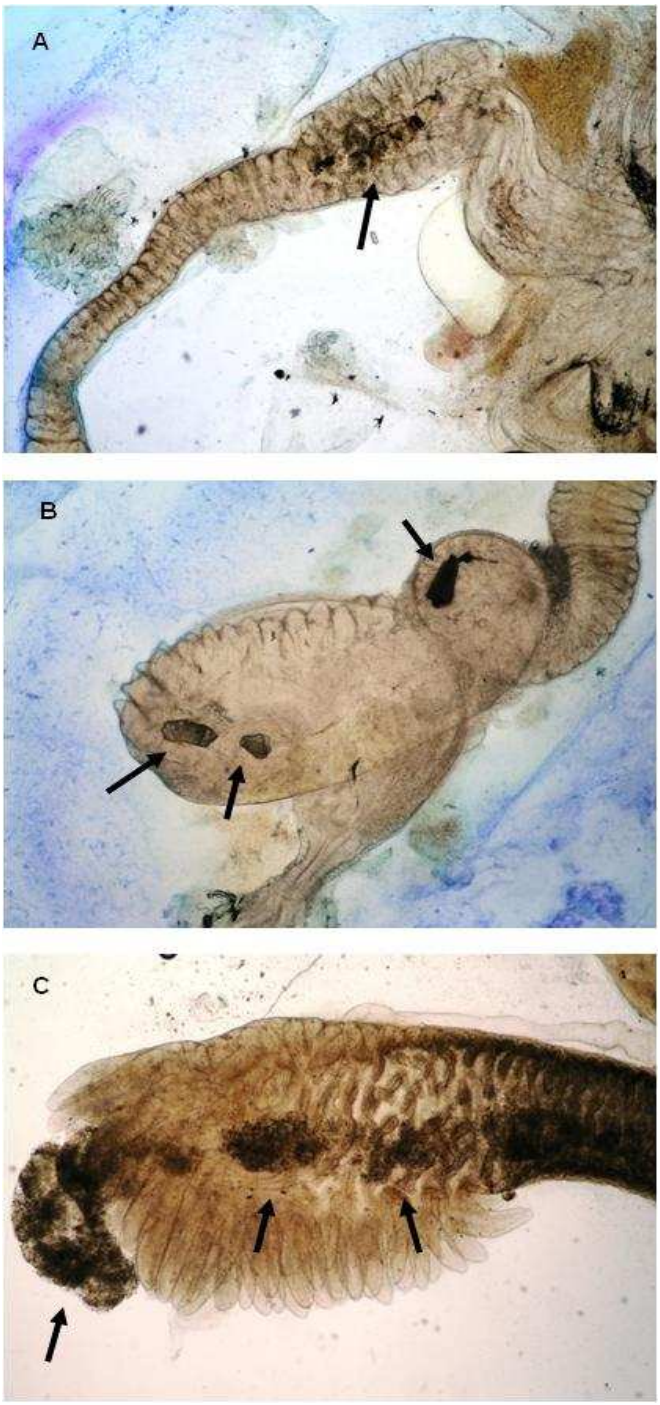


Figura 30 Micrografias do trato digestório de larvas de pacu alimentadas com as dietas, em diferentes estágios de desenvolvimento, obtidas por microscopia ótica. A – larvas com peso médio de 6 mg, após o consumo da dieta DM (aumento 40X) . B – larvas com 15 mg e dieta DMC (40X). C – larvas com 25 mg e dieta DMA. Aumento de 20x. Setas pretas indicam as micropartículas presentes no interior do trato digestório das larvas.

3.3.3 Digestibilidade *in vitro*

Além do método clássico para a determinação da eficiência da dieta, pela avaliação de parâmetros de peso, comprimento e sobrevivência, foi avaliado o grau de hidrólise das dietas, para complementar e explicar os resultados obtidos nos ensaios *in vivo*, sendo o grau de hidrólise das dietas considerado uma medida de digestibilidade *in vitro*. Essa determinação pelo do uso do pH-stat se tem mostrado bastante adequada para determinar a qualidade de diferentes ingredientes utilizados em rações [EZQUERRA *et al.*, 1997; GARCIA-CARRENO *et al.*, 1997; LEMOS *et al.*, 2004; CORDOVA-MURUETA *et al.,* 2007].

O grau de hidrólise foi avaliado por meio da capacidade da quimiotripsina e tripsina, principais enzimas responsáveis pela digestão protéica nas larvas (antes da formação do estômago) e quebra das ligações peptídicas. Os valores obtidos da hidrólise das dietas microparticuladas DM e DMA, do concentrado protéico de peixe (CPP) e da caseína (Padrão), encontram-se apresentados na Figura 31.

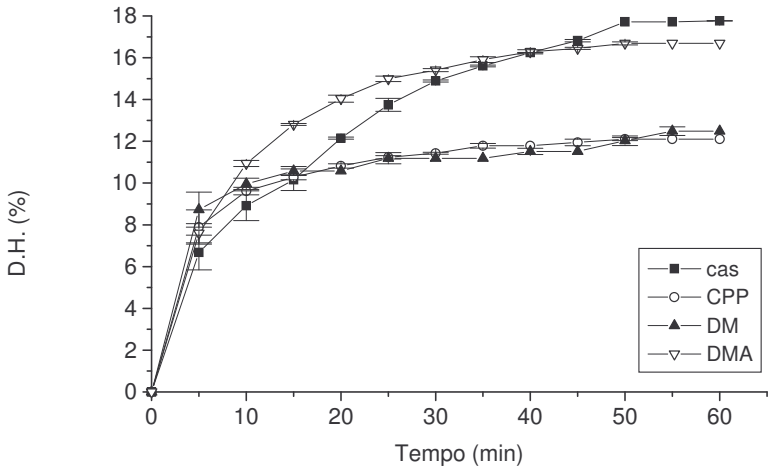


Figura 31. Grau de hidrólise (D.H. %) da caseína (cas), concentrado protéico de peixe (CPP), dieta micropartículada (DM) e dieta micropartículada contendo náuplios de *Artemia* (DMA), em função do tempo.

Os resultados mostram alto grau de hidrólise (17%) para caseína, considerada neste ensaio como padrão, com valores similares observados por DIMES & HARRD [1994], que utilizaram enzimas extraídas dos cecos pilóricos de peixes salmonídeos, e por LEMOS *et al.* [2004], quando utilizaram uma mistura de enzimas comerciais e uma mistura de enzimas nativas do camarão.

A dieta DMA também revelou alto grau de hidrólise (16%), com valores mais elevados do que a dieta DM ($p<0,05$) e semelhante ao padrão caseína ($p>0,05$), apresentando um valor médio de grau de hidrólise de 16%. Os valores observados para a dieta DM e o concentrado protéico de peixe (CPP) foram próximos de 12%, apresentando curvas semelhantes, sem diferenças significativas ($p>0,05$), ao longo do tempo analisado.

Provavelmente o maior valor de hidrólise observado para a dieta DMA, em relação à dieta DM, deve-se à presença de náuplios de *Artemia* liofilizados, adicionados em sua formulação, como parte da substituição da fonte protéica (20% da massa protéica). Apesar de demonstrar melhor digestibilidade *in vitro*, a dieta DMA não reproduziu melhores resultados de crescimento e sobrevivência, em relação à dieta DM que utilizou somente o concentrado protéico de peixe como fonte de proteínas. Os nutrientes provindos dos náuplios de *Artemia* secos podem não ter sido em quantidades suficientes para provocar diferenças nos resultados observados. GARCIA-ORTEGA *et al*. [2001] verificaram que larvas de *catfish* (*Clarias gariepinus*) alimentadas com dietas microencapsuladas, contendo 50% da fonte de proteínas oriundas de cistos de *Artemia* descapsulados, tiveram crescimento superior que aquelas alimentadas com dietas utilizando somente proteína de peixe. Segundo o autor, diferenças são encontradas em resultados de crescimento, quando larvas de peixe são alimentadas com cistos de *Artemia* descapsulados secos ou náuplios vivos, apesar de similar composição bioquímica, na maioria de seus nutrientes, as proteínas, quando secas, podem ter efeito nas suas propriedades e, dessa maneira, diferir das proteínas dos náuplios vivos. Isso pode explicar o desempenho observado da dieta DMA, contendo náuplios liofilizados como parte da fonte protéica. De acordo com KOLKOVSKI [2001], os organismos vivos influenciam positivamente no processo de digestão e assimilação de dietas inertes

pelas larvas de peixe pela contribuição direta de enzimas digestivas. Entretanto, essa contribuição também pode ser de outra forma, como a introdução de aminoácidos específicos, peptídeos etc. (TESSER *et al.,* 2006]. Outra hipótese foi atribuída à falta ou deficiência de nutrientes específicos, uma vez que o ajuste da formulação foi feito somente nos níveis de proteínas, carboidratos, lipídeos e matéria seca, baseado no perfil de composição da *Artemia*.

Métodos de administração das dietas inadequados, em razão do pouco conhecimento em relação à fisiologia alimentar, às necessidades nutricionais, bem como ao comportamento da larva na presença desse tipo de alimento, também podem influenciar a aceitação, assimilação e digestão de dietas e, assim, não promover efeito produtivo sobre o desempenho [KOLKOVSKI *et al*., 1997 e KOLKOVSKI *et al*., 2001]. Tesser *et al.* [2005, 2006] sugerem que o uso de atrativos e suplementos enzimáticos devem ser realizados para que o crescimento seja comparável ao de larvas alimentadas com náuplios de *Artemia*.

Os resultados de crescimento, combinados aos de digestibilidade, de composição de aminoácidos e do perfil eletroforético do concentrado protéico de peixe, podem fornecer algumas informações sobre a qualidade das proteínas utilizadas [GARCIA-ORTEGA *et al*., 2001]. Entretanto, análises complementares à digestibilidade, como a determinação da atividade de inibidores de proteases [LEMOS *et al*.,2004] que diminuem a digestibilidade dos ingredientes protéicos, podem complementar a avaliação de eficiência de dietas, frente ao crescimento apresentado pelas larvas.

4. CONCLUSÕES

A produção das dietas microparticuladas DM e DMA foi bem sucedida, apresentando altos valores de eficiências de encapsulação (> 97%) e perfis de composição protéica, lipídica e de matéria seca mais baixos que os náuplios de *Artemia* (alimento vivo). Características adicionais, como: distribuição de tamanho, entre 12 e 700 µm, (compatível ao alimento vivo); boa formação das matrizes, apresentando formas variadas e conteúdo multinucleado, com distribuição uniforme; integridade após reabsorção de água; e baixas liberações observadas (10% para micropartículas secas), tornam essas micropartículas, muito interessantes ao propósito deste trabalho, isto é, a substituição e ou redução do alimento vivo para alimentação inicial de larvas de peixe com características altriciais.

A avaliação das dietas, através dos ensaios *in vivo* e *in vitro* mostraram boa digestibilidade, manutenção da taxa de crescimento e razoável valores de sobrevivência (~50%), sugerindo que as larvas de pacu puderam ingerir, digerir e assimilar essas dietas, porém ainda não foram suficientes para suportar um crescimento similar ao alimento vivo.

.

CONCLUSÕES GERAIS

Quando a mesma concentração de proteína presente na emulsão formadora da micropartícula foi adicionada na solução iônica, foi possível elevar os níveis de sólidos totais de 5% até 12%.

O perfil de liberação foi alterado de maneira significante pela forma de utilização da mistura lipídica e pela concentração de polissacarídeo utilizada.

A entrega das dietas experimentais formuladas na forma de emulsão lipídica foi fundamental para otimização das dietas microparticuladas, sendo a mistura polissacarídica PEGEAL com maior eficiência dessa entrega.

Os testes *in vivo* mostram que as larvas foram capazes de ingerir e digerir as dietas microparticuladas, apresentando razoáveis níveis de sobrevivência. No entanto, uma otimização do balanço nutricional, a inclusão de atrativos, a presença de fatores antinutricionais, um melhor conhecimento do comportamento da larva x dieta necessitam ser aprofundados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de dietas envolve uma consideração geral de aspectos focados nas características físico-químicas, na composição e no entendimento das interações dieta × peixe. As dietas microparticuladas produzidas neste trabalho parecem atender parte dessas exigências; entretanto, o suporte para o desenvolvimento e crescimento das larvas depende da formulação da dieta e poderá ser aumentado se um melhor balanço for feito para uma entrega efetiva de micronutrientes. Além das questões mencionadas, melhores resultados de crescimento e sobrevivência poderão ser alcançados com os avanços na nutrição larval. Conhecimentos mais aprofundados em relação à fisiologia alimentar, necessidade nutricional e comportamento da larva na presença de dietas, e também, o manejo e administração de dietas são necessários para complementar as informações obtidas e, assim, aprimorar e otimizar as dietas desenvolvidas.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Pesquisas adicionais, como uma continuidade deste trabalho, para alcançar uma efetiva substituição do alimento por dietas inertes ainda são necessárias. Dessa maneira, o real conhecimento de como a dieta microparticulada é digerida no trato digestivo da larva e a sua relação com a digestão e a absorção dos nutrientes é de grande importância para futuras formulações de rações. Análises complementares como histologia e outros, relacionados à qualidade dos ingredientes utilizados (como oxidação e degradação, fatores antinutricionais), podem complementar a avaliação do valor nutricional de cada dieta. A identificação de fatores bioquímicos, no alimento vivo, e estudos de comportamento da larva x dieta, também devem ser considerados no desenvolvimento dessas dietas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ADLER-NISSEN, J. Enzymic hydrolysis of food proteins. Ed. London, Ch. 2, 5 e 6, New York, 426 p. 1986.

ALVIM, I. D. **Produção e caracterização de micropartículas obtidas por Spray drying e coacervação complexa e seu uso para Alimentação de larvas de peixes.** Tese de Doutorado, Campinas, Universidade Estadual de Campinas, 243p. 2005.

AMSDEM, B.S., B. S. Solute difusión in hydrogels. An examination of the retardation effect. . ***Polymer Gels and Networks***, v.6, n.1, p.13-43, 1998.

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

ARTEMIA INTERNATIONAL LLC Technical Information Golden Pearls Larval Diets. ***http://artemia-international.com/tech_larval_diets.htmL#gp*.** Acesso em agosto de 2007.

BASKERVILLE-BRIDGES B, KLING LJ Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod Gadus morhua larvae. ***Aquaculture Nutrition*,** v.6, n.3, p.171-182, 2000.

BEMILLER J.N.; WHISTLER, R.L. **Carbohydrates.** In: Fennema, O.R. (Ed.), Food Chemistry,3rdEd., Marcel Dekker, New York, 1996.

BENGSTON, D. A. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. ***Journal of Aquaculture Society,*** v.24, n.3, p.285-293, 1993.

BERTSCH, M.; MAYBURD, A. L.; KASSNER, R. J. The identification of hydrophobic sites on the surface and proteins using absorption difference spectroscopy of bromophenol blue. ***Analytical Biochemistry***, New York; v.313, p.187-1995, 2003.

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.

BUCHAL, M.A.; LANGDON, C.J. Evaluation of lipid spray beads for the delivery of water-soluble materials to a marine suspension-feeder, the Manila clam *Tapes philippinarum* (Deshayes 1853). ***Aquaculture Nutrition***, v.4, p. 263-274, 1998.

CAHU, C., ZAMBONINO-INFANTE, J. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. ***Aquaculture,*** v.200, n.3-4, p.161-180, 2001.

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

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

CANDIDO, L. M.; NOGUEIRA, A. K.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de concentrados protéicos de pescado preparados por vários métodos, ***Brazilian Journal of Food Technology,*** Campinas, v.1, n.1-2, p.77-89, 1998.

CARDOSO, F. S. N. **Produção de microencapsulados de amido com recobrimento em leito fluidizado**. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000, 65p.

CHEN, H.M.; MEYERS, S.P. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish

waste using a soy oil process. ***Journal of Food Science***, v. 47, n1-2, p.892-896, 1982.

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

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

CORDOVA-MURUETA, J. H.; NAVARRETE, M. A. T., GARCIA-CARREÑO, F. Concentrates of fish protein from bycatch species produced by various drying processes. ***Food Chemistry,*** v.100, n.3, p.705-711, 2007.

CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; LUCA, G.; NASTRUZZI, C. Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. ***Biomaterials***, v.23, p.2283-2294, 2002.

COTTEAU, P.; SOGERLOOS, P. Manipulation of dietary lipids, fatty acids and vitamins in zooplancton cultures. ***Freshwater Biology,*** v.38, n.3 p.501-512, 1997.

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

DIMES, L. E.; HARRD, N. F. Estimation of protein digestibility. 1. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*salmo-gairdneri).* ***Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology,*** New York, v.108, n.2-3, p.349-362, 1994.

DOUGLAS, J. A.; SEFTON, M. V. Permeability of EUDRAGIT and HEMA-MMA microcapsules to glucose and inuli. ***Biotechnology and Bioengineering***, v.36, n.7, p.653-664. 1990.

DUBERNET, C.; BENOIT, J. P.; PEPPAS, A. N.; PUISIEUX, F. Ibuprofen-loaded ethylcellulose microspheres: release studies and analysis of the matrix structure through the Higuchi model. ***Journal of Microencapsulation,*** v.7, p.555-565, 1990.

DUPUY, B.; GIN, H.; DUCASSOU, D.; AUBERTIN, J. Insitu polymerization of a microencapsulating medium round living cells. ***Journal Biomedical Materials Research***, n.11, v.22, p.1061-1070. 1988.

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

DZIEZAK, J. D. A focus on gums. ***Food Technology***, v.45, n.3, p. 115-121, 1991.

EZQUERRA, J. M.; GARCÍA-CARRENO, F. L.; CARILLO, O. pH-stat method to predict digestibility in White shrimp (*Penaeus vanname*), ***Aquaculture,*** v.157, n.3-4, p.251-262, 1997.

FANGER, G.O. Microcapsulation: A brief history and introduction in: Microencapsulation: ***Processes and applications***. VANDEGAER, J.E. ed Plenum Press, New York, p. 1-20, 1974.

FAO - Food And Agriculture Organization - *Fisheries and Aquaculture* – Fisheries Statistics and Information- Disponível em: <http:// http://www.fao.org/> acesso em agosto de 2007.

FERNANDEZ, M. L.; SUN, D. M. ; TOSCA, M. A. And MC NAMARA, D. J. Citrus pectin and colesterol interact to regulate hepatic colesterol homeostasis and lipoprotein metabolism: A dose response study in guines pigs. ***American Journal Clinical Nutrition***. v. 59, p. 869-878, 1994.

FERNANDEZ-DÍAZ, C.; PASCUAL, E.; YÚFERA, M. Feeding behavior and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. ***Marine Biology,*** Londres, v.118, n.3, p.323-328, 1994.

FONTAGNE, S.; PRUSZYNSKI, T.; CORRAZE, G.; BERGOT, P. Effect of coconut iol and trycaprylin vs. triolein on survival, growth and fatty acid composition of common carp, *Cyprinus carpio* L., larvae. ***Aquaculture***, v.179, n.1-4, p.241-251, 1999.

GARCIA-CARRENO, F. L.;NAVARRETE, T.A.; EZQUERRA, J. M. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro: I. Effect of protease inhibitors in protein ingredients. ***Journal Marine Biotechnology,*** v.5, n.1, p.36-40, 1997.

GARCIA-ORTEGA, A.; H.;HUISMAN E.A. Evaluation of protein quality in microbound starter diets made with decapsulated cysts of Artêmia and fishmeal for fish larvae. ***Journal of the World Aquaculture S*****ociety**, v.32, n.3, p. 317-329, 2001.

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

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

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

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

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, n.3, p. 153-158. 2000.

HAGEN, S .R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolum phenylisothiocyanate derivation and liquid chromatography of aminoacids in food. ***Journal Association of Analytical Chemistry,*** v.72, n.6, p.912-916, 1989.

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.

HENRY, R.Y.; CANNON, D. C.; WINKELMAN, J. **Clinical chemistry principles and Techniques** (2nd edition). New York, Harpes and Row Publishers, Inc. 1974.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. Estatística da Pesca – Ano de 2006. Brasil – Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília, 2007. 121p. Disponível em: ***http://www.ibama.gov.br/recursospesqueiros/downloads/estati2006.zip*****.** Acesso em Abril de 2008.

JOMORI, R. K., DUCATTI, C., CARNEIRO, D. J., PORTELLA, M. C. Stable carbon (δ^{13} C) and nitrogen (δ^{15}N) isotopes as natural indicator of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. ***Aquaculture Research,*** v.39, n.2, p. 370-381, 2008

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MARTINS, M.I.E.G. et al. Economic evaluation of Piaractus mesopotamicus juvenile production in different rearing systems***. Aquaculture***, v.243, n.1-4, p.175-183, 2005.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B. et al. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. ***Aquaculture***, v.221, n.1-4, p.277-287, 2003

JOMORI R. K. **Estudos sobre alimentação de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (holmberg, 1887) com náuplios de *Artemia* e sua substituição por dieta artificial**. Trabalho de graduação. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

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

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

KIM, C. K.; LEE, E. J. The Controlled Release of Blue Dextran from Alginate Beads. ***Internation Journal of Pharmaceutics***, v.*79*, n.1, p.11-19, 1992.

KJØNIKSEN, A.L.; HIORTH, M.; NYSTRÖM, B Temperature-induced association and gelation of aqueous solutions of pectin. A dynamic light scattering study. ***European Polymer Journal***, v. 40, n.11, p.2427-2435, 2004.

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, n.1-2, p. 181–201, 2001.

KOLKOVSKI, S.; KOVEN, W.; TANDLER, A. The mode of action of Artemia in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. ***Aquaculture***, v. 155, n.1-4, p. 193-205, 1997.

KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A.; KISSIL, G. W.;GERTLER,A. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth e survival of gilthead seabream (*Sparus aurata,* Sparidae, Linnaeus) larvae. ***Fish Physiology and Biochemistry,*** v.12, n.3, p.203-209, 1993.

KVALE A.; YÚFERA M.; NYGARD E.; AUSLAND, K.; HARBOE, T; HAMRE K. Leaching properties of three different microparticulate diet and preference o thediets in cod (*Gadus morhua* L.) larvae. ***Aquaculture,*** v.251, n-2-4, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assemblyof the head of bacteriophage T4. ***Nature,*** v.227, n.15, p.685-689, 1970.

LAMPRECHT A., SCHAÈ FER U. and LEHR C.-M. Infuences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for ω3 unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition ***Journal of. Microencapsulation***, v. 18, n. 3, p. 347-357, 2001.

LAMPRECHT, A.; SHÄFER, U.F.; LEHR, C.-M. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, v. 49, n.1, p. 1 – 9, 2000.

LANGDON, C. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. ***Aquaculture***, v. 227, n.1-4, p. 259–275, 2003.

LANGDON, C.J. Preparation and evaluation of protein microcapsules for a marine suspension-feeder, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. ***Marine Biology,*** v.102, n.2, p. 217-224, 1989.

LAZO, J. P.; DINIZ, M. T. FAULK, C.; HOLT, G. J. ARNOLD, C. R.Co-feeding microparticulated diets with algae: toward elimination the need for zooplankton at first feeding in larval red drum. ***Aquaculture,*** v. 188, n.3-4, p.339-351, 2000.

LEMOS, D.; NAVARRETE, A. T.; CÓRDOVA-MURUETA, J. H.; GARCIA-CARRENO, F. Testing feeds and feed ingredients for juvenile Pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis:* in vitro determination of protein digestibility and proteinase inhibition. ***Aquaculture,*** v.239, n.1-4, p.307-321, 2004.

LINDNER, P.; ESHEL, A.; KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A. HARPAZ, S. Proteolysis by juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* gastrointestinal enzymes as a method for the evaluation feed proteins. ***Fish Physiology and Biochemistry***, v.14, n.4, p.399-407. 1995.

LISERRE, A.M. **Microencapsulação de Bifidobacterium lactis para aplicação em leites fermentados**. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 79p., 2005.

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

MAGGE, E.L. JR., OLSON, N.F. Microencapsulation of cheese ripening systems: Stability of microcapsules. ***Journal of Dairy Science***, v. 64, p. 611-615, 1981.

MARTINSEN, A.; STRROD, I. ; SKJÄK-BRAEK, G. Alginate as Immobilization Material: II. Diffusion Properties. ***Biotechnology and Bioengineering*****,** v. 39, n.2, p. 186-194, 1992.

MARTINSEN, A.; SKJÄK-BRAEK, G.; SMIDSROD, O.; Alginate as Immobilization Material: I. Correlation between Chemical and Physical Properties of Alginate Gel Beads. ***Biotechnology and Bioengineering,*** v. 33, n.1, p. 79-89, 1989.

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

MAIA, E. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; HOTTA, L. K. Fatty acid composition of the total, neutral and phospholipids of pond-raised Brazilian *Piractus mesopotamicus*. ***International Journal of Food Science and Technology***, v. 30, n.1, p. 591-597, 1995.

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***. p.303-314. 1998.

MILLAMENA, O.M.; TERUEL, M.B.; KANAZAWA, A., TESHIMA, S. Quantitative dietary requirements of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and tryptophan***. Aquaculture***, v. 179, n.1-4, p. 169–179, 1999.

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

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

MUKAI-CORRÊA R.; PRATA, A.S.; ALVIM I. D.; GROSSO, C. R. F. Caracterização de Microcápsulas contendo caseína e gordura vegetal. hidrogenada obtidas por geleificação iônica. **Brazilian *Journal of Food Technology***, v.8, n.1, p. 73-80, 2005.

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

MUKAI-CORREA, R. **Produção e caracterização de microcápsulas obtidas por gelificação iônica para alimentação de larvas de peixe**. Campinas. Dissertação - Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. . 184p. 2003.

NANKERVIS, L.; SOUTHGATE, P. C. An integrated assessment of gross marine protein sources used in formulated microboound diets for barramundi (*Lates calcarifer*) larvae. ***Aquaculture***, v.257, n.3, p.453-464, 2006.

NOKHODCHI, A.; NOROUZI-SANI S.; SIAHI-SHADBAD, M.R.; LOTFIPOOR F.; SAEEDI M. The effect of various surfactants on the release rate of propranolol hydrochloride fom hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)-Eudragit matrices. ***Euroean Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, v.54, n.3, p.349-356, 2002.

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

ÖNAL U.; LANGDON, C.J. Development and characterization of complex particles for delivery of amino acids to early marine fish larvae. ***Marine Biology***, v.146, n.5, p. 1031-1038, 2005.

ÖNAL U, LANGDON C. Lipid spray beads for delivery of riboflavin to first-feeding fish larvae. ***Aquaculture***, v. 233, n.1-4, p. 477-493, 2004.

ÖNAL, U.; LANGDON, C. Characterization of two microparticulate types for delivery of food to altricial fish larvae. ***Aquaculture Nutrition***, v.6, n.3, p.159-170, 2000.

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

OSTASZEWSKA, T.; DABROWSKI, K.; CZUMINSKA, K.; OLECH, W. & OLEJNICJAK, M. Rearing of pike-perch larvae using formulated diets-first success with starter feeds. ***Aquaculture Research*****,** v.36, n.12, p.1167-1176. 2005.

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

OZKIZILCIK, S.; CHU, F.L. E. Preparation and characterization of a complex microencapsulation diet for striped bass *Morone saxatilis*. ***Journal of microencapsulation,*** v.13, n.3, p.331-343, 1996.

PARRA, G.; YÚFERA, M.Comparative energetic during early development of two marine fish species, *Solea senegalensis* (Kaup) and *Sparus aurata* (L). ***Journal Experimental Biology***, v.204, p.2175-2183, 2001.

PEDROZA-ISLAS, R.; GALLARDO, P.; VERNON-CARTER, E.J.; GARCÍAGALANO, T.; ROSAS, C.; PASCUAL C.; GAXIOLA, G. Growth, survival, quality and digestive enzime

activities of larval shrimp fed microencapsulated, mixed and live diets. ***Aquaculture Nutrition,*** v. 10, p. 167-173, 2004.

PERSON-LE RUYET, J. , ALEXANDRE, J. C. , THEBAUD, U., MUGNIER, C. marine fish larvae feeding formulated diets or live prey ***Journal World Aquaculture Society***. v. 24, n.2, p. 211-224, 1993.

POLK, A.; AMSDEN, B.; DE YAO, K.; PENG, T.; GOOSEN, M. F. A.; Controlled Release of Albumin from Chitosan-Alginate Microcapsules. ***Journal of Pharmaceutical Sciences,*** v.83 n.2, p.178-185, 1994.

PORTELLA, M. C.; TESSER, M. B.; JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J. Substituição do alimento vivo na larvicultura. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQÜICULTURA, p.12, 2002, Goiânia, GO. **Anais**... Goiânia, ABRAQ, 2002.

PORTELLA, M.C.. **Efeito da utilização de dietas vivas e artificiais enriquecidas com fontes de ácidos graxos essenciais, na sobrevivência, desenvolvimento e composição corporal de larvas e alevinos de curimbatá *Prochilodus* scrota (Pisces, Prochilodontidae**. São Carlos. Tese de doutorado - Universidade Federal de São Carlos – SP. p.210. 1996.

PRATA, A. S. **Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa**. Tese de Doutorado, Campinas, Universidade Estadual de Campinas, 242p, 2006.

RALET, M.C.; DRONNET, V.; BUCHHOLT, H. C.; THIBAULT, J.F. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. ***Carbohydrate Research,*** v.336, n.2, p. 117-125, 2001.

RÉ, M.I. Microencapsulação em busca de produtos inteligentes. Último acesso em agosto de 2007. http://www2.uol.com.br/cienciahoje/chmais/pass/ch162/microcap.pdf.

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

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

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

REITHMEIER.; GOPFERICH, A.; HERRMAN, J. Preparation and characterization of lipid microparticles as a drug carrier for somastatim. ***International Journal of Pharmaceutical,*** v.218, p.133-143, 2001.

RIBEIRO, L.; SARASQUETE, C.; DINIZ, M. T. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1958) larvae. ***Aquaculture,*** v. 171, n.3-4, p.293-308, 1999.

ROBIN, J. H.; PERÓN, A. Comsumption vs. deposition of essencial fatty acids in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): study of fatty acid incorporation. ***Aquaculture,*** v.238, n.1-4, p.283-294, 2004.

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

ROSENLUND, G.; STOSS, J.; TALBOT, C. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. ***Aquaculture,*** v.155, n.1-4, p.183-191, 1997.

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

SANDERSON, G.R.; CLARK, R.C. Gellan gum, a new swelling polysaccharide. ***Gums and Stabilizers for the food industry,*** v.2. Oxford: Pergamon Press, p.201-210, 1984.

SARGENT, J.; BELL, G.; McEVOY, L.; TOCHER, D.; ESTEVEZ, A. Recent developments in the essential fatty acid nutricion of fish. ***Aquaculture***, v. 177, n. 1-4, p. 191-199, 1999.

SCHWENDEMAN, S., P.; TOBIO, M.; JOWOWICKZ, M.; ALONSO, M. J.; LANGER, R. New strategies for the microencapsulation of tetanus vaccine. ***Journal of Microencapsulation***, v.15, n.3, p.299-318, 1998.

SEAP - Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca - **A aqüicultura no Brasil -** http://www.presidencia.gov.br/seap/- Texto extraído em junho de 2007.

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

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

SIEKMANN, B.; WESTESEN, K. Submicron-sized parenteral carrier systems based on solid lipids. ***Pharmaceutical and Pharmacology Letter*** , v.1, n.1, p.123-126, 1992.

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

SOBRAL, P.J. A.; MONTERREY-QUINTERO, E. S. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para elaboração de biofilmes. Pesquisa Agrogropecuária Brasileira, Brasília, v.35, n.1, 2000, pág. 179-189.

SRIAMORNSAK, P. Effect of calcium concentration, hardening agent and drying condition on release characteristics of oral proteins from calcium pectinate gel beads ***European Journal of Pharmaceutical Sciences,*** v.8, n.3, p.221 –227, 1999.

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

SVASTI, J.; PANIJPAN, B. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. ***Journal of Chemical Education***, v.54, n.9, p.560-562, 1977.

TAKEUCHI, T. A reviws of feed development for early life stages of marine finfish in Japan. ***Aquaculture,*** v. 200, n.1-2, p.203-222, 2001.

TANAKA, H.; MATSUMURA, M.; VELIKY, I. A. Diffusion Characteristics of Substrates in Ca-alginate Gel Beads. ***Biotechnology and Bioengineering***, v.26, n.1, p.53-58, 1984.

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.; 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., CARNEIRO, D.J., PORTELLA, M.C. Co-feeding of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) larvae with *Artemia* and microencapsulated diet. ***Journal of Applied Aquaculture***, v.17, n.1, p.47-59, 2005.

THIES, C. **How to Make Microcapsules** Lecture and Laboratory Manual. St. Louis. Missouri, 1995.

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

VELINGS, N.M.;MESTDAGH, M.M. Physico-Chemical Properties of Alginate Gel Beads. ***Polymer Gels and Network***, v.*3*, n.3, p.311-330, 1995.

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.

WESTESEN, K.; BUNJES, H.; KOCH, M.H. J. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. ***Journal of Control Release***, v.48, n.2-3, p.223-236, 1997.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; KRY, J. C. An evaluation of the waters pico-tag system for the aminoacid analysis of food materials. ***Journal of Automatic Chemistry*****,** v.8, n.4, p.170-177, 1986.

WILLAERT R.G.; BARON G.V. Gel entrapment and micro-encapsulation: Methods, applications and engineering principles ***Reviews in Chemical Engineering***, v. 12, n. 1-2, p. 5-205, 1996.

YÚFERA. M; FERNADEZ-DÍAZ, C.; PACUAL, E. Food microparticles for larval fish prepared by internal gelation. ***Aquaculture,*** v.248, n.1-4, p.253-262, 2005.

YÚFERA, M; KOLKOVSKI, S.; FERNADEZ-DÍAZ, C.;RINCHARD, J; LEE, K. J.; DABROWSKI, K. Delivering bioactive compounds to fish larvae using microencapsulated diets. Aquaculture, v.227,n.1-4, p.277-291, 2003.

YÚFERA, M; KOLKOVSKI, S.; FERANDEZ-DÍAZ, C.; DABROUWSKI, K.; Free amino acid leaching from a protein-walled microencapsulated diet for fish larvae. ***Aquaculture,*** v.214, p.273-287, 2002.

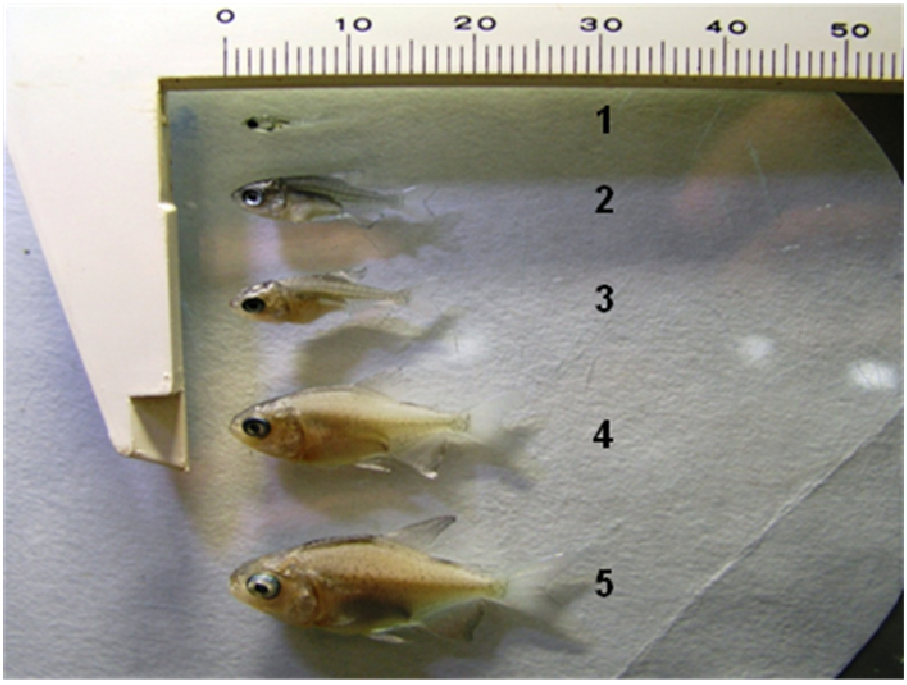
YÚFERA, M.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C. .; PASCUAL, E.; SARASQUETE, M. C.; MOYANO, F. J.; DÍAZ, M.; ALARCÓN, F. L.; GARCIA-GALLEGO, M. & PARRA, G. Towards an inert diet for first-feeding gilthead seabream Sparus aurata L. larvae**.** ***Aquaculture Nutrition***, v.6, n.3, p.143-152. 2000.

YÚFERA, M.; PASCUAL, E.; FERNÁNDEZ-DIAS, C. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. ***Aquaculture***, v. 177, n. 1-4, p. 249-256, 1999.

YÚFERA, M., SARASQUETE, M. C. FERNÁNDEZ-DIAZ, C. Testing protein-walled microcapsules for the rearing of first-feeding gilthead sea bream (*Sparus aurata* L**.).** ***Larvae Marine Freshwater Research***, v.47, n.2, p. 211-216. 1996.

ZIMMERMANN, A.L.S. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas contendo microrganismos viáveis utilizados como bioinseticida.** Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, SP, 2001.

ANEXO I



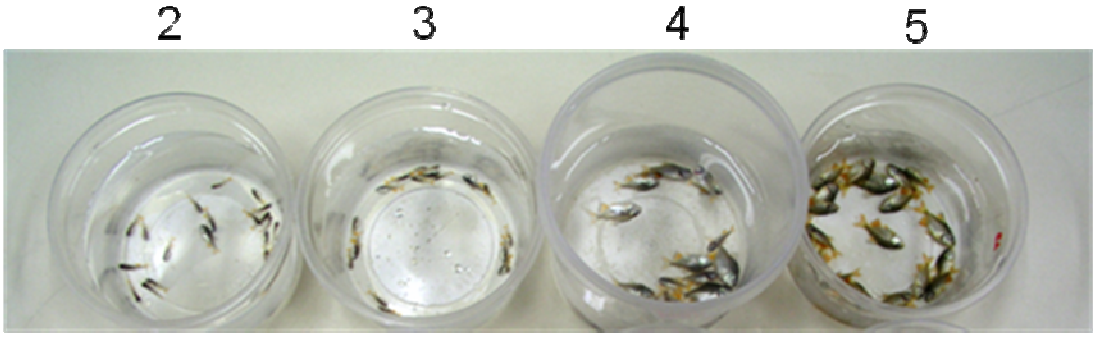


Figura 32. Amostras de larvas de pacu dos tratamento estudados. 1. Tratamento em jejum; 2. Dieta DM ; 3. dieta DMA; 4. dieta DMC; 5. alimento vivo *Artemia.*

ANEXO II

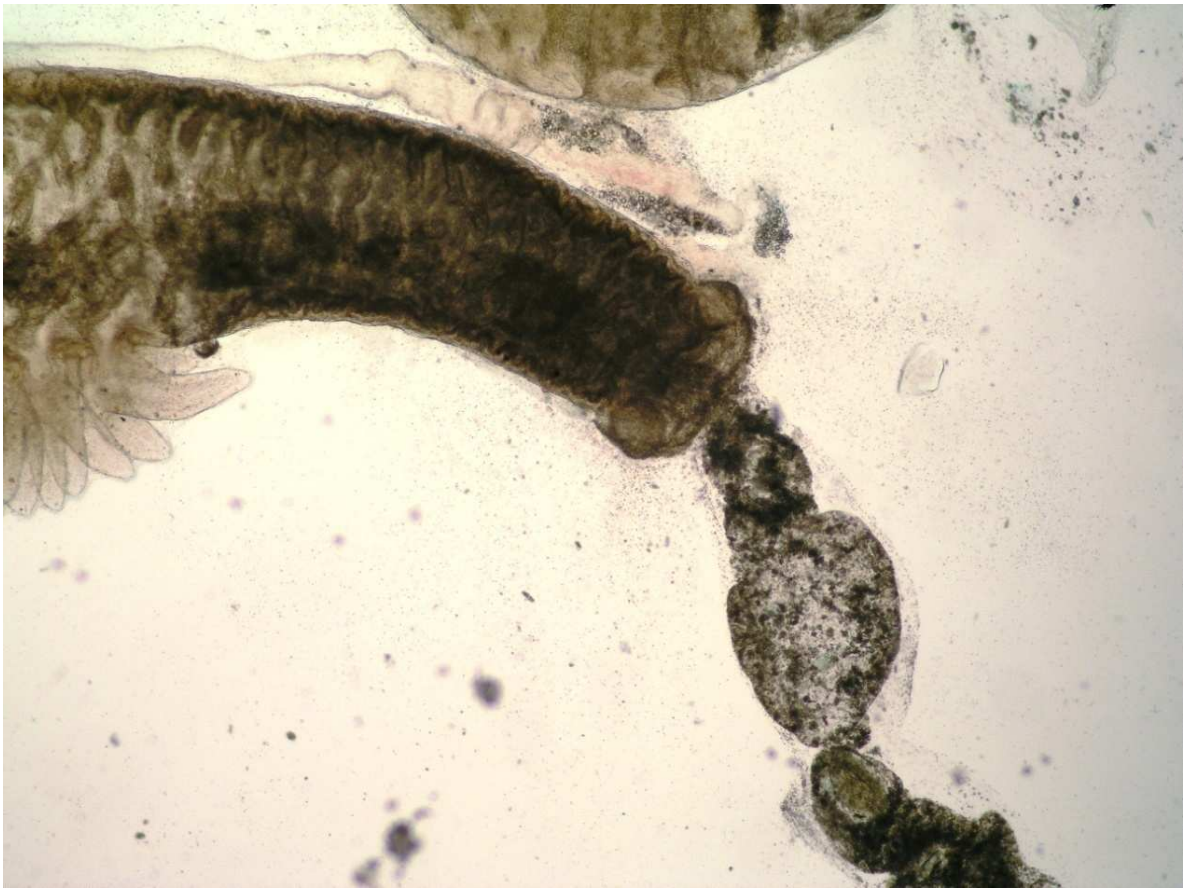


Figura 33. Micrografia do trato digestório de larvas de pacu, após 25 dias de experimento obtidos por microscopia ótica. As setas pretas estão indicando as dietas micropartículas DMA.