



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



**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GELATINA DE PELE DE TILÁPIA E  
APLICAÇÃO COMO AGENTE ENCAPSULANTE DE ÓLEO DE SALMÃO EM  
MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA**

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

**Camila Morais Marques Bueno  
Mestranda**

**Carlos Raimundo Ferreira Grosso  
Orientador**

**Campinas – SP  
Agosto – 2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B862e Bueno, Camila Morais Marques  
Extração e caracterização de gelatina de pele de tilapia e aplicação como agente encapsulante de óleo de salmão em micropartículas obtidas por coacervação complexa / Camila Morais Marques Bueno – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

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

1. Gelatina de pele de peixe. 2. Óleo de salmão. 3. *Oreochromis niloticus*. 4. Microencapsulação. 5. Coacervação complexa. I. Grosso, Carlos Raimundo Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em inglês: Extraction and characterization of fish skin gelatin and application as encapsulate agent of salmon oil in microparticles obtained by complex coacervation.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Fish skin gelatin, Salmon oil, *Oreochromis niloticus*, Microencapsulation, Complex coacervation.

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

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Flávia Maria Netto

Carmen Sílvia Favaro Trindade

Programa de Pós-Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

**Prof. Dra. Flávia Maria Netto**  
**Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP**  
**(membro)**

---

**Profa. Dra. Carmen Sílvia Favaro Trindade**  
**Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP**  
**(membro)**

*“ Tudo o que sei custou as dores das experiências. Tenho respeito pelos que procuram, pelos que tateiam, pelos que erram. E, o que é mais importante, estou persuadido de que minha luz se extinguiria se eu fosse o único a possuí-la ” (Goethe)*

*Vale mais a pena ver uma coisa  
sempre pela primeira vez que  
conhecê-la,  
Porque conhecer é como nunca ter  
visto pela primeira vez,  
E nunca ter visto pela primeira vez  
é só ter ouvido contar.*

*(Rubem Alves)*

*Dedico este trabalho a minha vizinha, aos meus pais, e a minha irmã Gaby, que sempre foram a força propulsora para meu ímpeto de vencer, através do mais puro e verdadeiro amor oferecido incondicionalmente.*

*E a minha metade essencial, Luis Fernando.*

*Amo vocês!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Grosso. Obrigada pela confiança depositada em mim, pelo constante e incansável auxílio, pela dedicação ao nosso trabalho, pelos conhecimentos compartilhados e, principalmente, por ter contribuído profundamente para meu amadurecimento profissional.

Aos membros da banca examinadora: Profa. Dra. Flávia Maria Netto e Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávoro Trindade. Muito obrigada pelas sugestões, cordialidade e atenção dadas ao trabalho.

Aos que compartilharam comigo o dia-a-dia no Laboratório, trabalhando, almoçando juntos, conversando e me ajudando sempre que precisei. Muito obrigada pelo carinho, por todo o apoio, amizade e pelos momentos de descontração: Carol, Andréa, Noemi, Alda, Bárbara (Baby Sam, não sei o que seria de mim sem você!), Gláucia, Gisele, Cris, Fernando, Caro, Diego e Renata. Muito obrigada a todos os que me ajudaram na fase de limpeza das peles de tilápia, sem vocês eu jamais daria conta!

Agradeço também à Iza, sempre solícita, e que me ensinou muitos dos “pulos do gato” para fazer os coacervados.

Ao Marcos e Cosme e aos demais funcionários da secretaria de pós-graduação e do Microcentro da FEA, pela presteza e paciência.

Aos funcionários do DEPAN, sempre muito atenciosos: Nice, Beth, Yara, Fátima, Chico, Soely, Cidinha, Eliana e Sônia.

Aos responsáveis pela manutenção e limpeza do Departamento de Alimentos e Nutrição.

A todos do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela intensa contribuição.

Ao Prof. Dr. Áureo Yamada, por disponibilizar o laboratório de microscopia ótica, possibilitando a captação das imagens utilizadas neste trabalho. Obrigada também a toda sua equipe, sempre pronta para tirar dúvidas e auxiliar no manuseio das amostras.

Agradeço ao Prof. Dr. Flávio Luís Schmidt pela disponibilidade das instalações e equipamentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos para a extração e secagem da gelatina de peixe e ao funcionário Adauto por dispor de seu tempo para me ajudar em vários momentos.

Ao Prof Dr. Alfredo Vitali do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital), por ter disponibilizado a estufa para a secagem da gelatina.

Às pessoas que encontrei no DEPAN: Ana Claudia, Carol Pazinato, Aline, Liz, Marinez e Carlos, pelas conversas descontraídas e pelas trocas de conhecimento.

Ao pessoal do CAUNESP (Jaboticabal): Thálita, Emmeli, Marcio, Munir, Rodrigo, Joaquim e, especialmente, às professoras Dra. Maria Célia Portella e Dra. Cristina R. Dias Koberstein, pela recepção, auxílio e grande cordialidade.

À Gelita, pela gentil doação da gelatina suína utilizada nos experimentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À UNICAMP, pela acolhida e pelo ensejo de maior crescimento intelectual.

Aos meus amigos e ex-colegas da Embrapa Meio Ambiente, especialmente à Elen, Chris, Mari, Maurício (*in memorian*) e Neusa.

Aos veterinários da “Boate Azul”: minha grande amiga Glau, Leila, Bruno e a todos os demais colegas e professores do CAV - UDESC, os meus agradecimentos por terem feito parte da minha jornada profissional... Quem sabe nossos destinos voltem a se cruzar por aí.

Não poderia deixar de agradecer aos meus cachorrinhos, aos que já se foram e aos que ainda estão presentes entre nós, por cumprirem a linda missão de distribuir muito amor, enchendo a casa de alegria e nos mostrando para não levarmos a vida tão a sério o tempo todo (Brigita, Tiffany, Snoopy e minha querida vira-*latinha*, Demi).

Aos meus amigos campineiros e moradores de Campinas que tive a grande sorte de conhecer: Lu, Cris (ex-vizinha), Cris (curso informática), Walter, Rita e Miachon (vocês são muito especiais), Ivone, Silvana, Anita e Camila.

Minha eterna gratidão ao meu amigo Marcelo. Jamais esquecerei de tudo o que fez por mim quando mais precisei de um ombro amigo.

À Silvia, minha querida prima gauchinha, pelas risadas, troca de experiências e pelo imenso carinho.

À Beta, minha amiga de infância, por todas as coisas positivas que nossa sólida amizade sempre nos proporcionou.

A todos os Fedrizi, pelo carinho e torcida dessa minha segunda família: meus sogros (Odair e Táta), vó Maria, vó Lúcia, vô Bellam, Ju, Reinaldo, Lu e Malu.

Infinitos agradecimentos ao meu noivo, meu verdadeiro anjo da guarda, pela inestimável ajuda com dedicação e comprometimento absolutos. Pelo exemplo de otimismo, fé e alegria de viver, ingredientes fundamentais para o alcance de nossas metas, e, principalmente, por caminharmos na mesma direção com muito amor, confiança e respeito.

Agradeço à vó pela presença constante em minha vida mesmo a tantos quilômetros de distância. Pelas longas conversas por telefone, pela paciência, amizade, compreensão, pelos conselhos sábios, pelo apoio, orações, dedicação e amor, essenciais para mim. Mil vezes obrigada! Ao vizinho (*in memorian*), que certamente seria um grande incentivador para eu continuar os estudos. À mainha, meu exemplo de força, caráter e dedicação à família. Muito obrigada por todos os ensinamentos, pela constante preocupação com minha felicidade e pelo brilho que dá em minha vida. Ao painho, por sempre acreditar em mim, me apoiando nas escolhas e torcendo muito pelo meu sucesso. À minha irmã, que possui o dom divino de falar as palavras certas em todos os momentos difíceis, pelas doses de incentivo e otimismo, pelo exemplo de fé e amor.

A concretização de sonhos e projetos só é possível com a ajuda mútua, além de ser muito mais prazeroso o trabalho em equipe. É por isso que deixo

aqui meus agradecimentos sinceros a todos aqueles que, generosamente, contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

*“Pai nosso que estais no céu, eu te agradeço por absolutamente tudo e, em especial, pelas bênçãos que me concedes a cada dia, por sempre me guiar e me capacitar a realizar com amor o que é da Tua vontade.”*

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1 Geral .....	4
2.2 Específicos .....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
3.1 Panorama mundial e nacional da Tilapicultura .....	5
3.2 Aproveitamento de subprodutos da aqüicultura.....	7
3.3 Gelatina .....	10
3.3.1 <i>Gelatina de peixe</i> .....	13
<i>Métodos de extração de gelatina de peixe</i> .....	17
3.4 Microencapsulação .....	23
3.4.1 <i>Microencapsulação por Coacervação Complexa</i> .....	26
3.4.1.1 <i>Materiais de parede das micropartículas</i> .....	31
3.4.1.2 <i>Recheio das micropartículas</i> .....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	36
4.1 Material .....	36
4.2 Equipamentos .....	36
4.3 Métodos .....	37
4.3.1 <i>Extração de gelatina de pele de tilápia</i> .....	37
4.3.2 <i>Caracterização de gelatina de pele de tilápia</i> .....	38
4.3.2.1 <i>Rendimento de extração</i> .....	39
4.3.2.2 <i>Composição centesimal</i> .....	39
4.3.2.2.1 <i>Umidade</i> .....	39
4.3.2.2.2 <i>Proteína</i> .....	39
4.3.2.2.3 <i>Gordura</i> .....	39
4.3.2.2.4 <i>Cinzas</i> .....	40
4.3.2.3 <i>Distribuição de massa molar</i> .....	40
4.3.2.4 <i>Determinação do ponto de fusão</i> .....	40
4.3.2.5 <i>Força de gel (Bloom) e Análise do perfil de textura (TPA)</i> .....	41

4.3.3	<i>Elaboração de Micropartículas por Coacervação Complexa</i> .....	42
4.3.3.1	<i>Determinação do pH de coacervação por Turbidimetria</i> .....	42
4.3.3.2	<i>Produção de Micropartículas no Planejamento Experimental</i> ...	42
4.3.3.3	<i>Planejamento Experimental</i> .....	44
4.3.3.3.1	<i>Eficiência de Encapsulação (%EE)</i> .....	45
4.3.3.4	<i>Alteração do Recheio das Micropartículas</i> .....	46
4.3.4	<i>Caracterização das Micropartículas</i> .....	46
4.3.4.1	<i>Determinação de umidade</i> .....	46
4.3.4.2	<i>Determinação de proteína</i> .....	46
4.3.4.3	<i>Determinação de lipídeos totais</i> .....	47
4.3.4.4	<i>Secagem das Micropartículas</i> .....	47
4.3.4.5	<i>Determinação do diâmetro médio de partículas e distribuição de tamanho</i> .....	48
4.3.4.6	<i>Morfologia</i> .....	48
4.3.5	<i>Análise Estatística</i> .....	49
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	50
5.1	<i>Produção da matéria-prima (Gelatina de peixe)</i> .....	50
5.1.1	<i>Rendimento de extração de gelatina de pele de tilápia</i> .....	50
5.1.2	<i>Caracterização de gelatina de pele de tilápia</i> .....	51
5.1.2.1	<i>Aspecto geral dos dois lotes de gelatina de peixe produzidos</i> ..	51
5.1.2.2	<i>Composição centesimal</i> .....	52
5.1.2.3	<i>Distribuição da massa molar das gelatinas</i> .....	54
5.1.2.4	<i>Ponto de fusão das gelatinas</i> .....	56
5.1.2.5	<i>Força de gel (Bloom) e análise do perfil de textura (TPA)</i> .....	58
5.2	<i>Estudo das condições para produção de micropartículas coacervadas utilizando gelatina de peixe</i> .....	62
5.2.1	<i>Determinação do pH de coacervação por turbidimetria para produção de micropartículas coacervadas</i> .....	62
5.2.2	<i>Elaboração de micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja</i> .....	65

5.2.2.1 <i>Caracterização das micropartículas produzidas no planejamento experimental</i> .....	68
5.2.2.1.1 Morfologia .....	68
5.2.2.1.2 Aspecto geral das micropartículas .....	72
5.2.2.1.3 Diâmetro médio e distribuição de tamanho .....	73
5.3 <i>Elaboração de micropartículas contendo óleo de salmão</i> .....	76
5.3.1 <i>Caracterização das micropartículas contendo óleo de salmão</i> .....	76
5.3.1.1 <i>Diâmetro médio e distribuição de tamanho</i> .....	78
5.3.1.2 <i>Morfologia e microestrutura</i> .....	81
6. CONCLUSÕES .....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
8. ANEXOS .....	110
8.1 Anexo 1: Espectro de varredura de gelatina de peixe do segundo lote solubilizada em água destilada na concentração de 5,0%. .....	110
8.2 Anexo 2: Espectro de varredura de gelatina de peixe do segundo lote solubilizada em água destilada na concentração de 7,5%. .....	111
8.3 Anexo 3: Espectro de varredura de gelatina suína solubilizada em água destilada na concentração de 5,0%. .....	112
8.4 Anexo 4: Espectro de varredura de gelatina suína solubilizada em água destilada na concentração de 7,5%. .....	113

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de estruturas obtidas nos processos de microencapsulação. A: Mononucleada (microcápsula); B: Multinucleada (micropartícula ou microesfera). Adaptado de ALVIM (2005). .....	26
Figura 2: Fluxograma da extração de gelatina de pele de tilápia. ....	38
Figura 3: Fluxograma de elaboração de micropartículas por coacervação complexa. ....	44
Figura 4: Aspecto visual da coloração das diferentes amostras de gelatina. GS: gelatina suína; GP1: gelatina de peixe do 1º lote; GP2: gelatina de peixe do 2º lote.....	51
Figura 5: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de gelatina suína comercial (2), e de gelatina de tilápia do 1º lote (3) e 2º lote (4) em relação ao padrão (1)...	55
Figura 6: Efeito do pH na absorbância do par polimérico Gelatina de peixe do 2º lote (GP) : Goma arábica (GA) na proporção de 1:1, com 2,5% (a 590nm), 5% (a 292nm) e 7,5% (a 292nm) de polímero total de parede (p/p), como função do pH. ....	64
Figura 7: Efeito do pH na absorbância do par polimérico Gelatina suína (GS) : Goma arábica (GA) na proporção de 1:1, com 2,5% (a 590nm), 5% (a 292nm) e 7,5% (a 292nm) de polímero total de parede (p/p), como função do pH.....	64
Figura 8: Gráfico de Pareto com valor estimado dos efeitos principais e interações de segunda ordem para as variáveis estudadas ao nível de 95% de confiança (p = 0,05).....	67
Figura 9: Gráfico de barras contendo o efeito do aumento da quantidade de recheio sobre a Eficiência de Encapsulação das micropartículas coacervadas. ....	68
Figura 10: Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas produzidas com 6000 rpm de velocidade para a formação da emulsão (gelatina de peixe do 2º lote + oleoresina de páprica e óleo de soja 1:20 p/p), contendo proporção de polímeros de parede (gelatina de peixe do	

2º lote : goma arábica) de 1:1 p/p. A: Micropartículas com 2,5% de parede, 50% recheio; B: Micropartículas com 2,5% de parede, 150% recheio; C: Micropartículas com 7,5% parede, 50% recheio; D: Micropartículas com 7,5% parede, 150% recheio. Barras = 40 µm.....70

Figura 11: Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas produzidas com 14000 rpm de velocidade para a formação da emulsão (gelatina de peixe do 2º lote + oleoresina de páprica e óleo de soja 1:20 p/p), contendo uma proporção de polímeros de parede (gelatina de peixe do 2º lote : goma arábica) de 1:1 p/p. A: Micropartículas com 2,5% de parede, 50% recheio; B: Micropartículas com 2,5% de parede, 150% recheio; C: Micropartículas com 7,5% parede, 50% recheio; D: Micropartículas com 7,5% parede, 150% recheio. Barras = 40 µm.....71

Figura 12: Imagem obtida por microscopia ótica de micropartículas coacervadas produzidas com as condições do ponto central do planejamento experimental: 10000 rpm de velocidade para a formação da emulsão (gelatina de peixe do 2º lote + oleoresina de páprica e óleo de soja 1:20 p/p), 5,0% de parede formada por gelatina de peixe do 2º lote : goma arábica na proporção de 1:1 p/p e 100% de recheio. Barras = 40µm. ....71

Figura 13: Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas úmidas produzidas com as seguintes condições: 14000 rpm de velocidade para a formação da emulsão, 2,5% de parede contendo a proporção de 1:1 p/p de gelatina: goma arábica e 50% de recheio (óleo de salmão). ....83

Figura 14: Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas liofilizadas seguidas de reidratação em água, produzidas com as mesmas condições descritas na Figura 13. A: MGS - Micropartículas contendo parede formada por goma arábica e gelatina suína comercial; B: MGP1 - Micropartículas contendo parede formada por goma arábica e gelatina de peixe do 1º lote; C: MGP2 - Micropartículas contendo parede formada por goma arábica e gelatina de peixe do 2º lote. Barras = 40µm. Meio de captação: água. ....84

Figura 15: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de micropartículas coacervadas liofilizadas produzidas com as mesmas condições descritas na Figura 13. A: MGS - Micropartículas contendo parede formada por goma arábica e gelatina suína comercial (A1 barra = 100µm; A2 barra = 10 µm); B: MGP1 - Micropartículas contendo parede formada por goma arábica e gelatina de peixe do 1º lote (B1 barra = 100 µm; B2 barras = 10 µm); C: MGP2 - Micropartículas contendo parede formada por goma arábica e gelatina de peixe do 2º lote (C1, C2 barras = 100 µm). .....85

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Trabalhos sobre condições de extração de gelatina de pele de peixe.....	21
Tabela 2: Variáveis e respectivos níveis usados no planejamento experimental.....	45
Tabela 3: Composição centesimal de pele de Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ), gelatina suína comercial e dois lotes de gelatina de tilápia.....	52
Tabela 4: Temperaturas de fusão de gelatina suína e de gelatina de peixe do 1º e 2º lotes. ....	58
Tabela 5: Comparação das medidas de força de gel ( <i>Bloom</i> ) de gelatina suína (GS) e de gelatinas de peixe (GP 1º lote e GP 2º lote). ....	59
Tabela 6: Medidas de dureza de gelatina suína (GS) e de gelatinas de peixe de 1º e de 2º lotes (GP 1º lote; GP 2º lote). ....	62
Tabela 7: Planejamento experimental (variáveis numéricas e codificadas) e resposta para avaliação da produção de micropartículas por coacervação complexa.....	66
Tabela 8: Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ) e distribuição de tamanho das micropartículas coacervadas úmidas contendo uma mistura de oleoresina de páprica e óleo de soja. ....	74
Tabela 9: Eficiência de Encapsulação e percentual de umidade das micropartículas contendo óleo de salmão. ....	77
Tabela 10: Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ) e distribuição de tamanho das micropartículas coacervadas úmidas contendo óleo de salmão como recheio. ....	78
Tabela 11: Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ) e distribuição de tamanho das micropartículas coacervadas reidratadas, contendo óleo de salmão como recheio. ....	80

## RESUMO

Dois grandes desafios na cadeia produtiva da piscicultura são o aproveitamento dos subprodutos gerados durante o processamento do pescado e a produção de micropartículas que sejam mais atrativas para a alimentação de larvas de peixes. O objetivo do trabalho foi extrair e caracterizar gelatina de pele de tilápia para utilizá-la como um substituto das gelatinas de mamíferos na formação da parede, juntamente com goma arábica, de micropartículas obtidas por coacervação complexa contendo como recheio o óleo de salmão. Gelatina de pele de tilápia foi obtida e caracterizada e comparada com gelatina suína comercial quanto à força de gel (*Bloom*), perfil de textura, ponto de fusão, distribuição de massa molar e composição centesimal. Foram também avaliadas as condições de processamento das micropartículas, sua morfologia e microestrutura por microscopia óptica e eletrônica de varredura, diâmetro médio e eficiência de encapsulação. Os resultados de força de gel para gelatina suína e de peixe do segundo lote produzido foram bastante similares, apresentando valores de  $192,2 \pm 2,9$  g e de  $202,8 \pm 3,7$  g, respectivamente. O primeiro lote de gelatina de peixe apresentou valor de força de gel bem inferior em relação ao segundo lote ( $11,5 \pm 0,7$  g), devido à presença de um conteúdo lipídico relativamente maior no primeiro lote. A gelatina suína apresentou ponto inicial de fusão maior ( $27,5^{\circ}\text{C}$ ) que as gelatinas de peixe do primeiro e do segundo lotes ( $18,5^{\circ}\text{C}$  e  $24,0^{\circ}\text{C}$ , respectivamente). Quanto à distribuição de massa molar, observou-se maior degradação na gelatina suína do que nas gelatinas de peixe. O aumento da velocidade de agitação (14000 rpm) produziu micropartículas com recheio constituído por gotículas menores de óleo. O aumento da concentração de polímeros de parede (5,0 e 7,5%) resultou na produção de partículas com formatos irregulares. As diferentes gelatinas utilizadas para formação das paredes das micropartículas não provocaram alterações significativas nas eficiências de encapsulação, com os valores variando de 59,7 a 72,4%. Os diâmetros médios das micropartículas produzidas com as diferentes gelatinas e com os diferentes recheios variaram de 83 a 150

µm. A utilização de óleo de salmão e gelatina de peixe não modificou a morfologia das micropartículas, que mantiveram a esfericidade característica e a integridade das paredes. Considerando os resultados obtidos, conclui-se que é possível substituir gelatina suína comercial por gelatina de pele de tilápia e oleoresina de páprica + óleo de soja por óleo de salmão, permitindo uma produção de micropartículas ricas em ômega 3 e com uma possível maior atratividade na alimentação de larvas de peixes.

**Palavras-chave:** Gelatina de pele de peixe; Óleo de salmão; *Oreochromis niloticus*; Microencapsulação; Eficiência de encapsulação; Coacervação complexa.

## ABSTRACT

Two great challenges in the pisciculture production chain are the use of by-products generated during the fish processing and the production of more attractive microparticles for fish larvae feeding. The aim of this work was to extract and to characterize gelatin from tilapia skin to use it as a substitute of mammalian gelatins in the formation of matrix of microparticles, obtained by complex coacervation, containing salmon oil. Tilapia skin gelatin was obtained, characterized and compared to commercial pig gelatin as for gel strength (*Bloom*), texture profile, melting point, molecular weight distribution and proximate composition. Conditions of microparticles processing were also evaluated, their morphology and microstructure by optical and scanning electron microscope, mean diameter and encapsulation efficiency. Pig gelatin and one second lot of fish gelatin exhibited quite similar results of gel strength with values of  $192,2 \pm 2,9$  g and  $202,8 \pm 3,7$  g, respectively. Gel strength of first lot of fish gelatin ( $11,5 \pm 0,7$  g) was smaller than the second lot due to the lipid content slightly larger in the first lot. Pig gelatin presented an initial melting point larger ( $27,5^{\circ}\text{C}$ ) than first and second lots of fish gelatins ( $18,5^{\circ}\text{C}$  and  $24,0^{\circ}\text{C}$ , respectively). Related to the molecular weight distribution, more degradation was observed in pig gelatin than fish gelatin. Higher agitation speed (14000 rpm) produced microparticles with core material constituted by smaller droplets of oil. The increase of the concentration of matrix polymeric material (5,0 and 7,5%) resulted in production of particles with irregular formats. The different gelatins used as matrix of microparticles did not cause significant alterations in the efficiencies of encapsulation, with values varying from 59,7 to 72,4%, as well as, the replacement of oleoresin of paprika + soy oil for salmon oil also did not produced significant differences among the microparticles regarding to this parameter. The mean diameter remained between 83 and 150  $\mu\text{m}$  considering all the particles produced. The application of salmon oil and fish gelatin did not impair the morphology of microparticles that kept the characteristic spherical

format and the wall integrity. Considering the obtained results, it is possible to substitute commercial pig gelatin for tilapia skin gelatin and oleoresin of paprika + soybean oil for salmon oil, allowing a production of microparticles rich in omega 3 oil and possibly with a greater attractiveness in the feeding of fish larvae.

**Key-words:** Fish skin gelatin; Salmon oil; *Oreochromis niloticus*; Microencapsulation; Efficiency of encapsulation; Complex coacervation.

## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura comercial brasileira é variada, porém o maior volume de cultivo e comercialização é realizado com um pequeno número de espécies. No setor de piscicultura a Tilápia Nilótica (*Oreochromis niloticus*) é a espécie mais cultivada no Brasil, apresentando características bastante atraentes para o cultivo, como sua grande capacidade de adequar-se a vários sistemas de produção, robustez, rápido crescimento, fácil reprodução e carne de excelente sabor (FITZSIMMONS, 2000).

Uma quantidade significativa de resíduos orgânicos é gerada nas diferentes etapas da cadeia produtiva da piscicultura e devido à heterogeneidade de crescimento dos peixes durante a produção, pode ocorrer o descarte desses animais, quando eles não atingem o tamanho comercial, sendo possível a sua utilização como resíduo da produção. Sendo assim, a necessidade do aproveitamento integral dos subprodutos gerados pelo cultivo de peixes é crescente, principalmente devido à porcentagem elevada dos resíduos após filetagem que tem sido um problema para o produtor ou para o abatedouro. Para a tilápia, o rendimento médio em filé é de 30% aproximadamente, e os 70% de resíduos incluem: cabeça (14%), carcaça (35%), vísceras (10%), pele (10%) e escamas (1%). Estes resíduos constituem matéria-prima de alta qualidade para obtenção de diferentes subprodutos da cadeia produtiva da piscicultura, principalmente em relação à tilápia. O uso comercial da pele para a produção de gelatina permite a obtenção de lucros extras pelas indústrias processadoras e a redução dos efeitos prejudiciais ao ambiente, pois normalmente estes materiais acabam sendo descartados (VIDOTTI & GONÇALVES, 2006).

O emprego das gelatinas tem se difundido ao longo dos anos nas indústrias farmacêuticas, de alimentos, de cosméticos e fotográficas. É utilizada para aumentar a elasticidade, consistência e estabilidade de produtos alimentícios, devendo, desta forma, apresentar boas propriedades reológicas (força de gel, viscosidade e ponto de fusão). As gelatinas também contribuem para enriquecer o conteúdo de proteína dos alimentos e podem funcionar como um filme externo

para a proteção contra desidratação, luz e oxigênio (CHOI & REGENSTEIN, 2000; MONTERO & GÓMEZ-GUILLÉN, 2000).

A troca da gelatina de mamíferos pela de peixes é essencial para uma parcela da população que não se alimenta de produtos derivados de mamíferos por questões religiosas, ou por outros motivos, porém, tem sido considerado como principal inconveniente do uso de gelatinas de peixes, a formação de géis que tendem a ser menos estáveis e com propriedades reológicas inferiores às gelatinas convencionais de mamíferos. Entretanto, ao contrário das gelatinas de mamíferos, necessita-se de um conhecimento mais aprofundado sobre suas propriedades, especialmente se passarem a ser produzidas em maior escala que nos dias atuais (NORLAND (1990) citado por GIMÉNEZ et al., 2005c; GUDMUNDSSON, 2002).

A principal diferença estrutural entre as gelatinas de mamíferos e de peixes é o conteúdo de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina), que ocorre em quantidade superior nas primeiras e leva à formação de géis com maior força. Todavia, as gelatinas de peixes tropicais são mais semelhantes às gelatinas de mamíferos no que diz respeito às propriedades reológicas porque possuem maior conteúdo de iminoácidos que as gelatinas de peixes de águas frias (GUDMUNDSSON, 2002; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002).

A gelatina de peixe tem sido empregada na fabricação de sobremesas, de filmes para produção de embalagens biodegradáveis, de cápsulas, etc. Além disso, a produção de micropartículas, contendo gelatina de peixe na formação da parede das mesmas, através da técnica de microencapsulação, pode ser interessante para várias finalidades (ZHOU & REGENSTEIN, 2007; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002).

A microencapsulação é uma técnica de ampla abrangência de atuação que vem sendo aplicada em diversos ramos da indústria (alimentícia, farmacêutica, química, agrícola, entre outras), pois uma infinidade de substâncias pode ser retida/protegida dentro das micropartículas formadas. Consiste no revestimento destas pequenas partículas/gotículas através de um material que funcione como proteção deste ingrediente contra interações indesejáveis com o

ambiente ou com outros constituintes de um produto, permitindo uma liberação controlada da substância encapsulada no momento e local desejados. Além disso, apresenta as vantagens de converter substâncias líquidas ou gasosas em pós e de mascarar propriedades indesejáveis do material encapsulado (SPARKS, 1981; GODWIN & SOMERVILLE, 1974; SHAHIDI & HAN, 1993; RÉ, 1998).

A seleção do método para a elaboração das micropartículas depende, em grande parte, das características de solubilidade dos componentes ativos e dos materiais de recheio (DHOOT, 2006). Na coacervação complexa ocorre uma separação espontânea de fases baseada em uma interação eletrostática entre dois polímeros com cargas opostas em solução, que se associam formando um complexo neutro que precipita. Estes complexos podem se formar ao redor de partículas/gotículas de interesse através da manipulação das condições do meio, ocorrendo, assim, a microencapsulação. Este método é bastante eficiente na encapsulação de compostos com baixa solubilidade ou insolúveis em água (TOLSTOGUZOV, 1997; SCHMITT et al., 1998; KRUIFF & TUINIER, 2001; KRUIFF et al., 2004).

Neste trabalho, a gelatina de peixe foi extraída de pele de tilápia e caracterizada quanto a suas propriedades para ser posteriormente empregada, em substituição ao uso habitual de gelatina de mamíferos, como um dos polímeros de parede, juntamente com goma arábica, de micropartículas obtidas por coacervação complexa. A maior parte dos materiais utilizados para a produção das micropartículas foi proveniente de peixes, pois além da matriz de gelatina de peixe, foi encapsulado óleo de salmão, tornando-as veículos de maior atratividade para larvas de peixes e que poderiam carrear diversos tipos de material ativo, como: hormônios para reversão sexual, vacinas, ou mesmo nutrientes essenciais como o ômega 3 do óleo de salmão, que permanecerão protegidos até a sua utilização, evitando que sejam lixiviados pela água ou deteriorados por oxidação.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Extrair e caracterizar gelatina de pele de tilápia para utilizá-la como um substituto das gelatinas de mamíferos na formação da parede de micropartículas.

Produzir e caracterizar micropartículas obtidas por coacervação complexa formadas por gelatina de peixe e goma arábica e recheio hidrofóbico (óleo de salmão).

### **2.2 Específicos**

Caracterizar a gelatina de tilápia quanto à força de gel (*Bloom*), perfil de textura (TPA), ponto de fusão, distribuição de massa molar e composição centesimal.

Avaliar as condições de processamento das micropartículas obtidas por coacervação complexa, sua morfologia e microestrutura, diâmetro médio e eficiência de encapsulação.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Panorama mundial e nacional da Tilapicultura

A tilápia é hoje o segundo peixe mais cultivado do mundo segundo a FAO 2007, ficando atrás apenas da carpa. A produção mundial ultrapassou os 2 milhões de toneladas em 2005, sendo que só a China produziu mais de 900 mil toneladas de tilápia, seguida pelo Egito, com pouco mais de 200 mil toneladas, e posteriormente Indonésia, Filipinas, México, Tailândia, Taiwan e o Brasil, ocupando a 8ª posição no ranking mundial com 67.850 toneladas. Em 2002, China, Egito, Filipinas, Indonésia e Tailândia foram os responsáveis por 87% da produção mundial de tilápia, sendo que 50% deste total foram produzidos apenas pela China (EL-SAYED, 2006).

A aquicultura comercial brasileira é muito variada, explorando cerca de duas dúzias de espécies de peixes, camarões e bivalves. Apesar disso, o maior volume de cultivo e comercialização é realizado com um pequeno número de espécies.

No setor de piscicultura, se destaca a Tilápia Nilótica (*Oreochromis niloticus*), que, segundo dados do Departamento de Pesca e Aquicultura do Ministério da Agricultura (2003), é a espécie mais cultivada no Brasil. A maior parte da produção nacional se localiza na região Nordeste e Sul, alcançando cerca de 70% do total produzido. A região sudeste responde por 14% e a centro oeste por 3%.

No século XX, a tilápia foi introduzida na maioria dos países do mundo, sendo criada em pelo menos 100 desses. É conhecida como o peixe mais importante de toda aquicultura do século XXI, apresentando uma grande quantidade de características fisiológicas, reprodutivas, genéticas e principalmente mercadológicas (FITZSIMMONS, 2000).

De 1990 até os dias atuais, a produção de tilápia apresentou grande expansão, sendo que em 2002 representou 2,93% do total da produção mundial e um crescimento médio anual de 12,2% (EL-SAYED, 2006).

No início da década de 60, a produção de tilápia foi considerada um fator estratégico na expansão da aquicultura como maneira de se obter proteína animal com baixo custo. Devido a suas características comerciais, a tilápia cultivada está se tornando um substituto de vários peixes de água fria no mercado mundial (ALCESTE & JORY, 2002).

Um dos fatores que contribui para a grande expansão na produção de tilápia em todo o mundo é a grande capacidade de adequar-se aos vários sistemas de produção, ou seja, sistema extensivo, com a utilização de subprodutos ou consorciadas com outras espécies, ou sistemas intensivos de alta densidade (FITZSIMMONS, 2000). Além disso, sua carne possui sabor neutro, ausência de espinhos intramusculares em forma de “Y” no seu filé, apresenta rápido crescimento, fácil reprodução e suas larvas são obtidas com facilidade. Sendo assim, a tilápia é o peixe mais promissor para a expansão da aquicultura mundial (FURUYA et al., 2003).

### *Espécie*

Tilápia é a designação de um grupo de peixes que abrange cerca de 70 espécies, divididas em quatro gêneros, sendo três os de importância comercial: *Tilapia* spp., *Oreochromis* spp. e *Sarotherodon* spp., pertencentes à família Cichlidae, subfamília Tilapiinae, originários do continente africano (POPMA & MASSER, 1999). Sua área de distribuição natural ocorre nas bacias dos rios Nilo, Níger e Senegal, de onde foi disseminada para quase todo o mundo (LEONHARDT, 1997).

O nome tilápia foi empregado pela primeira vez por Smith em 1940. É um vocábulo africano que significa “peixe”, derivado das palavras “thiape” do Bechuana e “thlapi” ou “ngege” no idioma “swahili”, população indígena que habita a costa do lago Ngami (África) (CASTILLO CAMPO, 2006).

A tilápia do Nilo foi introduzida no Brasil pelo estado do Ceará, através do D.N.O.C.S. (Departamento Nacional de Obras Contra a Seca), em Pentecoste em 1971, procedente da Costa do Marfim, África. Recebeu a denominação de Tilápia do Nilo por ser oriunda da bacia deste rio africano.

Esta espécie de peixe é facilmente reconhecida por apresentar listras verticais na nadadeira caudal, coloração metálica, corpo curto e alto, cabeça e cauda pequenas (GALLI & TORLONI, 1986).

Adaptam-se muito bem em regiões tropicais e subtropicais onde as temperaturas da água variam entre 18 e 30°C, entretanto, são sensíveis a temperaturas abaixo de 12°C e acima de 42°C, podendo ser letais para estes peixes (LUND & FIGUEIRA, 1989).

É uma espécie muito rústica, que ganha peso rapidamente, cujo hábito alimentar é fitoplantófago, ou seja, alimenta-se de algas unicelulares, o que torna esta espécie mais adequada às pisciculturas em águas tropicais (WATANABE, 2001). Pode ser considerada também de hábito alimentar onívoro ou herbívoro, por apresentar diversos hábitos alimentares (BARD, 1980). Em condições naturais a tilápia ingere uma grande variedade de alimentos, incluindo plâncton, folhas verdes, organismos bênticos, pequenos invertebrados aquáticos, detritos e matéria orgânica em decomposição.

Esta espécie pode iniciar sua vida reprodutiva em torno de 50g, desviando os nutrientes consumidos para as atividades e processos ligados à reprodução. A desova acontece naturalmente a uma temperatura superior a 20°C, a cada 50 a 60 dias, podendo gerar de 100 a 500 juvenis, o que contribui para a heterogeneidade da população, mas a produção final pode ser prejudicada pela competição por alimento e oxigênio.

### **3.2 Aproveitamento de subprodutos da aqüicultura**

Uma quantidade significativa de resíduos orgânicos é gerada nas diferentes etapas da cadeia produtiva da piscicultura, desde a produção até a

comercialização no varejo. Devido à heterogeneidade de crescimento dos peixes durante a produção, pode ocorrer o descarte desses animais durante as classificações e despescas, quando eles não atingem o tamanho comercial, sendo possível a sua utilização como resíduo da produção. Sendo assim, a necessidade do aproveitamento integral dos subprodutos gerados pelo cultivo de peixes é crescente, principalmente devido à porcentagem elevada dos resíduos após filetagem que tem sido um problema para o produtor ou para o abatedouro (VIDOTTI & GONÇALVES, 2006).

Os tipos e as quantidades de resíduos gerados na industrialização dependerão do tipo de processamento empregado, da espécie do peixe, do seu tamanho, etc. Atualmente, a espécie de peixe de água doce mais industrializada no Brasil é a tilápia, processada para a obtenção de filés frescos ou congelados. O rendimento médio em filé é de 30% aproximadamente, e os 70% de resíduos incluem: cabeça (14%), carcaça (35%), vísceras (10%), pele (10%) e escamas (1%) (VIDOTTI & GONÇALVES, 2006).

Estes resíduos constituem matéria-prima de alta qualidade para obtenção de diferentes subprodutos da cadeia produtiva da piscicultura, principalmente em relação à tilápia. Além disso, seu aproveitamento é ecologicamente recomendável em razão da alta carga de matéria orgânica que seria descartada no ambiente caso não fossem aproveitados.

Existem várias utilidades nesse tipo de aproveitamento: extração de colágeno (escamas e peles) para a indústria farmacêutica e alimentícia; curtimento de pele para a indústria mobiliária, vestuário, artesanato e diferentes objetos; produção de polpa para fabricação de empanados, produtos semiprontos; cozinha institucional (de merenda escolar, restaurantes universitários, restaurantes de empresas, hospitais, presídios, etc.); compostagem; silagem, farinha e óleo de peixe (VIDOTTI & GONÇALVES, 2006).

Dentre estes resíduos, a pele é um dos principais subprodutos, cuja porcentagem em peixes teleósteos varia de 4,5 a 10% em função da espécie e forma de sua retirada (método de filetagem). Em tilápias do Nilo representam 4,8% a 8,5% (MACEDO-VIEGAS et al., 1997; SOUZA E MACEDO-VIEGAS, 2001;

SOUZA, 2003a). Para bagre africano (*Clarias gariepinus*), valores de 4,4% a 6,5%, dependendo da categoria de peso (SOUZA et al., 1999); para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), uma porcentagem de pele de 5,1% e para a carpa espelho (*Cyprinus carpio specularus*), em torno de 4,65% (SOUZA et al., 2002).

A elaboração de couro e gelatina a partir das peles da filetagem de pescados são excelentes alternativas de aproveitamento de subprodutos dos processamentos de tilápias, representando uma fonte alternativa de renda que pode servir de matéria-prima para a fabricação de diversos produtos.

A pele de peixe é um subproduto nobre e de alta qualidade, possuindo resistência como característica peculiar. Além desta característica, para as espécies de peixes com escamas, as lamélulas de proteção na inserção da escama (ALMEIDA, 1998) resultam, após o curtimento, em um couro de aspecto típico e difícil de ser imitado, garantindo exclusiva padronagem de alto impacto visual (ADEODATO, 1995).

As peles de peixe diferem das peles de mamíferos, por estarem cobertas por delgadas epidermes, podendo ou não possuir escamas e não apresentam glândulas sebáceas. A derme, que é uma camada localizada abaixo da epiderme, é constituída por grossos feixes de colágenos, dispostos paralelamente à superfície da pele e que estão entrelaçados de espaço em espaço por grossos feixes perpendiculares à superfície, em muitas espécies de peixes (JUNQUEIRA, 1983).

O colágeno é a proteína mais importante para o curtidor por agir com agentes curtentes (HOINACKI, 1989), e também bastante importante para a produção de gelatina, o que diminui os custos de matéria-prima e colabora para a redução do volume de resíduos gerados que poluem o meio ambiente (SOUZA, 2003b).

### 3.3 Gelatina

A gelatina é uma proteína que possui baixo teor de triptofano, além de ser pobre em tirosina, cistina e metionina, obtida industrialmente a partir do colágeno de ossos, cartilagens e peles de animais. O colágeno e a gelatina são diferentes formas da mesma macromolécula, sendo possível descrevê-la como colágeno hidrolisado (LEDWARD (1986) citado por MONTERO & GÓMEZ-GUILLÉN, 2000). O elemento básico na formação do colágeno é o tropocolágeno, que consiste de três hélices esquerdas que se entrelaçam formando uma super-hélice direita. Na estrutura final do tropocolágeno maduro, o número de interligações aumenta com a idade do animal tornando o colágeno mais rígido e menos solúvel (POPPE, 1997).

A preparação industrial de gelatina envolve a hidrólise controlada da estrutura organizada do colágeno para obter gelatina solúvel através de um pré-tratamento ácido ou alcalino da matéria-prima. Em seguida, este material é submetido a uma desnaturação térmica. Durante a desnaturação do colágeno para a extração de gelatina, a molécula de colágeno é quebrada em pequenos fragmentos e as triplas hélices são separadas, fazendo com que as massas molares variem dependendo da preparação e fonte da matéria-prima. A hidrólise do colágeno pode atingir três resultados: formar três cadeias  $\alpha$  independentes, formar uma cadeia  $\beta$  e uma  $\alpha$ , ou apenas uma cadeia  $\gamma$ . A principal diferença entre as formas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  da gelatina é a massa molar. Para a forma  $\alpha$ , a massa varia de 80 a 125 kDa, para a  $\beta$ , de 160 a 250 KDa e a forma  $\gamma$  possui a massa molar de 240 a 375 KDa. As maiores massas molares usualmente são características de melhores preparações (POPPE, 1997).

A extração da gelatina a partir do colágeno é realizada com diferentes temperaturas (de 60°C a 90°C) e é pH-dependente, sendo que a seleção do pH é feita visando-se maximizar a taxa de extração e manutenção de suas propriedades físicas (CARVALHO, 2002). Suas propriedades reológicas são influenciadas pela fonte, idade do animal e tipo de colágeno (LEDWARD (1986) citado por MONTERO & GÓMEZ-GUILLÉN, 2000), além das características dos

processos de extração e degradação molecular (LEUENBERGER, 1991). O tipo de pré-tratamento químico e parâmetros de extração podem influenciar o tamanho das cadeias polipeptídicas e propriedades funcionais da gelatina. Além disso, as propriedades de um gel de gelatina vão depender da fonte, das condições de processamento, da matéria-prima, da concentração da gelatina, do pH e do tempo e temperatura de maturação (KOLODZIEJSKA et al., 2004).

O ponto isoelétrico da gelatina pode variar em função da sua forma de obtenção, ficando em torno de 4,5 a 5,3 para gelatinas tipo B (pré-tratamento de hidrólise com pH alcalino) e permanecendo entre 7,0 a 9,4 na gelatina tipo A (pré-tratamento ácido). As condições do processamento de hidrólise ácida são diferentes, o que minimiza modificações nos grupos amino, mantendo o valor próximo do pH do colágeno. Porém, na hidrólise alcalina, a gelatina é submetida a longos tratamentos com álcali e apenas uma pequena porção dos grupos amino resiste ao processo (90 a 95% de ácido carboxílico livre) (IMESON, 1997; BERTAN, 2003). O pré-tratamento ácido é particularmente adequado para as matérias-primas mais frágeis a exemplo das peles de suínos. A vantagem deste procedimento é sua curta duração, ao contrário do pré-tratamento alcalino (POPPE, 1997).

O emprego das gelatinas tem se difundido ao longo dos anos nas indústrias farmacêuticas, de alimentos, de cosméticos e fotográficas. Na indústria de alimentos, a gelatina é usada como um ingrediente para aumentar a elasticidade, consistência e estabilidade de produtos alimentícios, o que torna imprescindível que a mesma apresente boas propriedades reológicas. Para a elaboração destes produtos, as propriedades de força de gel, viscosidade e ponto de fusão são as mais importantes na caracterização das gelatinas e são afetadas pelos seguintes fatores: concentração da solução de gelatina, tempo e temperatura de maturação do gel, pH e conteúdo de sal (CHOI & REGENSTEIN, 2000). As gelatinas também contribuem para enriquecer o conteúdo de proteína dos alimentos e podem funcionar como um filme externo para a proteção contra desidratação, luz e oxigênio. Portanto, a qualidade de gelatinas usadas em alimentos depende não somente de suas propriedades reológicas, mas também é

determinada por outras características como cor, transparência, fácil dissolução e sabor (MONTERO & GÓMEZ-GUILLÉN, 2000). Este biopolímero desperta bastante interesse devido ao seu custo relativamente baixo, por ser abundante e por possuir excelentes propriedades funcionais (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2006).

A maioria das gelatinas comerciais é derivada de fontes de mamíferos, principalmente suínos e bovinos, porém, devido a algumas particularidades sócio-culturais do islamismo e judaísmo, a gelatina de peixe tem sido pesquisada como uma fonte alternativa de consumo por estes grupos (NORLAND (1990) citado por GIMÉNEZ et al., 2005c). Além das necessidades religiosas, o uso comercial da pele, ossos e vísceras de peixes possibilita acarretar benefícios econômicos à indústria de processamento de peixes, já que grandes quantidades destes materiais são constantemente geradas e normalmente acabam sendo descartadas (CHOI & REGENSTEIN, 2000). A utilização destes subprodutos comumente desperdiçados permite a obtenção de alimentos com alto conteúdo protéico, além de eliminar efeitos prejudiciais ao ambiente e melhorar a qualidade do processamento das indústrias de peixes. Aproximadamente 30% de tais perdas consistem de pele e ossos que possuem alto conteúdo de colágeno (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). Um outro fator relevante para o aumento de interesse pela produção de gelatina a partir de peixes é a ocorrência freqüente de doenças como a Encefalopatia Espongiforme Bovina, que acarreta problemas para a saúde humana e acaba limitando o uso de produtos derivados de mamíferos para o processamento de alimentos funcionais, produtos cosméticos e farmacêuticos (CHO et al., 2005).

Segundo ARNESEN & GILDBERG (2007), há uns 50 anos atrás havia uma produção considerável de goma a partir de pele e ossos de peixes, que é um produto adequado apenas para aplicações técnicas. No entanto, atualmente, a produção de gelatina de peixe é de apenas 1% de toda a produção anual de gelatina no mundo, porém o interesse por esta fonte alternativa de gelatina tem aumentado devido aos fatores citados anteriormente.

### 3.3.1 Gelatina de peixe

Ainda há uma carência de conhecimentos mais aprofundados sobre as propriedades de gelatinas de peixe, ao contrário das gelatinas de mamíferos, mas tem sido considerado como principal inconveniente do uso de gelatinas de peixes, a formação de géis que tendem a ser menos estáveis e com propriedades reológicas inferiores às gelatinas convencionais de mamíferos (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). Entretanto, necessita-se de uma maior informação sobre a qualidade e o escopo de uso das mesmas, especialmente se passarem a ser produzidas em maior escala que nos dias atuais (GUDMUNDSSON, 2002). Uma outra dificuldade técnica na produção de gelatina de peixe para consumo humano tem sido a tentativa de eliminar o odor desagradável do produto, porém GROSSMAN & BERGMAN (1992) desenvolveram um método para diminuir este problema.

Os métodos empregados na preparação de gelatina de mamíferos são um pouco diferentes dos utilizados para extração de gelatina de peixe, devido a suas diferenças nas propriedades físicas e químicas (KOLODZIEJSKA et al., 2008).

Peles de peixe são especialmente adequadas como fonte de gelatina por ser facilmente extraída a temperatura moderada resultando em alta produção. A produção dependerá do tipo de matéria-prima, do pré-tratamento utilizado e das condições de processamento (KOLODZIEJSKA et al., 2004). Cabeça e espinha de peixe também podem ser usadas como fontes de gelatina, apesar de possuírem um conteúdo bem menor de colágeno.

Conforme o que foi citado anteriormente, as propriedades reológicas das gelatinas de peixe diferem das propriedades das gelatinas de bovinos e suínos em alguns aspectos (GUDMUNDSSON, 2002). As gelatinas convencionais, ou seja, de mamíferos, se caracterizam por apresentar temperaturas de fusão e de gelificação maiores que as temperaturas das gelatinas de peixes (GUDMUNDSSON, 2002). Gelatinas de mamíferos são estáveis a 60°C provavelmente como um resultado de moléculas mais estáveis, mas esta resistência à degradação tem sido relacionada ao valor *Bloom* (JONES, 1977 citado por GUDMUNDSSON, 2002).

O valor *Bloom* a uma concentração de 6,67% usualmente serve para medir a força de gel, que é uma propriedade tecnologicamente importante de gelatinas. O aumento dos números *Bloom* corresponde a um aumento linear da força de gel (LEUENBERGER, 1991). Conforme STAINSBY (1977) citado por GUDMUNDSSON (2002), a força de gel de gelatinas é afetada pelas condições de maturação, ou seja, temperatura e tempo de estocagem. A força de gel também pode ser dependente do ponto isoelétrico e pode ser controlada, até certo ponto, pelo ajuste de pH. Podem ser formados géis mais compactos e mais rígidos através do ajuste de pH da gelatina para valores próximos ao ponto isoelétrico, já que as proteínas estarão mais neutras e os polímeros de gelatina mais próximos uns dos outros (GUDMUNDSSON & HAFSTEINSSON, 1997). Os produtos comerciais possuem força de gel entre 50 a 300 g para uma concentração de gelatina a 6,67%, que aumenta com o tempo de maturação e varia inversamente com a temperatura. Segundo GROSSMAN & BERGMAN (1992), géis de gelatina de tilápia apresentam alto valor de *Bloom* (263 g).

As medidas de viscosidade das gelatinas também são influenciadas pelas concentrações e tipos de gelatina, temperatura e condições do método de processamento utilizado (GUDMUNDSSON, 2002). O valor de pH é outro exemplo de parâmetro que afeta a viscosidade, conforme foi demonstrado por LEUENBERGER (1991), sendo que valores de pH alcalinos normalmente acarretam grande queda na viscosidade, enquanto que em regiões de pH ácido, ocorre apenas uma redução moderada da mesma.

A principal diferença estrutural entre as gelatinas de mamíferos e de peixes é o conteúdo de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina), que ocorre em quantidade superior nas primeiras e leva à formação de géis com maior força (GUDMUNDSSON, 2002). Estes iminoácidos estabilizam a conformação ordenada da rede de gel formada pela gelatina (HAUG et al., 2004). Apesar da estabilização da tripla hélice em gelatinas renaturadas ser proporcional ao conteúdo total de iminoácidos, a hidroxiprolina é a mais importante porque esta possui a capacidade de estabelecer pontes de hidrogênio através de seus grupamentos OH (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). O redobrimento das cadeias polipeptídicas de gelatina em

forma de tripla hélice é crítico para o início da gelificação com ambos começando em temperaturas bem próximas. Todavia, a estabilização de géis de gelatina mantidos à baixa temperatura pode ser explicada pelo fato de que a conformação em tripla hélice continua mesmo após a formação do gel (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002).

É conhecido o fato de que as características de temperatura da gelatina e do colágeno de pele de peixe refletem a temperatura do habitat natural do peixe (ANDREEVA, 1971; GUSTAVSON, 1953). As gelatinas de peixes de água fria possuem menor conteúdo de iminoácidos que as gelatinas de peixes tropicais, portanto estas são mais semelhantes às gelatinas de mamíferos no que diz respeito às propriedades reológicas. Por este motivo, podem ser utilizadas para várias aplicações sem necessitar de grandes modificações estruturais, ao contrário das gelatinas de peixe de água fria, que precisam sofrer modificações químicas (adição de glicerol ou de  $MgSO_4$ ) ou enzimáticas (transglutaminase) para se tornarem mais similares às convencionais (GUDMUNDSSON, 2002; KOLODZIEJSKA et al., 2004). De acordo com os resultados obtidos por GÓMEZ-GUILLÉN et al. (2002), os géis de gelatina de *Solea vulgaris* e *Lepidorhombus boscii* demonstraram ser mais estáveis que as gelatinas de *Gadus morhua* e *Merluccius merluccius*, pois o início da fusão ocorreu em torno de 21°C para os primeiros, e entre 13 a 15°C para os peixes adaptados ao frio (*Gadus morhua* e *Merluccius merluccius*), evidenciando que a estabilidade térmica de um gel de gelatina está diretamente correlacionada ao conteúdo de prolina. NORLAND (1990) verificou que as gelatinas provenientes de peles de peixes de águas frias não formaram gel à temperatura ambiente, pois sua temperatura de gelificação foi de 8 a 10° C. Esta característica limita sua aplicação na indústria de alimentos como um componente de gelificação caso não sejam efetuadas algumas modificações em suas propriedades (KOLODZIEJSKA et al., 2004).

Não existe grande variação na composição de aminoácidos entre as preparações de gelatina de diferentes espécies de peixes, embora sejam detectadas diferenças entre elas no conteúdo de alanina e iminoácidos e no grau de hidroxilação (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). A gelatina de *Gadus morhua*

possui um baixo conteúdo de alanina e não apresenta boas propriedades reológicas (GUDMUNDSSON & HAFSTEINSSON, 1997; LEDWARD, 1996 citado por GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002). Um maior conteúdo dos aminoácidos alanina, prolina e hidroxiprolina presente em gelatinas comerciais de *Oreochromis spp* tem sido relacionado como uma das maiores causas responsáveis por suas melhores propriedades viscoelásticas quando comparadas às gelatinas de *Lepidorhombus boscii* (SARABIA et al., 2000 citados por GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2000). Dentro da mesma espécie de peixe, as propriedades físicas das gelatinas se alteram principalmente em função de trocas na composição aminoacídica hidrofóbica (MONTERO & GÓMEZ-GUILLÉN, 2000).

As propriedades das gelatinas não se alteram somente devido à composição aminoacídica e ao conteúdo relativo dos componentes de maior massa molar, mas também pela presença de fragmentos de proteínas de menor massa molar. Portanto, além da fonte ou espécie, estas propriedades dependem intensamente da preservação da matéria-prima (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002).

Algumas espécies de peixes capturadas em grandes quantidades, a exemplo da anchova, não são adequadas para a pesquisa de gelatina por possuírem o corpo pequeno que é totalmente aproveitado, no entanto, *Cyclopterus lumpus*, *Oreochromis sp*, *Gadus morhua*, *Merluccius merluccius*, *Lepidorhombus boscii*, *Conger conger* e lula podem ser utilizados para tal finalidade (CHO et al., 2005). Pele de peixes tropicais, a exemplo da tilápia, tem sido considerada uma ótima matéria-prima para a produção de gelatina (GROSSMAN & BERGMAN, 1992; HOLZER, 1996 citados por GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002).

A gelatina de peixe tem sido estudada para ser destinada a diferentes aplicações em substituição à gelatina de mamíferos, como: fabricação de sobremesas (ZHOU & REGENSTEIN, 2007), fabricação de filmes para produção de embalagens biodegradáveis (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002), produção de cápsulas, entre outras.

### *Métodos de extração de gelatina de peixe*

Estudos sobre diferentes formas de extração de gelatina foram conduzidos com a finalidade de aperfeiçoar o método, já que este é um dos fatores que afeta as propriedades físico-químicas da gelatina resultante. Normalmente o colágeno é pré-tratado com água à temperatura acima de 45°C para a extração da gelatina, sendo que a conversão do colágeno está relacionada à severidade do processo de extração e ao pré-tratamento utilizado. É comum um pré-tratamento em meio ácido de material colagenoso. O colágeno é solubilizado sem alterar a configuração original de tripla hélice, que depois é desestabilizada por um tratamento térmico subsequente por provocar o rompimento de ligações covalentes e de hidrogênio, o que leva à conversão do colágeno em gelatina (MONTERO & GÓMEZ-GUILLÉN, 2000). Alguns procedimentos de extração de gelatina foram propostos por vários autores, com pequenas modificações entre eles.

É conhecido o fato de que eletrólitos têm uma forte influência sobre as propriedades de uma proteína a diferentes forças iônicas e pHs (HERMANSSON, 1975 citado por GIMÉNEZ et al., 2005b). Alguns sais, a exemplo dos cloretos, podem solubilizar proteínas miofibrilares auxiliando na remoção de resquícios de músculos aderidos às peles e predispondo o colágeno a uma extração mais eficiente. Além disso, podem ser retidos na gelatina resultante e, conseqüentemente, influenciar suas propriedades viscoelásticas (GIMÉNEZ et al, 2005b).

Porém, ao contrário dos mamíferos, os efeitos da adição de diferentes sais às gelatinas de peixes não são bem conhecidos. Diante disso, GIMÉNEZ et al. (2005b), estudaram os efeitos sobre as propriedades reológicas e químicas da adição de soluções salinas (NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> e MgSO<sub>4</sub>) durante o procedimento de lavagem da pele de peixe para a posterior extração da gelatina por um pré-tratamento em meio ácido.

A produção de gelatina em que foram empregados KCl e NaCl foi maior em relação às gelatinas que não foram tratadas com sais na etapa de lavagem.

No entanto, a produção foi menor para aquelas submetidas a sais contendo magnésio, provavelmente em decorrência da natureza bivalente deste íon, capaz de formar pontes entre cadeias de colágeno que dificultam a extração de gelatina (GIMÉNEZ et al., 2005b).

Os sais de cloreto de sódio e de potássio também possibilitam uma extração mais facilitada de polímeros de maior massa molar, já que estes sais podem abrir a estrutura do colágeno e facilitar o inchamento pela interação com o ácido acético. Na concentração de 0,8M eles causam uma melhora na extração do colágeno e sua transformação em gelatina solúvel. Esta gelatina resultante apresentou uma maior habilidade de gelificação e maior estabilidade que as provenientes de peles lavadas sem adição de sal. Quando foi utilizado  $MgCl_2$ , a força de gel foi prejudicada, visto que a extração de polímeros de cadeias  $\alpha$  foi reduzida e a gelatina gerada apresentou um alto nível de  $Mg^{2+}$  (GIMÉNEZ et al., 2005b).

GUDMUNDSSON & HAFSTEINSSON (1997), testaram algumas concentrações de hidróxido de sódio, ácido sulfúrico e ácido cítrico no processamento de gelatinas a partir de pele de *Gadus morhua*. A mais alta produção de gelatina foi alcançada quando se utilizou concentração de 0,1 e 0,2% de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio respectivamente, seguido de tratamento de 0,7% de ácido cítrico.

O pH da solução de gelatina foi afetado pelo tratamento químico e variou entre 2.7 e 3.9, com os valores mais altos obtidos em resposta ao uso de concentrações baixas de ácido cítrico, principalmente combinado a uma alta concentração (0.4%) de hidróxido de sódio e/ou ácido sulfúrico. Os pontos isoelétricos variaram de 6.2 a 7.1. As gelatinas liofilizadas apresentaram valor de *Bloom* consideravelmente mais alto que as gelatinas secas ao ar, já que estas últimas provavelmente sofreram maior desnaturação protéica, o que reduziu as propriedades de formação do gel.

Segundo GÓMEZ-GUILLÉN & MONTERO (2001), os ácidos acético e propiônico possibilitam a produção de gelatinas com melhores propriedades viscoelásticas e de gelificação, especialmente quando as peles são tratadas com

NaOH diluído, e o pH ajustado a 4.5-5.0. Também são obtidos bons resultados com ácido láctico e fórmico para a extração de colágeno ou gelatina. Mas quando a concentração do ácido usado para a extração é elevada para valores superiores a 0,05M, não se obtém nenhuma melhoria das propriedades reológicas. Além disso, o uso de pH extremamente baixo leva a uma prevalência de componente viscoso, o que prejudica o desenvolvimento da rede de gel.

O ácido cítrico é amplamente usado para a produção de gelatina de pele de peixes por não introduzir cor ou odor desagradável ao produto (GIMÉNEZ et al., 2005a). Porém, segundo GÓMEZ-GUILLÉN & MONTERO (2001) são obtidas gelatinas com melhores propriedades de gelificação usando ácido acético ao invés de ácido cítrico, pelo fato do anterior ter um tamanho molecular pequeno e baixa constante de ionização, promovendo, assim, um inchamento do colágeno mais adequado antes da conversão em gelatina (GÓMEZ-GUILLÉN, SARABIA & MONTERO, 2000 citados por GIMÉNEZ et al., 2005a).

O ácido láctico é um ácido orgânico de baixa massa molar e que apresenta vantagens de aplicação nos alimentos por ter menos sabor, cor e odor. Em um estudo preliminar com pele de *Lepidorhombus boscii* se demonstrou que o ácido láctico também foi adequado para a extração de gelatina, embora suas características reológicas foram um pouco inferiores às propriedades de gelatinas extraídas com ácido acético (GÓMEZ-GUILLÉN & MONTERO, 2001 citados por GIMÉNEZ et al., 2005a). Por esta razão, e em virtude das vantagens que o ácido láctico apresenta em relação ao ácido acético, este composto foi analisado por GIMÉNEZ et al. (2005a) em função de suas características reológicas, químicas e estruturais a fim de ser aplicado no processo de extração de gelatinas da pele de *Dover sole*.

O ácido láctico parece ser mais eficiente no rompimento das estruturas de colágeno, provavelmente devido a sua alta constante de dissociação e presença do grupo hidroxila que podem estabelecer pontes de hidrogênio adicionais, as quais contribuem para a desnaturação do colágeno. O uso de 25mM de ácido láctico provou ser um excelente substituto para o ácido acético, produzindo gelatinas com propriedades similares às aquelas resultantes de tratamento com

50mM de ácido acético. No entanto, foi obtida uma produção um pouco menor de gelatina tratada com 25mM de ácido láctico e não houve produção com o uso de 10mM deste mesmo ácido, o que evidenciou a necessidade de um pré-tratamento ácido juntamente com uma temperatura moderada (45°C) para a extração (GIMÉNEZ et al., 2005a).

Segundo CHO et al. (2005), é provável que o ajuste da temperatura de extração seja o fator chave no processamento de gelatinas, uma vez que o aumento de 60°C para 75°C provoca uma redução do conteúdo de gelatina e da força de gel. Os resultados de KOLODZIEJSKA et al. (2004) mostram que é possível encurtar o tempo de extração de gelatina de pele de peixes de água fria de 12 horas para apenas 30 minutos a 45°C, quando as peles forem picadas ao invés de serem utilizadas inteiras. No entanto, como é difícil cortá-las, deve ser feito um pré-tratamento das peles com ácido acético (1:6) por 2 horas a 15°C a fim de possibilitar este procedimento (SADOWSKA, KOLODZIEJSKA & NIECILOWSKA, 2003).

Os efeitos das diferentes condições de extração de gelatina de várias espécies de peixes sobre a produção e as propriedades das gelatinas resultantes têm sido estudados por diversos autores, como está esquematizado na Tabela 1 a seguir.

**Tabela 1:** Trabalhos sobre condições de extração de gelatina de pele de peixe.

<b>Espécie de peixe</b>	<b>Formas de extração testadas (compostos utilizados)</b>	<b>Efeitos estudados</b>	<b>Autores</b>
<i>Gadus morhua</i>	Hidróxido de sódio, ácido sulfúrico e cítrico em diferentes concentrações.	Rendimento, força de gel, viscosidade, odor, composição em aminoácidos, ponto isoelétrico.	GUDMUNDSSON & HAFSTEINSSON (1997).
Megrim ( <i>Lepidorhombus boscii</i> ), Hake ( <i>Merluccius merluccius L.</i> )	Cloreto de sódio, hidróxido de sódio, ácido sulfúrico, cítrico e acético.	Propriedades viscoelásticas, viscosidade aparente, composição em aminoácidos, força de gel.	MONTERO & GÓMEZ-GUILLÉN (2000).
Megrim ( <i>Lepidorhombus boscii</i> )	Cloreto de sódio, hidróxido de sódio e diferentes ácidos orgânicos (fórmico, acético, propiônico, láctico, málico, tartárico e cítrico em várias concentrações).	Força de gel, pH, turbidez, propriedades viscoelásticas.	GÓMEZ-GUILLÉN & MONTERO (2001).
Baltic cod ( <i>Gadus morhua</i> )	Diferentes temperaturas e tempos de extração.	Rendimento e composição química.	KOŁODZIEJSKA et. al. (2004).

Yellowfin tuna ( <i>Thunnus albacares</i> )	Hidróxido de sódio em diferentes concentrações, ácido clorídrico, variados tempos de tratamento das peles, e tempo e temperatura de extração diferentes.	Composição centesimal, força de gel, conteúdo de hidroxiprolina, propriedades viscoelásticas, pontos de fusão e de gelificação.	CHO et. al. (2005).
Dover sole ( <i>Solea vulgaris</i> )	Cloreto de sódio, hidróxido de sódio, diferentes concentrações de ácido láctico e acético.	Rendimento, composição em aminoácidos, distribuição de massa molar, força de gel, propriedades viscoelásticas, fenômeno de agregação.	GIMÉNEZ et. al. (2005c).
Dover sole ( <i>Solea vulgaris</i> )	Diferentes soluções salinas, hidróxido de sódio, ácido acético.	Perfil eletroforético, força de gel, propriedades viscoelásticas, cinética de agregação, análise de minerais.	GIMÉNEZ et. al. (2005b).
Catfish	Pré-tratamento alcalino e ácido.	Propriedades físicas, nanoestrutura por microscopia de força atômica.	YANG et. al. (2007).
Bacalhau, salmão, arenque	Diferentes temperaturas e tempos de extração de gelatina a partir de diferentes partes dos peixes.	Rendimento, composição química, perfil eletroforético propriedades de gelificação.	KOŁODZIEJSKA et. al. (2008)

### 3.4 Microencapsulação

A microencapsulação é um processo utilizado para recobrir sólidos, gotículas de líquidos ou materiais gasosos a fim de isolar total ou parcialmente a substância de interesse do ambiente, formando cápsulas. Dessa forma, o material coberto ou encapsulado é liberado de maneira controlada e em condições específicas (SPARKS, 1981). Este material de recheio pode também ser denominado de fase interna ou ativo, e o material de cobertura é conhecido como cápsula, material de parede, membrana, carregador ou casca (GIBBS et al., 1999).

O conceito de microencapsulação tem sua origem na idealização do modelo celular, no qual o núcleo é envolvido por uma membrana semipermeável que o protege do meio externo e ao mesmo tempo controla a entrada e saída de substâncias na célula (JIZOMOTO et al., 1993).

O primeiro produto com material encapsulado surgiu em 1954 na indústria de fotocópias e as primeiras pesquisas na área farmacêutica, realizadas pela Universidade de Wiscosin (Estados Unidos), também datam dos anos 50 (RÉ, 2003). Os estudos desta técnica permitiram a ampliação de seu uso para a indústria de alimentos, farmacêutica, aromas e sabores, tintas, química, agrícola, dentre outras, visto que as micropartículas possuem uma ampla gama de finalidades de aplicação (FANGER, 1974; POTHAKAMURY & BARBOSA-CÁNOVAS, 1995; RÉ, 1998; WIELAND-BERGHAUSEN et al., 2002).

Em geral, a microencapsulação possui o objetivo de proteger um determinado ativo para isolá-lo de componentes incompatíveis, aumentar a estabilidade do produto, converter líquidos em sólidos, mascarar propriedades indesejáveis do material encapsulado e permitir a liberação controlada das substâncias encapsuladas (GODWIN & SOMERVILLE, 1974; SHAHIDI & HAN, 1993; RÉ, 1998).

A possibilidade de controle na taxa de liberação do material de recheio das cápsulas está relacionada com características da parede formada, como: estrutura química, espessura, tamanho, porosidade e solubilidade, além de

variáveis como coeficiente de difusão, variação na concentração de saturação do material de recheio e sua distribuição na partícula (FANGER, 1974; HEGER, 2001).

A liberação do material encapsulado segue uma série de etapas: absorção de solvente pela cápsula, dissolução ou erosão da parede, dissolução do recheio, permeação do recheio pela parede, difusão do recheio no solvente (HEGER, 2001).

Na indústria de alimentos, é usual a incorporação de ingredientes e aditivos naturais aos produtos. A microencapsulação vem sendo aplicada com sucesso neste ramo tecnológico como forma de proteção de substâncias sensíveis à temperatura, oxidação, umidade, reações indesejáveis, como acidulantes, flavorizantes, corantes, enzimas, microrganismos, sais minerais, lipídeos, vitaminas, aminoácidos (BAKAN, 1973; JACKSON & LEE, 1991; KAREL, 1990). Desta maneira, é possível proteger estes ingredientes contra perdas nutricionais, preservar ou mascarar cor e sabores, além de promover a liberação controlada de certos componentes (RÉ, 2003).

No setor agropecuário, a microencapsulação pode ser utilizada para reduzir a contaminação ambiental e toxicidade por contato de pesticidas químicos, ou para prolongarem a atividade biológica de biopesticidas até que sejam ingeridos pela praga-destino (MARSHALL et al., 1999). Na agricultura, os insumos também podem ser encapsulados para serem liberados controladamente, pois alguns fertilizantes prejudicam o vegetal quando se encontram em altas concentrações no solo. A microencapsulação de micronutrientes também serve para protegê-los da degradação durante a produção, manuseio e reação com outros componentes da formulação.

Na área de inseminação artificial, o sêmen dos animais pode ser protegido e liberado aos poucos com a utilização desta técnica (NEBEL & SAACKE, 1994; TORRE et al., 2002; WATSON, 1993).

Além disso, a microencapsulação é empregada na fabricação de dietas inertes para peixes capazes de substituírem o alimento vivo (PEDROZA-ISLAS, 2000).

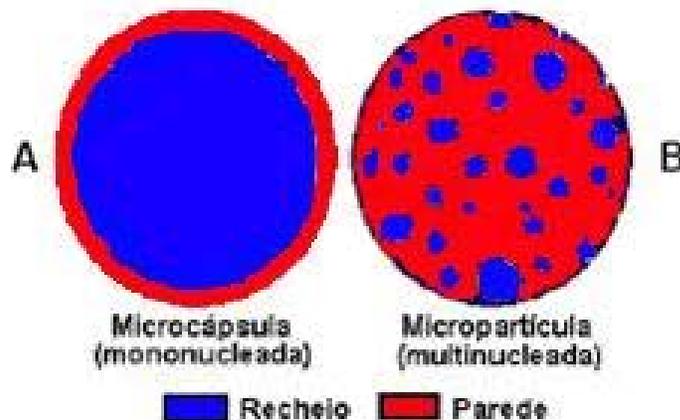
Na área farmacêutica, a microencapsulação é bastante empregada e possui diversas funções, como: melhora da performance do produto por mascarar odor e sabor de medicamentos, aumento da resistência de materiais frágeis às condições de processamento e empacotamento, prevenção de reações indesejáveis com outros componentes do medicamento quando este é armazenado por um período prolongado, e liberação gradual e direcionada a órgãos alvos (BRAZEL, 1999; POPPLEWELL et al., 1995).

As microcápsulas podem ser obtidas através de métodos físico-químicos (coacervação simples ou complexa, separação por fase orgânica, envolvimento lipossômico), químicos (polimerização interfacial, inclusão molecular), ou métodos físicos (*spray drying*, *spray coating*, *spray chilling*, leito fluidizado, extrusão, centrifugação com múltiplos orifícios, co-cristalização, liofilização) (JACKSON & LEE, 1991). O método é selecionado de acordo com as propriedades do ativo e do tipo de partícula desejada, e com a finalidade e circunstâncias envolvidas na obtenção do produto (DHOOT, 2006).

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

A classificação das partículas é feita de acordo com parâmetros morfológicos de tamanho e distribuição do ativo. São denominadas micro, as partículas com tamanho entre 1 a 100  $\mu\text{m}$  (THIES, 1995). As partículas podem assumir diferentes formas como uma simples membrana de cobertura, uma membrana esférica ou de forma irregular, estrutura de multiparedes de mesma ou várias composições ou numerosos núcleos em uma mesma estrutura (GIBBS et al., 1999). Além disso, de acordo com a distribuição do recheio, podem ser classificadas em microesferas ou micropartículas, quando o recheio se distribui ao longo de uma matriz formando uma partícula multinucleada, e podem também ser do tipo “reservatório”, nas quais há uma partícula mononucleada com uma quantidade de recheio envolvida por uma película de parede, sendo denominadas

de microcápsulas (Figura 1). O tipo de partícula produzida influi na quantidade de recheio carregado e no comportamento de liberação do mesmo (GIBBS et al., 1999; THIES, 1995).



**Figura 1:** Tipos de estruturas obtidas nos processos de microencapsulação. A: Mononucleada (microcápsula); B: Multinucleada (micropartícula ou microesfera). Adaptado de ALVIM (2005).

### 3.4.1 Microencapsulação por Coacervação Complexa

A coacervação é um fenômeno de separação espontânea de fases que ocorre quando polieletrólitos são misturados em um meio aquoso. Este termo é oriundo do latim “co” e “acervus” significando união e agregação de partículas (VANDERGAER, 1974; TOLSTOGUZOV, 1997; THIES, 1995; MENDER et al., 2000; DUCEL et al, 2004; STRAUSS & GIBSON, 2004).

Existem duas condições necessárias para a ocorrência da coacervação: uma é que os biopolímeros estejam juntos em solução e a outra é que as cargas opostas entre as cadeias de biopolímeros estejam em quantidades estequiométricas iguais.

As interações resultantes da mistura de soluções poliméricas podem ser de dois tipos: segregativas, nas quais ocorre repulsão entre as cadeias de

biopolímeros (incompatibilidade), ou associativas, caracterizadas pela atração entre os polímeros (complexação) (TOLSTOGUZOV, 1997; SCHMITT et al., 1998; KRUIF & TUINIER, 2001; KRUIF et al., 2004).

A complexação resulta da aproximação de regiões das cadeias poliméricas contendo cargas opostas e pode ocorrer através de dois tipos de interações eletrostáticas, dependendo do balanço entre cargas positivas e negativas disponíveis. Quando as cargas positivas e negativas não são iguais em número, é possível formar complexos solúveis pela interação das cargas remanescentes com a água. Quando as cargas opostas se apresentam nas mesmas quantidades entre as cadeias poliméricas, o complexo formado tem carga resultante próxima à neutralidade, tornando-se insolúvel (TOLSTOGUZOV, 1997; SCHMITT et al., 1998; KRUIFF & TUINIER, 2001).

A mistura de soluções de substâncias com cargas opostas forma complexos, que por repulsão do solvente precipitam, produzindo duas fases sendo uma delas chamada de “rica em polímeros” contendo o coacervado precipitado e outra chamada “pobre em polímeros” na qual permanece o solvente da solução (BACHTSI & KIPARISSIDES, 1996; STOTT et al., 1996; REMUNAN-LOPEZ & BODMEIER, 1996; TOLSTOGUZOV, 1997; SCHMITT et al., 1998; WANG et al., 1999; WANG et al., 2000; HASHIDZUME et al., 2002; DICKINSON, 2003; STRAUSS & GIBSON, 2004).

Os biopolímeros ideais para coacervação são aqueles com propriedades coloidais hidrofílicas, que apresentam solubilidade em meio aquoso, densidades de cargas adequadas e cadeias lineares. Entre eles podem ser citados a gelatina, alginatos, albuminas, caseína, ágar, gomas, pectinas, etc (VANDERGAER, 1974; THIES, 1995).

Existem dois tipos de coacervação: a simples e a complexa. Na coacervação simples há um único polímero, e através da ação de um outro composto (sais ou álcoois), que competem com o polímero pela água, o solvente que envolve as moléculas do colóide é removido e as moléculas do polieletrólito se aproximam formando aglomerados (VANDERGAER, 1974; BACHTSI &

KIPARISSIDES, 1996; SCHMITT et al., 1998; WANG et al., 1999; WANG et al., 2000; HASHIDZUME et al., 2002; VASILIU et al., 2005).

A coacervação complexa envolve a solubilização de dois polímeros conjuntamente e a expulsão do solvente ocorre em função de atrações e neutralizações das cargas das matrizes formadas pelas cadeias agregadas dos dois polímeros. Essa atração ocorre quando os polímeros apresentam cargas totais opostas (REMUNAN-LOPEZ & BODMEIER, 1996; THIES, 1995, SCHMITT et al., 1998; KRUIF et al., 2004).

A estequiometria, o pH e a força iônica são alguns dos fatores que exercem forte influência na obtenção dos coacervados complexos por interferirem no perfil de cargas das macromoléculas. Além disso, condições físicas como temperatura, tipo/tempo de agitação e pressão podem influenciar a formação e estabilidade dos coacervados produzidos (SCHMITT et al., 1999; TURGEON et al., 2003).

A estequiometria de um complexo eletrostático depende da conformação e da carga global dos reagentes. Quando há um excesso de um dos polímeros ocorre uma quantidade de cargas excedentes no sistema que pode prejudicar a formação do coacervado (SCHMITT et al., 1998). Com relação à conformação, as proteínas globulares e cadeias de polissacarídeos aniônicos rígidos não conseguem contato entre todos seus grupos carregados. Ao contrário, estruturas de proteínas desdobradas tendem a formar o máximo de contato com um polissacarídeo com carga oposta (TOLSTOGUZOV, 2003).

O pH influencia o grau de ionização dos grupos residuais das proteínas, os grupos amino e os carboxílicos (SING & BURGESS, 1989; BURGESS, 1990), desse modo, trabalha-se com esta variável para adequar-se à situação de máxima concentração de cargas opostas, já que os complexos normalmente se formam pelas interações eletrostáticas entre macromoléculas carregadas com cargas opostas (GALAZKA et al., 1999).

A presença do sal pode suprimir a coacervação em vários graus dependendo da natureza e concentração do mesmo no sistema (SCHMITT et al., 1998; BURGESS & CARLESS, 1984). O aumento de temperatura juntamente com

o conteúdo total de polímeros possui um efeito sinérgico na separação de fases por favorecer as interações hidrofóbicas e covalentes enquanto sua redução (baixas temperaturas) favorece a formação de pontes de hidrogênio (STAINSBY, 1980). A aplicação de uma pressão hidrostática facilita a formação dos complexos, já que as proteínas desnaturam parcialmente, o que permite a exposição de grupos reativos, inicialmente ocultos na molécula (DICKINSON & PAWLOWSKI, 1997). No caso de altas pressões dinâmicas, elas reduzem o tamanho dos complexos por ação das forças de turbulência, cavitação e cisalhamento (LE HÉNAFF, 1996). A duração do cisalhamento também influencia o tamanho dos complexos. Quanto maior a duração, mais possibilidades de colisões, o que conduz à formação de maiores quantidades de complexos grandes (SCHMITT et al., 1998).

Existem diversas aplicações tecnológicas que vem sendo desenvolvidas baseadas no conceito da coacervação e entre estas, a microencapsulação. A eficiência da microencapsulação por coacervação está associada às características dos polímeros envolvidos, do complexo formado e do recheio a ser encapsulado. Os compostos líquidos ou particulados de caráter hidrofóbico ou partículas sólidas de baixa solubilidade são facilmente encapsulados por esse processo (SCHMITT et al., 1998; KRUIFF et al., 2004).

A produção de micropartículas coacervadas é pouco aplicável no caso da encapsulação de compostos hidrossolúveis, pois estes ficam dissolvidos na solução polimérica não criando condições para a adsorção dos polímeros. Sendo assim o recheio fica fracamente retido na matriz sendo rapidamente liberado da cápsula (SCHMITT et al., 1998). Compostos hidrofílicos como açúcares, proteínas, aminoácidos, peptídeos, vitaminas, sais minerais, etc, podem ser encapsulados através do uso de emulsões simples ou múltiplas e de partículas hidrofóbicas sólidas (VILLAMAR & LANGDON, 1993; LANGDON & BUCHAL, 1998; JENNING et al., 2000; ONAL & LANGDON, 2004 a e b; ONAL & LANDON, 2005).

A interação entre gelatina e goma arábica é um exemplo clássico de coacervação complexa para a produção de micropartículas. De um modo geral, o processo baseia-se na formação de uma emulsão (líquidos) ou dispersão (sólidos)

do recheio na solução da mistura polimérica. O complexo se deposita ao redor do recheio devido às alterações das condições do meio, formando uma estrutura capaz de reter, proteger e liberar de forma controlada o material ativo (ALVIM, 2005).

O primeiro passo no processo de microencapsulação deve ser a produção das soluções de gelatina e de goma arábica a uma temperatura de aproximadamente 50°C. A água utilizada deve ser deionizada ou destilada para que não haja interferência no processo. O agente (usualmente hidrofóbico) é emulsificado com a solução de gelatina a 50°C e depois misturado à solução de goma arábica à mesma temperatura. Em seguida é acrescentada uma quantidade conhecida de água destilada ou deionizada ao sistema e realizado o ajuste de pH para que se forme o coacervado. Finalmente o sistema deve ser submetido a um resfriamento lento sob agitação branda até que atinja uma temperatura em torno de 10°C. É importante que esta etapa de resfriamento seja realizada lentamente a fim de que os coacervados se depositem ao redor do material de recheio, formando as microcápsulas. Se o sistema for resfriado muito rapidamente, uma grande quantidade de coacervados de gelatina-goma arábica não irão se depositar em volta do material de recheio, ou seja, permanecerão como coacervados com pouco ou nenhum ativo. Este tipo de coacervado é indesejável, uma vez que estará havendo uma perda de material disponível para o encapsulamento.

Existem diferentes comportamentos para as micropartículas coacervadas. Se o recheio possuir menor densidade que da água e não houver nenhum coacervado sem recheio, todas as micropartículas permanecerão na superfície do sistema. Porém, se existirem coacervados livres, somente estes irão precipitar. Por outro lado, quando o recheio apresentar maior densidade que da água, tanto as micropartículas quanto os coacervados livres irão precipitar e, desta forma, não será possível separá-los pela diferença de densidade (THIES, 1995).

As micropartículas coacervadas podem ser submetidas à secagem para que se estenda o tempo de estocagem das mesmas e para que seja possível utilizá-las também para produtos desidratados. Os métodos de secagem em

estufa, liofilização, remoção da água por solventes e secagem em condições ambientais produzem micropartículas coacervadas desidratadas. Porém, a maioria desses métodos não permite a obtenção de partículas individuais interferindo no tamanho do produto final e também em propriedades de liberação do recheio (THIES, 1995; BURGESS & PONSART, 1998). Já o uso de *spray dryer* pode produzir partículas individuais, mas a baixa resistência física da parede acaba por restringir a aplicação desse processo de secagem. Nesse caso, podem ser utilizados métodos físicos, químicos ou enzimáticos a fim de se alterar as propriedades de rigidez, resistência e permeabilidade da parede (BURGESS & PONSART, 1998).

#### *3.4.1.1 Materiais de parede das micropartículas*

Os materiais de parede são usados para o recobrimento do recheio das cápsulas e permitem a liberação da substância de interesse conforme o desejado. A seleção do material de parede se relaciona com as características físico-químicas do recheio, com o processo empregado para a produção das microcápsulas e com a aplicação final destas (JACKSON & LEE, 1991; NORI, 1996). É fundamental que o material de parede não reaja com o recheio, e nem seja solúvel neste, sendo que normalmente eles apresentam polaridades opostas (BAKAN, 1973; FANGER, 1974; JACKSON & LEE, 1991; CARDOSO, 2000).

O material de parede deve apresentar algumas características, tais como: boa propriedade emulsificante e de formação de filme, baixa viscosidade e higroscopicidade, boas propriedades de secagem, estabilidade, ausência de sabores desagradáveis, e adequada proteção ao recheio (RÉ, 1998; CARDOSO, 2000).

Existem ocasiões em que se deseja a presença de certas características especiais de solubilidade, permeabilidade, rigidez, dentre outras, o que pode exigir alterações dos polímeros de parede pelo uso de plasticizantes, reticulantes, enzimas, modificadores químicos, tratamentos na superfície e múltiplas coberturas

(JACKSON & LEE, 1991; RÉ 1998; LAMPRECHT et al., 2000; LAMPRECHT et al., 2001; LEE & ROSENBERG, 2000; KRUIF et al., 2004).

O objetivo de se obter uma liberação controlada do recheio faz com que a manutenção da integridade da parede seja extremamente relevante, o que exige, em muitos casos, que o material utilizado não se solubilize ou se apresente apenas parcialmente solúvel. Muitas proteínas oferecem uma boa opção de material de cobertura em função de suas propriedades físico-químicas e funcionais (LEE & ROSENBERG, 2000).

A composição dos encapsulantes depende do tipo de aplicação a que se destinam e podem variar de comestíveis a polímeros biodegradáveis ou sintéticos (ARSHADY, 1993; SINKO & KHON, 1993). Alguns polímeros sintéticos muitas vezes têm seu uso proibido ou limitado devido a alguma toxicidade (POTHAKAMURY & BARBOSA-CÁNOVAS, 1995). Os componentes naturais apresentam a vantagem de serem considerados inócuos, o que facilita sua utilização em alimentos, além do fato de muitos contribuírem para o aumento do valor nutritivo do alimento (POTHAKAMURY & BARBOSA-CÁNOVAS, 1995).

Os materiais mais utilizados como encapsulantes incluem: carboidratos (amidos, dextrinas, xarope de milho, sacarose), celuloses (carboximetilcelulose, etil, metil, acetil e nitro-celulose), lipídios (cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, mono e diglicerídeos, óleos e gorduras hidrogenadas), proteínas (glúten, caseína, isolado protéico de soro de leite, gelatina e albumina e algumas fontes alternativas como a quitosana) e gomas (goma arábica, ágar, alginato de sódio, carragena) (SHAHIDI & HAN, 1993).

### *Gomas*

O termo goma é mais comumente utilizado para referir-se a polissacarídeos ou seus derivados, obtidos a partir de plantas (exsudados, sementes, algas) ou por processamento biológico (WHISTLER & DANIEL, 1985).

A goma arábica, também conhecida por goma indiana ou goma acácia, é exsudada de árvores como resposta a algum dano à planta. Quando é extraída a

partir da espécie *Acacia senegal*, obtém-se uma goma constituída por uma mistura complexa de sais (cálcio, magnésio e potássio) do ácido arábico, que por apresentar boas propriedades emulsificantes e estabilizantes, vem sendo bastante empregada como material de parede para microcápsulas exercendo ação protetora contra oxidação de voláteis (RODRIGUES-HUEVO et al., 2004; BUFFO et al., 2001).

A goma arábica possui duas frações com estruturas químicas diferentes. A primeira fração é a principal, que representa 70% da goma e é composta por cadeias de polissacarídeos com pouco ou nenhum material nitrogenado. A segunda fração, que parece ser a principal responsável pelas propriedades emulsificantes e estabilizantes especiais do hidrocolóide, é formada por aproximadamente 2% de proteína ligada covalentemente ao carboidrato (RANDALL, PHILLIPS & WILLIAMS, 1989; OSMAN et al., 1993; BEMILLER & WHISTLER, 1996). A goma é negativamente carregada acima de pH 2,2 e a baixos pHs (< 2,2) a dissociação dos grupos carboxila é suprimida.

#### 3.4.1.2 Recheio das micropartículas

##### *Oleoresina de páprica*

A páprica é uma especiaria extraída de frutos secos da espécie *Capsicum annum L* (pimentão) (BORGES, PINO & FERNÁNDEZ, 1997).

A oleoresina de páprica é um dos corantes naturais mais utilizados na indústria de alimentos, especialmente no setor de embutidos (GONZÁLEZ et al., 1997). Possui cor vermelha forte que se deve ao elevado conteúdo de carotenóides presentes, podendo variar entre vermelho e amarelo característico dessa classe de componentes, que além de cor e sabor, ainda apresentam propriedades antioxidantes (OSUNA-GARCIA, WALE & WADDELL, 1997). Os principais carotenóides contidos na páprica são a capsaxantina e a capsorubina (HORNERO-MÉDEZ & MÍNGUEZ-MOSQUERA, 2001).

## Óleo de salmão

Os óleos de peixes são as mais importantes fontes de ácidos graxos polinsaturados omega-3 (PUFA), eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA).

Alguns órgãos como *The American Heart Association* (AHA), *Food and Drug Administration* (FDA) e outros apontam para a importância de se consumir os ácidos graxos presentes nos óleos de peixes para a prevenção de doenças cardíacas e cardiovasculares.

Diversos tipos de óleos de peixes já foram utilizados para várias finalidades, como: tratamento de doenças de animais, fornecimento de suplementação energética em dietas de humanos, etc (HJALTASON, 1989; HJALTASON & HARALDSSON, 2001).

Apesar dos óleos de peixe possuírem antioxidantes naturais como a vitamina E e o corante astaxantina, ao longo de seu processamento há uma perda destes compostos. Desta forma, os antioxidantes (naturais ou sintéticos) devem ser adicionados aos óleos de peixe destinados ao consumo humano a fim de se evitar a oxidação e para manter o odor e sabor adequado. Outra maneira de se proteger o óleo contra a oxidação pode ser pelo impedimento do acesso do oxigênio ao mesmo através da técnica de microencapsulação, porém necessita-se de mais estudos a respeito para que seja possível utilizar óleo de peixe microencapsulado em produtos que permanecerão estocados por um tempo mais longo. Atualmente, o óleo de peixe microencapsulado tem sido empregado em produtos que são consumidos rapidamente, como pães, iogurtes, leites, etc (SCHULER, 1990; NEWTON, 1996; SHELKE, 2005).

A maioria dos óleos de peixes produzidos pode ser considerada subproduto da indústria de peixes e sua produção é de apenas 1 a 2% da produção mundial de óleos e gorduras, tendo Chile e Peru como os principais produtores.

Em 1990, em torno de 76% do óleo de peixe produzido era utilizado como matéria-prima na fabricação de margarina após a hidrogenação parcial. No

entanto, a descoberta das conseqüências negativas do consumo de ácidos graxos *trans* provocou uma queda brusca nesta aplicação do óleo. Contudo, este fator não afetou a sua produção, já que, ao mesmo tempo, a indústria de aqüicultura aumentou sua demanda por este produto para utilizá-lo como ingrediente na alimentação de peixes.

O óleo de salmão de cultivo tem se tornado disponível devido ao crescimento da produção de salmão. Há interesse na descoberta de aplicações deste óleo na indústria de alimentos. A Noruega está liderando as pesquisas, mas por enquanto tem sido utilizado principalmente na indústria de alimentos para pequenos animais (HAUMANN, 1998; HENDERSON, 1999; HJALTASON & HARALDSSON, 2004).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material**

Gelatina extraída da pele de Tilápia (*Oreochromis niloticus*), goma arábica (CNI-Rouen, France, ref. IRX49345), e gelatina suína Gelita South America 240P/6 do tipo A, foram usadas como polímeros formadores de parede. Óleo de soja comercial Sadia tipo 1 LCG0507, óleo de salmão (desodorizado, contendo antioxidante, de uso comestível, e fornecido por DDK Comércio Importação e Exportação Ltda.), e oleoresina de páprica Citromax foram usados como materiais ativos encapsulados, e reagentes de grau analítico para a realização das análises químicas.

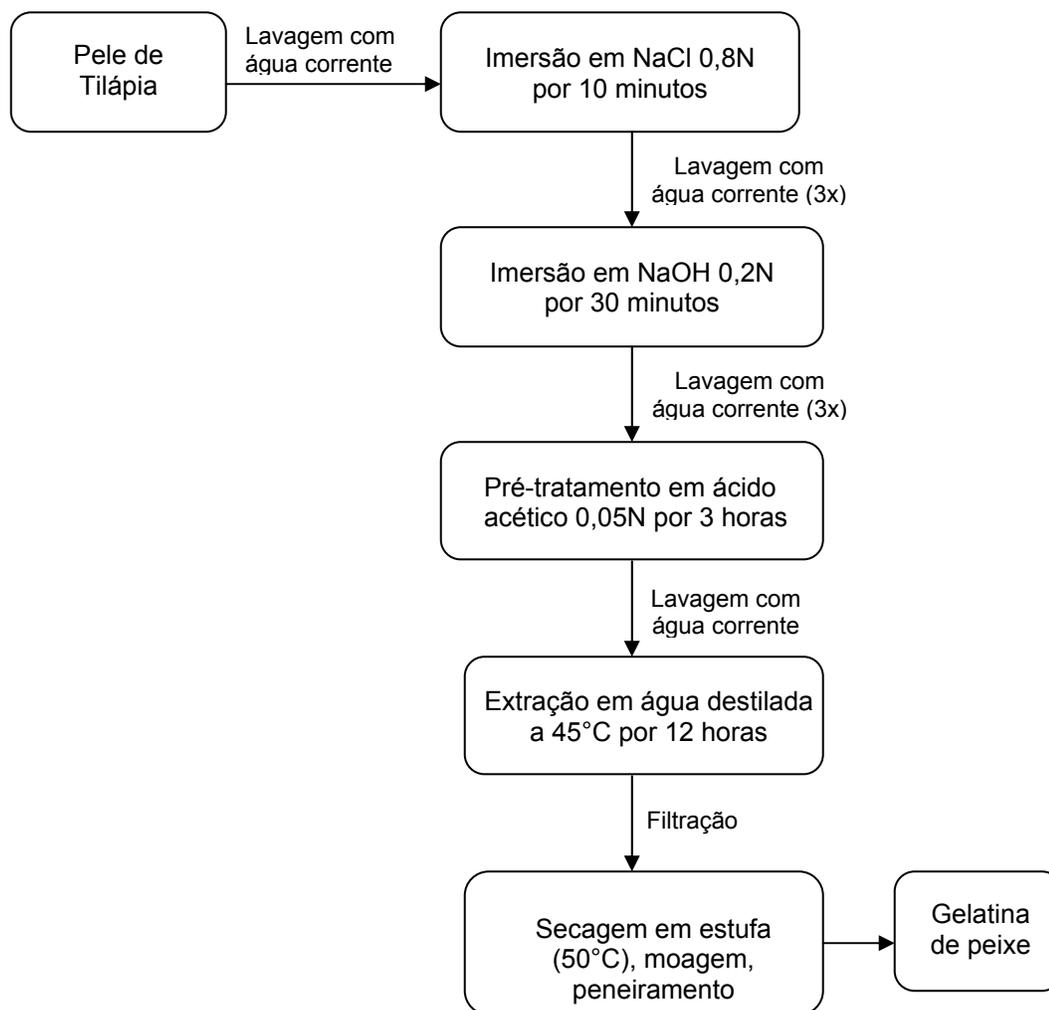
### **4.2 Equipamentos**

Placas de agitação magnética com e sem aquecimento das marcas Fisatom, Tecnal TE 0-85 e 0-89 e IKA RH digital KT/C, chapa de aquecimento Tecnal TE-018, pHmetro Digimed mod. MD20, balança analítica Ohaus mod. AS200 U.S.A, balança semi-analítica Marte mod. AS200C, Ultraturrax mod. T18, marca IKA, liquidificador, homogeneizador de sangue Phoenix AP22, agitador vibratório para tubos Super-Mixer Cole Palmer mod. 4722, estufas com circulação de ar Tecnal e Marconi, estufa B.O.D. Tecnal TE-390, liofilizador Edwards Pirani 501, espectrofotômetro Beckman DU70, centrífuga IECHN-S, centrífuga Sorvall RC5C, banho-maria das marcas Marconi e Tecnal, banho ultratermostatizado Marconi, Cutter Sire, tachos abertos encamisados das marcas ICMA e Tanbrás, microscópio ótico Zeiss e Nikon Eclipse E800 Tokyo, Japan, microscópio eletrônico de varredura Jeol mod. JMS – T300, evaporador Balzer mod. SCD50, mufla COEL, destilador de nitrogênio Tecnal TE-036/1, bloco digestor Tecnal, multiprocessador Geiger, e vidrarias de laboratório.

## **4.3 Métodos**

### **4.3.1 Extração de gelatina de pele de tilápia**

A extração da gelatina de pele de tilápia seguiu a metodologia descrita por MONTERO & GÓMEZ-GUILLÉN (2000) com algumas adaptações e está esquematizada na Figura 2. As peles foram conservadas em freezer (em torno de  $-18^{\circ}\text{C}$ ) por aproximadamente duas semanas. Previamente ao procedimento de extração da gelatina, foi feita uma lavagem das peles com água corrente em abundância. Em seguida, a limpeza da matéria-prima foi feita deixando-se as peles em imersão em uma solução de 0,8N NaCl (1:6 p/v) por 10 minutos com posterior enxágüe. Este passo foi repetido três vezes e o excesso de água foi removido. As peles, previamente lavadas, foram mantidas em imersão com 0,2N de hidróxido de sódio por 30 minutos e enxaguadas em seguida. Este passo também foi repetido por três vezes. Posteriormente, as peles foram imersas em 0,05N de ácido acético (1:10 peso/volume) à temperatura ambiente por três horas, enxaguadas com água corrente e depois permaneceram sob agitação lenta em água destilada, em tacho aberto encamisado por 12 horas a  $50^{\circ}\text{C}$ . Em seguida a mistura foi filtrada em algodão, distribuída em bandejas plásticas, e seca em estufa com circulação forçada de ar a  $50^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, as folhas de gelatina foram moídas em multiprocessador, peneiradas (Mesh 0,59mm) e armazenadas em freezer. Foram produzidos dois lotes independentes.



**Figura 2:** Fluxograma da extração de gelatina de pele de tilápia.

#### 4.3.2 Caracterização de gelatina de pele de tilápia

Para todos os ensaios de caracterização foi utilizada uma gelatina comercial suína tipo A como padrão de referência.

#### 4.3.2.1 *Rendimento de extração*

A produção de gelatina foi calculada baseando-se no peso úmido da pele de tilápia conforme a seguinte fórmula (BINSI et al., 2007):

$$\text{produção de gelatina (\%)} = \frac{\text{peso da gelatina em pó (g)} \times 100}{\text{peso úmido da pele fresca (g)}}$$

#### 4.3.2.2 *Composição centesimal*

##### 4.3.2.2.1 *Umidade*

A umidade da gelatina foi determinada por secagem em estufa a 105°C por 16 horas, segundo metodologia da A.O.A.C. (1998). O resultado baseia-se na perda de massa ocorrida durante a secagem.

##### 4.3.2.2.2 *Proteína*

O percentual de proteína contido na gelatina, após secagem do material em estufa por 16 horas a 105°C, foi determinado através do método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1998). O fator de correção utilizado foi de 5,55 tanto para a gelatina suína comercial quanto para a gelatina de peixe.

##### 4.3.2.2.3 *Gordura*

A determinação do percentual de lipídeos apolares contido na gelatina a partir da amostra seca foi feita através do método de Soxhlet descrito por GURR (1984).

#### 4.3.2.2.4 Cinzas

O conteúdo de cinzas das amostras de gelatina, previamente secas, foi determinado seguindo-se a metodologia descrita por LEES (1979).

#### 4.3.2.3 Distribuição de massa molar

A distribuição de massa molar foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acordo com a metodologia descrita por LAEMMLI (1970). A eletroforese foi realizada em sistema Miniprotean II (Bio-Rad Laboratories Ltda., Cód.: 165-2940) com gel de 0,75 mm de espessura. Foram utilizados géis de empilhamento de 4% e de separação de 6%. As amostras foram dispersas em tampão redutor (Tris-HCl 0,5M; pH 6,8; SDS 10%; glicerol 10%;  $\beta$ -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,1%) e aquecidas a 95°C por cinco minutos. Nas canaletas do gel foram aplicados 10 $\mu$ l de amostra. A corrida foi realizada a 70V, à temperatura ambiente (23  $\pm$  2°C) durante duas horas. As bandas de proteína foram coradas segundo o Manual de Instruções do fabricante (Mini-Protean II: Dual Slab Cell, Instructor Manual, Biorad Laboratories, Richmond, USA). Foi preparada uma solução de Coomassie R-250 (0,1%) em 40% de metanol e 10% de ácido acético para corar os géis e uma solução contendo metanol (40%) e ácido acético (10%) para descorar os géis. A massa molar das bandas foi determinada através do kit padrão de baixa massa molar (Amershan Pharmacia Biotech Ltda., Cód. 17-0446-01).

#### 4.3.2.4 Determinação do ponto de fusão

A medida do ponto de fusão foi realizada baseando-se no método apresentado por CHOI & REGENSTEIN (2000). Soluções de gelatina a 6,67% (p/p) foram preparadas e uma alíquota de 5ml foi transferida para pequenos tubos de vidro. Os tubos foram cobertos com parafilme e aquecidos em banho-maria a

60°C por 15 minutos para serem, posteriormente, resfriados em banho de gelo e maturados a 10°C por 16 a 18 horas. Depois foram adicionadas cinco gotas de uma mistura de 75% de clorofórmio e 25% do corante azul de metileno sobre o gel. O gel foi colocado em banho ultratermostatizado a 10°C e aquecido a 0,5°C por minuto até atingir a temperatura de 30°C. A temperatura do banho foi lida através de termômetro e o ponto de fusão foi determinado no momento em que as gotas coradas começaram a se mover para o interior do gel.

#### 4.3.2.5 Força de gel (*Bloom*) e Análise do perfil de textura (TPA)

O método *Bloom* utilizado foi baseado na descrição de CHOI & REGENSTEIN (2000). Foram preparadas soluções de gelatina a 6,67% (p/p) com água destilada, mantidas em temperatura ambiente por 2 horas e posteriormente em banho-maria a 60°C por 1 hora. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente por 30 minutos para serem distribuídas na quantidade de 30 ml em copos plásticos sendo feita a medida de pH das soluções. Em seguida os copos foram cobertos com papel alumínio e armazenados em estufa B.O.D. para maturação a 10°C por 18 horas. Depois deste período de maturação, com a finalidade de se determinar a força de gel, as amostras foram transferidas para o Texturômetro TAXT2 (SMS, Surrey, UK) utilizando-se probe modelo P 0.5 com os ajustes de 0.5 mm/segundo de velocidade de penetração e distância de penetração de 4mm a partir da superfície. O programa Texture Expert, Versão 1.22 foi utilizado para controle do instrumento e obtenção das medidas.

Para a análise do perfil de textura (TPA), foi utilizada a mesma metodologia de preparação das amostras. Foram alteradas apenas as condições ajustadas no Texturômetro, sendo adotados os valores de 2mm/segundo de velocidade de penetração e distância de penetração de 60% da altura total da amostra.

### **4.3.3 Elaboração de Micropartículas por Coacervação Complexa**

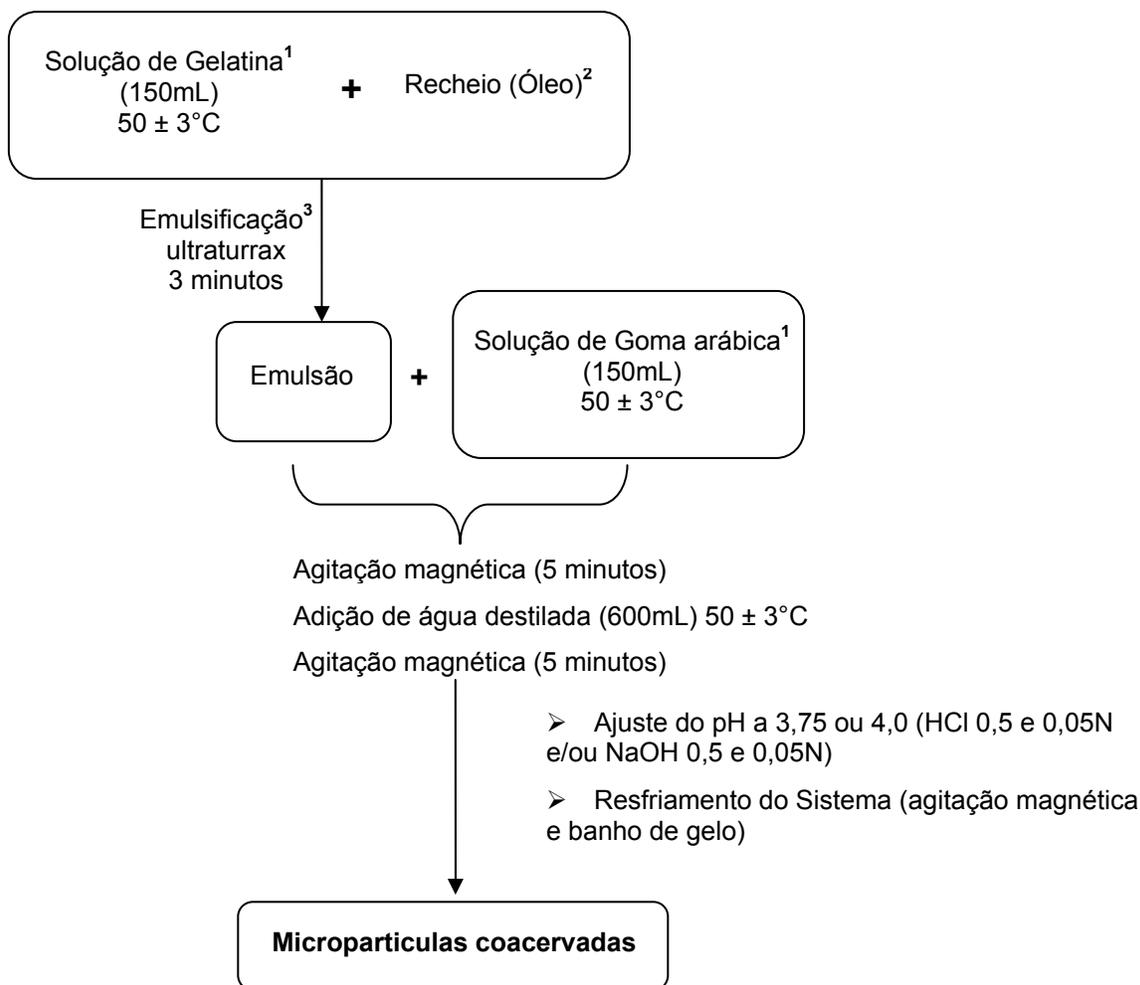
#### *4.3.3.1 Determinação do pH de coacervação por Turbidimetria*

A faixa de pH de coacervação do sistema polimérico formado por goma arábica e gelatina de peixe e goma arábica e gelatina suína, ambos na proporção fixa de 1:1 e em diferentes concentrações de parede (2,5, 5,0 e 7,5%) foi estimada em função da turbidez medida pela absorbância. O sistema foi mantido em Becker sob agitação magnética à temperatura de  $45 \pm 5^\circ\text{C}$ . O eletrodo para medida de pH foi introduzido e após alguns minutos de agitação foram feitos os ajustes de pH através do uso de soluções de NaOH 0,05N e HCl 2,5N e 0,05N para o ajuste fino. A faixa de variação de pH foi de 3 até 6 com intervalos de 0,25 entre eles e, imediatamente após os ajustes feitos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 292 nm e 590 nm dependendo das concentrações de polímeros. O ensaio foi realizado de acordo com ANTONOV & ZUBOVA (2001), com algumas modificações. Este método permitiu avaliar a intensidade de interação entre os biopolímeros, através das curvas de titulação e da medida da turbidez dos sistemas. Assim sendo, após a determinação da melhor faixa de pH de coacervação, os coacervados produzidos no planejamento experimental já tiveram seus pHs ajustados de acordo com os valores encontrados. Para 2,5% de concentração de parede foi utilizado o pH final de 4,0 e para 5,0 e 7,5% de parede foi adotado o pH final de 3,75.

#### *4.3.3.2 Produção de Micropartículas no Planejamento Experimental*

Para a obtenção das micropartículas coacervadas produzidas no planejamento experimental foram utilizados como materiais de parede soluções de gelatina de peixe do 2º lote e goma arábica (nas concentrações de 2,5%, 5,0% e 7,5%). Para a formação do recheio, foi utilizada uma mistura de oleoresina de páprica com óleo de soja na proporção de 1:20 (p/p), nas concentrações de 25, 50

e 100% em relação ao peso total de polímeros de parede do sistema em base seca. A produção das micropartículas foi adaptada dos procedimentos descritos por THIES (1995) e LAMPRECHT et al. (2000) e está detalhada no fluxograma da Figura 3. Deste modo, a solução de gelatina a  $50 \pm 3$  °C foi misturada ao material lipídico (recheio) e homogeneizada em Ultraturrax durante 3 minutos (a 6000, 10000 e 14000 rpm de velocidade). Posteriormente, a emulsão foi adicionada à solução de goma arábica a  $50 \pm 3$  °C, agitadas por 5 minutos em agitador magnético e, em seguida, foi adicionada também água destilada à mesma temperatura, mantendo-se novamente sob agitação lenta por aproximadamente 5 minutos. O pH foi ajustado de acordo com os valores encontrados nas curvas turbidimétricas realizadas previamente ao planejamento experimental, ou seja, 3,75 ou  $4,0 \pm 0,02$  dependendo da concentração de polímeros de parede, utilizando-se soluções de HCl 2,5 e 0,5 N e/ou NaOH a 0,5 e 0,05N. Finalmente, foi feito o resfriamento das soluções contendo as micropartículas colocando-se as mesmas em banho de gelo, mantidas sob agitação magnética lenta e constante, até que a temperatura atingisse aproximadamente 10°C. Após as partículas decantarem o sistema foi mantido em geladeira.



**Figura 3:** Fluxograma de elaboração de micropartículas por coacervação complexa.

Os números sobrescritos indicam os pontos estudados no planejamento experimental:

1- Solução de gelatina de peixe do 2º lote e de goma arábica nas concentrações de 2,5, 5,0 ou 7,5%;  
2- Oleoresina de páprica : óleo de soja (1:20 p/p) nas concentrações de 50, 100 ou 150% de óleo em relação ao peso total dos polímeros de parede em base seca; 3- Velocidade de agitação de 6 mil, 10 mil ou 14 mil rpm.

#### 4.3.3.3 Planejamento Experimental

As micropartículas coacervadas foram elaboradas de acordo com o fluxograma descrito na Figura 3 e suas condições de produção foram definidas

através de um planejamento experimental fatorial  $2^3$  com três pontos centrais. As variáveis e respectivos níveis utilizados estão especificados na Tabela 2. Previamente, o pH de coacervação para cada relação estequiométrica goma arábica : gelatina de peixe do segundo lote, foi estimado pela determinação da turbidez, e a eficiência de encapsulação (%EE) foi considerada como resposta para a avaliação do planejamento.

**Tabela 2:** Variáveis e respectivos níveis usados no planejamento experimental.

Variável	-1	0	+1
Concentração de polímero (proporção de gelatina de peixe do 2º lote e goma arábica 1:1)	2,5	5,0	7,5
Concentração de recheio* (em relação à massa total de polímero em base seca)	50	100	150
Velocidade de homogeneização da solução de gelatina-recheio (em Ultraturrax por 3 minutos)	6000 rpm	10000 rpm	14000 rpm

\* No planejamento experimental foi utilizado como recheio das micropartículas uma mistura de oleoresina de páprica: óleo de soja na proporção de 1:20 (p/p). Para a concentração de parede de 2,5%, o pH final utilizado foi 4,0 e para 5,0 e 7,5% de parede, o pH final foi de 3,75.

#### 4.3.3.3.1 Eficiência de Encapsulação (%EE)

A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada como a quantidade de óleo recuperada por grama de cápsula em relação ao óleo inicialmente inserido. A quantidade de recheio encapsulada pelas micropartículas coacervadas produzidas, segundo o planejamento experimental, foi determinada pelo teor de lipídeos totais, de acordo com o método descrito por Bligh & Dyer (1959) com algumas adaptações.

$$\%EE = \frac{(g)\text{óleo}/(g)\text{partícula em base seca}}{(g)\text{óleo}/(g)\text{sólidos totais iniciais}} \times 100$$

#### **4.3.3.4 Alteração do Recheio das Micropartículas**

Com base nos resultados obtidos através do planejamento experimental, foram fixados os melhores níveis das variáveis testadas para que fossem produzidas micropartículas coacervadas contendo óleo de salmão como recheio. Foram elaborados três tipos destas micropartículas em função das diferentes gelatinas utilizadas como um dos componentes de parede (gelatina suína comercial e dois lotes de gelatina de tilápia). O fluxograma de produção destas micropartículas seguiu a mesma metodologia detalhada na Figura 3.

### **4.3.4 Caracterização das Micropartículas**

#### **4.3.4.1 Determinação de umidade**

A umidade das micropartículas foi determinada por secagem em estufa a 105°C por 16 horas, segundo metodologia da A.O.A.C. (1998).

#### **4.3.4.2 Determinação de proteína**

O percentual de proteína contido nas micropartículas úmidas foi determinado através do método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1998) utilizando-se o fator de correção de 5,55.

#### *4.3.4.3 Determinação de lipídeos totais*

A quantidade de lipídeos totais (recheio das micropartículas) foi determinada pelo método descrito por Bligh & Dyer (1959) com algumas adaptações. A parede das micropartículas úmidas foi rompida a fim de provocar a liberação do recheio contido nestas e posterior quantificação do mesmo. Para isto, previamente ao início do ensaio, foi adicionado SDS à amostra na concentração de 0,5%, na proporção de 1:2 de amostra para SDS (p/v), manteve-se sob aquecimento por 20 minutos em banho-maria a 85°C. O volume de SDS utilizado no ensaio foi descontado do volume total de água que deveria ser adicionado de acordo com a metodologia. A concentração e proporção de SDS foram definidas em função de testes feitos com a variação destes parâmetros. As amostras foram observadas por microscopia ótica para confirmar a destruição da parede das micropartículas.

#### *4.3.4.4 Secagem das Micropartículas*

Foi realizada a secagem das micropartículas coacervadas através de liofilização. As amostras foram passadas por peneiras (Mesh = 25µm) para que se retirasse o excesso de água das amostras. Em seguida foram dispersas, em finas camadas, sobre placas de Petri plásticas, cobertas com papel alumínio contendo pequenos orifícios e submetidas a congelamento em freezer (em torno de -18°C por, no mínimo, 24 horas) para depois serem levadas ao liofilizador onde as condições empregadas foram: temperatura do condensador -60°C e pressão de 10<sup>-1</sup> mbar. As amostras permaneceram, em média, por 3 dias consecutivos no equipamento.

#### *4.3.4.5 Determinação do diâmetro médio de partículas e distribuição de tamanho*

A determinação de tamanho de partículas úmidas, liofilizadas e posteriormente reidratadas em água destilada, foi feita por microscopia ótica com captação de imagens através de uma câmera digital controlada pelo programa Image Pro Plus 4.0. O tamanho de partícula foi determinado pelo mesmo programa, medindo-se pelo menos 300 partículas por amostra analisada. A distribuição de tamanho das micropartículas foi obtida através da construção de histogramas. Partículas evidentemente aglomeradas foram excluídas nesta avaliação.

#### *4.3.4.6 Morfologia*

A morfologia das micropartículas foi avaliada por microscopia ótica (MO) e eletrônica de varredura (MEV) para as micropartículas liofilizadas. Para a observação das micropartículas coacervadas foi utilizado um microscópio ótico (NIKON – eclipse E800 – Japan) munido de software Image Pro Plus 4.0 para obtenção das imagens. A observação e captação das imagens óticas foram feitas em água também para as amostras liofilizadas, o que permitiu avaliar o inchamento das micropartículas e a integridade de parede.

O preparo para a observação por MEV das micropartículas coacervadas liofilizadas consistiu na fixação de pequenas quantidades das amostras em pedaços de fita adesiva metálica de cobre dupla face, aderidos em stubs de alumínio de 1cm de diâmetro por 1cm de altura. Os stubs com as amostras foram recobertos por uma fina camada de ouro em um evaporador Balzer mod. SCD50 pelo tempo de 180 segundos e corrente de 40mA. Posteriormente, a observação das amostras foi feita em um microscópio eletrônico de varredura Jeol mod. JMS – T300 com aceleração da voltagem de 10 kV.

#### **4.3.5 Análise Estatística**

As diferenças significativas entre os valores de médias foram avaliadas por teste de diferenças de médias a 5% de acordo com o teste de TUKEY e ANOVA, com o auxílio do software Statistica 6.0 for Windows (STATSOFT, INC., 1995).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Produção da matéria-prima (Gelatina de peixe)

#### 5.1.1 Rendimento de extração de gelatina de pele de tilápia

Os rendimentos das extrações de gelatina foram de 10,2% e 18,3% para o primeiro e segundo lotes produzidos, respectivamente, e foram expressos em gramas de gelatina em pó por 100g de pele úmida. SONGCHOTIKUNPAN et al. (2008) também extraíram gelatina de pele de Tilápia do Nilo e obtiveram praticamente o mesmo percentual de rendimento (18,1%).

O primeiro lote resultou em menor rendimento que o segundo porque ocorreram algumas perdas de material durante o processo de secagem em estufa, tendo sido necessário descartar parte da matéria-prima. Foi observado por CHO et al., (2005) que a temperatura de extração pode ser um fator chave para o processamento da gelatina por interferir no conteúdo de gelatina obtido, pois temperaturas acima de 60°C podem levar à extração de outras proteínas de baixa massa molar.

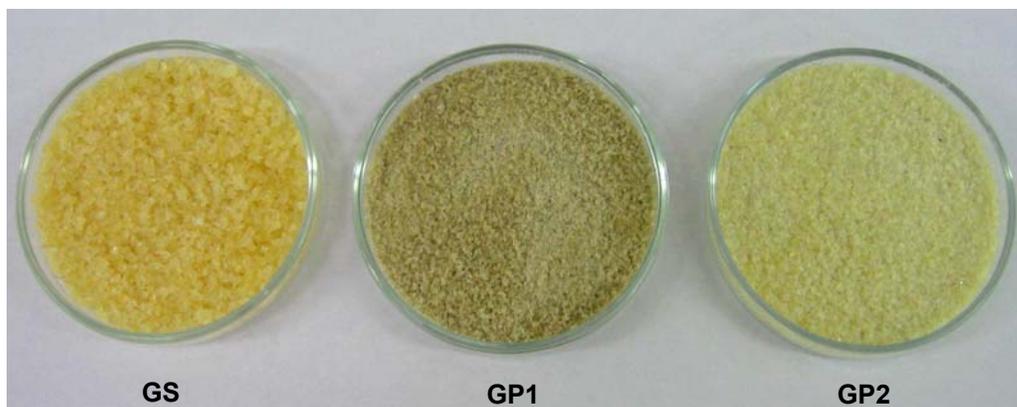
De modo geral, a gelatina extraída de pele de Tilápia do Nilo normalmente resulta em maior rendimento que a extraída de outros peixes e estes valores podem variar em função da composição centesimal das peles, do conteúdo em colágeno e da quantidade de componentes solúveis presentes nas peles, que, por sua vez, variam com o método de extração empregado e com a idade e espécie do peixe utilizado (MUYONGA et al., 2004 & JONGJAREONRAK et al., 2006). O rendimento de gelatina de pele de diferentes espécies de peixes pode variar entre 5,5 a 21% do peso da matéria-prima (GIMÉNEZ et al., 2005a, 2005b; GROSSMAN & BERGMAN, 1992; JAMILAH & HARVINDER, 2002; MUYONGA, COLE & DUODU, 2004; OSBORNE, VOIGHT & HALL, 1990). Uma produção bem menor foi obtida por JAMILAH & HARVINDER (2002), com rendimento de 5,39% para *Oreochromis placidus* e de 7,81% para *Oreochromis mossambicus*. De

acordo com os autores, isto pode ter ocorrido devido à perda de colágeno extraído ou pela hidrólise incompleta.

### 5.1.2 Caracterização de gelatina de pele de tilápia

#### 5.1.2.1 Aspecto geral dos dois lotes de gelatina de peixe produzidos

Os dois lotes de gelatina de peixe produzidos puderam ser solubilizados em água à temperatura em torno de 60° C por aproximadamente 2 horas e foi possível reduzir substancialmente o odor de peixe das mesmas devido ao tratamento químico utilizado na sua produção. Quanto à aparência, o 1° lote apresentou coloração mais escura que o segundo em consequência da presença de maior quantidade de gordura no primeiro lote, conforme o que pode ser observado através da Figura 4.



**Figura 4:** Aspecto visual da coloração das diferentes amostras de gelatina. GS: gelatina suína; GP1: gelatina de peixe do 1° lote; GP2: gelatina de peixe do 2° lote.

### 5.1.2.2 Composição centesimal

A composição centesimal da pele de tilápia utilizada para a extração da gelatina, em relação ao teor de proteína, lipídeos, cinzas e umidade está apresentada na Tabela 3. O conteúdo de umidade da pele de Tilápia do Nilo (68%) foi semelhante ao valor encontrado (67,7%) por SONGCHOTIKUNPAN et al. (2008). O percentual de proteína, cujo valor representa a máxima produção possível de gelatina que pode ser extraída destas peles, também foi bem próximo ao valor encontrado pelos autores citados acima (30,6%). Quanto aos valores de lipídeos e cinzas, estes autores encontraram os percentuais de 1,1 e de 2,1 respectivamente. É conhecido o fato de que a composição química da pele varia com a idade e sexo do animal, bem como com o tratamento utilizado para a remoção da pele a partir da carcaça (OCKERMAN & HANSEN, 2000).

**Tabela 3:** Composição centesimal de pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), gelatina suína comercial e dois lotes de gelatina de tilápia.

Conteúdo (%)	Pele Tilápia	Gelatina peixe 1º lote	Gelatina peixe 2º lote	Gelatina suína
Umidade	68,0 ± 0,9	9,7 ± 0,0	9,3 ± 0,1	10,5 ± 0,3
Proteína	28,5 ± 1,8	89,4 ± 1,0	88,9 ± 0,4	90,0 ± 1,0
Lipídeos	2,4 ± 0,4	1,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Cinzas	1,9 ± 0,3	0,3 ± 0,0	1,8 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Total	100,8	100,9	100,4	100,3

Os dois lotes de gelatina de peixe foram caracterizados comparativamente, em relação a uma gelatina suína comercial, considerando seus

teores de proteína, lipídeos, cinzas e umidade (Tabela 3). As gelatinas de peixe exibiram alto conteúdo protéico, coerente com o valor (89,4%) encontrado por SONGCHOTIKUNPAN et al. (2008). Estes autores encontraram valores de umidade, gordura e cinzas de 7,3%, 0,3% e 0,4% respectivamente. As gelatinas que apresentam alto conteúdo em proteínas e baixos percentuais de gordura e de umidade refletem uma remoção eficiente de material lipídico e de água no processamento das peles (JONGJAREONRAK et al. 2006).

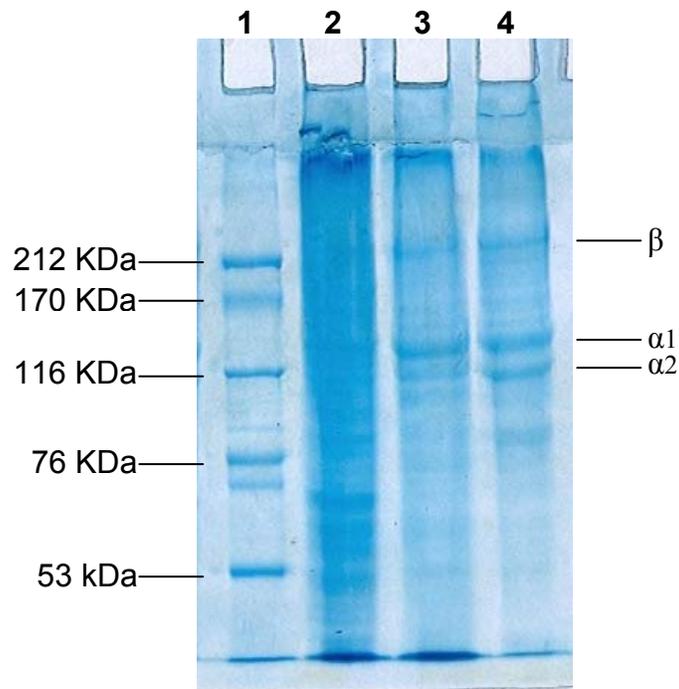
O conteúdo de lipídeos da gelatina de peixe do 1º lote foi maior que o da gelatina do 2º lote, conforme observado na Tabela 3. No decorrer da extração da gelatina em água destilada é importante que se remova o material lipídico. Este procedimento pode ser realizado com o uso de papel filtro passado sobre a superfície do material ao longo de todo o processo de extração com alta temperatura. Desta forma, a gordura que, naturalmente se concentra na superfície devido a sua menor densidade, vai sendo absorvida. A remoção de gordura foi realizada apenas para o 2º lote de gelatina, o que contribuiu para esta gelatina ter apresentado uma porcentagem menor de lipídeos.

Outro fator que levou a esta diferença entre os lotes, foi a etapa de tratamento das peles antes da extração. Na produção do 2º lote, a imersão das peles nas soluções utilizadas foi realizada de forma mais prolongada, e as lavagens entre as imersões foram mais eficientes, facilitando a eliminação da gordura contida nas peles, o que foi facilmente visualizado pela observação do acúmulo de gordura em toda a borda do tanque utilizado para as imersões. Estas pequenas alterações no procedimento de extração foram conduzidas na tentativa de se obter dois lotes de gelatina com composições em lipídeos um pouco diferentes, que posteriormente poderiam produzir diferentes graus de atratividade na elaboração de micropartículas para alimentação de larvas de peixes.

### 5.1.2.3 Distribuição da massa molar das gelatinas

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada para as três preparações de gelatina para se observar se havia diferenças nas distribuições das massas molares devido ao processo de extração.

O perfil eletroforético apresentado na Figura 5 mostrou que a gelatina suína apresentou padrão difuso de massas molares, traduzindo-se pela coloração aproximadamente contínua do gel, principalmente na parte superior e indicando que esta gelatina sofreu maior fragmentação que as gelatinas de peixe no processo de produção, como anteriormente observado por KOLODZIEJSKA (2008). As gelatinas de peixe do 1º e do 2º lotes apresentaram, também, bandas correspondentes às cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  do colágeno. Foi possível observar cinco bandas definidas (212 KDa, 170 KDa, 116 KDa, 76 KDa e 53 KDa) na distribuição de massa molar das gelatinas de peixe, com maior destaque para a banda de massa molar de 116 KDa. Os perfis eletroforéticos dos dois lotes de gelatina de peixe, aparentemente, não mostraram diferenças significativas entre eles. Adicionalmente, as gelatinas de peixe apresentaram menor quantidade de polímeros com menores massas molares que o observado no perfil eletroforético da gelatina suína.



**Figura 5:** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de gelatina suína comercial (2), e de gelatina de tilápia do 1º lote (3) e 2º lote (4) em relação ao padrão (1).

Foi observado por CHIOU et al. (2006) uma distribuição de massa molar relativamente diferente da observada neste trabalho. Todavia, os peixes utilizados no trabalho eram de águas frias, o que resulta em diferenças nas suas propriedades comparadas com gelatinas de peixes tropicais, a exemplo da tilápia. Estas diferenças foram também evidenciadas por GÓMEZ-GUILLÉN et al. (2002) ao confrontarem os perfis eletroforéticos de várias espécies de peixes, sendo que as gelatinas provenientes de peixes de águas quentes apresentaram maiores quantidades de componentes de alta massa molar que as de peixe de águas frias.

GUDMUNDSON (2002) analisou os efeitos da origem da gelatina e do procedimento de extração sobre suas propriedades reológicas. O perfil eletroforético da gelatina de tilápia mostrou a presença de bandas de alta massa molar, assim como as gelatinas que receberam tratamento ácido. Foi constatado que os tratamentos mais brandos e de menor duração provocaram menor

fragmentação da proteína, o que foi evidenciado pela presença de bandas de alta massa molar. Em contrapartida, os tratamentos mais severos resultaram na presença de grande quantidade de fragmentos de polímeros de baixa massa molar.

GIMÉNEZ et al. (2005b) observaram que o emprego de sais, principalmente de cloretos, na etapa de lavagem das peles submetidas à extração de gelatina, provocam a abertura da estrutura do colágeno, facilitando a interação do mesmo com o ácido utilizado em seguida, aumentando a extração de polímeros de maior massa molar. GIMÉNEZ et al. (2005c) observaram através da distribuição de massa molar de gelatina de pele (*Solea vulgaris*), que ácidos mais fracos permitiram a extração de material colagenoso mais intacto, porém com menor rendimento na produção.

Diversos autores observaram que quanto maior o grau de *cross-linking* das moléculas de colágeno, maior a dificuldade de se extrair polímeros de maior massa molar. Este fato foi observado por FERNANDEZ-DIÁZ et al. (2003) e GIMÉNEZ et al. (2005c) ao analisarem os diferentes perfis eletroforéticos em função de variadas formas de conservação das peles de peixe submetidas posteriormente à extração de gelatina.

#### 5.1.2.4 Ponto de fusão das gelatinas

A temperatura de fusão de gelatina de pele de peixe pode sofrer variações em função de muitos fatores, tais como: método de preservação das peles, condições de extração da gelatina, preparo da solução em diversos tipos de sais, origem da mesma, composição em aminoácidos, distribuição de massa molar, proporção entre cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , entre outros.

Os pontos de fusão das gelatinas suína e das obtidas dos dois lotes de peixe foram determinados e os resultados estão apresentados na Tabela 4. Como esperado, a gelatina suína apresentou a maior temperatura de fusão entre as amostras, coerente com os resultados da literatura, que mostram que gelatinas de mamíferos apresentam ponto de fusão maior do que as gelatinas de peixes (CHOI

& REGENSTEIN, 2000; GILSENAN & ROSS-MURPHY, 2000; GUDMUNDSSON, 2002; LEUENBERGER, 1991). As gelatinas de peixes tropicais, a exemplo da tilápia, se caracterizam por melhores propriedades físicas, entre elas, um maior ponto de fusão que as gelatinas de peixes de águas frias e possuem propriedades mais similares às gelatinas de mamíferos e isto se deve à quantidade de iminoácidos presentes na gelatina. É conhecido o fato de que quanto maior o conteúdo de prolina e de hidroxiprolina na gelatina, maior será a propensão para formação de hélices intermoleculares, resultando em maiores temperaturas de fusão (HAUG et al., 2004; JOLY-DUHAMEL, HELLIO, AJDARI & DJABOUROV, 2002; NORLAND, 1990; PIEZ & GROSS, 1960; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002; GILSENAN, 2000; GOMEZ-GUILLÉN et al., 2005). Esta característica pôde ser verificada através dos resultados obtidos por GÓMEZ-GUILLÉN et al. (2002), em que os géis de gelatina de *Solea vulgaris* e *Lepidorhombus boscii* mostraram-se mais estáveis que as gelatinas de *Gadus morhua* e *Merluccius merluccius*, onde o início da fusão ocorreu em torno de 21°C para os primeiros, e entre 13 a 15°C para os peixes adaptados ao frio (*Gadus morhua* e *Merluccius merluccius*), evidenciando também que a estabilidade térmica de um gel de gelatina estava diretamente correlacionada ao conteúdo de prolina.

GUDMUNDSSON (2002) obteve uma temperatura de fusão para gelatina de tilápia de 25,8°C. JAMILAH & HARVINDER (2002) obtiveram pontos de fusão de gelatinas de *Oreochromis placidus* e *Oreochromis mossambicus* de 22,4°C e 28,9°C, respectivamente. Da mesma forma GÓMEZ-GUILLÉN et al. (2002) analisaram gelatinas de peixes de água quente, as quais também apresentaram temperaturas de fusão em torno de 21°C.

**Tabela 4:** Temperaturas de fusão de gelatina suína e de gelatina de peixe do 1º e 2º lotes.

Amostra	Temp. inicial (°C)	Temp. final (°C)
Gelatina suína	27,5	29,5
Gelatina peixe 1º lote	18,5	20
Gelatina peixe 2º lote	24	26

Amostras foram preparadas em triplicata na concentração de 6,67%, submetidas a 18 horas de maturação (10°C), com posterior aquecimento do gel em banho ultratermostatizado, de 15°C a 30°C (0,5°C a cada 5 minutos).

#### 5.1.2.5 Força de gel (*Bloom*) e análise do perfil de textura (*TPA*)

De acordo com HOLZER (1996), a força de gel de uma gelatina comercial expressa como valor *Bloom* varia de 100-300 g, mas é desejável que possua um valor entre 250 a 260 g, uma vez que determina seu valor comercial. Geralmente, quanto maior os valores de força de gel, melhor a qualidade da gelatina (YANG, WANG, JIANG et al., 2007).

A medida padrão do valor *Bloom* pode fornecer uma impressão incorreta do potencial de força de gel de gelatinas de peixe, pois ao longo do tempo de estocagem ocorre um aumento desta. O fortalecimento do gel durante a estocagem é principalmente atribuído à regeneração das estruturas de hélice entre as cadeias peptídicas da gelatina, devido à formação de pontes de hidrogênio entre aminoácidos hidroxilados e moléculas de água incorporadas às cadeias protéicas (BABEL, 1996; HAUG et al., 2004).

Os valores médios de força de gel das amostras de três tipos de gelatina analisadas (gelatina suína comercial, gelatina de peixe do 1º lote e gelatina de peixe do 2º lote) estão apresentados na Tabela 5 com seus respectivos desvios padrão. Os valores de pH lidos para as amostras de GS, GP 1º lote e GP 2º lote, logo após o preparo das soluções de gelatina previamente à maturação, foram de 5,2, 6,4 e 5,2, respectivamente.

**Tabela 5:** Comparação das medidas de força de gel (*Bloom*) de gelatina suína (GS) e de gelatinas de peixe (GP 1º lote e GP 2º lote).

	Força de gel* ( <i>Bloom</i> ) g
GS	192,25 ± 2,86
GP 1º lote	11,54 ± 0,67
GP 2º lote	202,76 ± 3,70

\* Média ± Desvio-padrão. n= 5

As amostras foram preparadas a concentração de 6,67%.

Velocidade de penetração = 0,5mm/segundo; distância de penetração= 4mm de profundidade.

A força de gel encontrada para a gelatina de peixe do 1º lote foi significativamente mais baixa que da gelatina suína e da gelatina de peixe do 2º lote. Durante a determinação do valor de *Bloom*, o método estabelece somente 4 mm de penetração do probe dentro da amostra. Deve-se considerar que foi encontrada maior quantidade de lipídeos na gelatina do 1º lote, o que pode ter acarretado a grande diferença nos valores de *Bloom* observados entre os dois lotes. Isto parece ter decorrido porque a gordura com menor densidade flota e naturalmente se concentra na superfície do recipiente contendo a gelatina utilizada na análise. Neste ensaio (*Bloom*) a distância de penetração é muito pequena e o probe na maior parte desta distância estará em contato com a fração lipídica muito

mais frágil que a gelatina, acarretando um resultado subestimado. Outra hipótese é que estas moléculas de gordura, presentes em maior quantidade no primeiro lote, estejam distribuídas ao longo da rede de gel através de ligações químicas, enfraquecendo o gel formado.

A diferença de força de gel entre os dois lotes também pode ter ocorrido devido à utilização de maior temperatura no momento da extração, em água destilada, da gelatina do 1º lote, ou seja, aproximadamente 70°C ao invés de 50°C  $\pm$  5°C utilizada na extração do 2º lote. Foi observado por GÓMEZ-GUILLÉN et al. (2002) comportamento semelhante, quando extraíram gelatina de lula utilizando alta temperatura, pois a gelatina resultante apresentou um valor de força de gel muito baixo, apesar do alto conteúdo de iminoácidos presentes nesta matéria-prima. Os autores sugeriram que este resultado foi conseqüência da presença de fragmentos de degradação de proteína resultante da utilização de alta temperatura para a extração da mesma. CHO et al. (2005) também observaram o mesmo efeito da extração em alta temperatura sobre a força de gel, onde extrações acima de 60°C acarretaram a produção de gelatinas com menores valores de *Bloom* do que as obtidas em temperatura em torno de 50°C.

Por outro lado, a gelatina de peixe de 2º lote apresentou alto valor de *Bloom* (202,7 g), em concordância com outros valores obtidos na literatura. GROSSMAN & BERGMAN (1992) obtiveram valor de 263 g para a gelatina de tilápia. SONGCHOTIKUNPAN et al. (2008), obtiveram valor ainda mais alto de, aproximadamente, 328 g de força de gel para gelatina extraída de pele de Tilápia do Nilo. Foram reportados na literatura diferentes valores de *Bloom* para gelatinas provenientes de outros peixes: *Oreochromis placidus* (181 g), *Oreochromis mossambicus* (128 g), *Gadus morhua* (70 g), *Merluccius merluccius*, *Lepidorhombus boscii* (340 g) e *Solea vulgaris* (350 g) (SONGCHOTIKUNPAN et al., 2008).

A concentração de cadeias  $\alpha$  também influencia fortemente esta medida, assim como a massa molar média da gelatina (FERNÁNDEZ-DÍAZ et al., 2003; JOHNSTON-BANKS, 1990). Uma quantidade considerável de polímeros de alta massa molar permite a formação de triplas hélices mais organizadas e interações

mais estáveis (SIMS, BAILEY & FIELD, 1997; STAINSBY, 1997), efeito também observado por FERNÁNDEZ-DÍAZ et al. (2003). Os autores demonstraram que gelatinas provenientes de peles de peixe mantidas refrigeradas sem congelamento, apresentaram maior força de gel que as gelatinas de peles conservadas em freezer (a -12 ou -20°C), o que pode ser consequência de modificações na distribuição de massa molar em decorrência do congelamento. Em peles não congeladas, a maior quantidade encontrada de cadeias  $\alpha$ , e principalmente de componentes  $\beta$  e  $\gamma$ , permite a formação de uma estrutura mais organizada e consequentemente com maior força de gel.

A medida de força de gel (*Bloom*) e a análise do perfil de textura (TPA), embora avaliem a dureza ou a força de gel, são duas medidas feitas de forma diferente, sendo o valor comercial de uma gelatina dado principalmente pelo seu valor *Bloom* (ZHOU et al., 2006). A análise utilizando o TPA é útil para a análise de textura do gel porque permite estabelecer uma correlação com a avaliação sensorial dos parâmetros de textura e fornece informações adicionais além da dureza (LAU, TANG & PAULSON, 2000). Os testes de TPA são utilizados para simular a ação do gel sobre a língua e os dentes. A Tabela 6 apresenta os resultados da dureza, efetuados pelo TPA, das amostras de gelatina de pele de tilápia em comparação com a suína comercial.

**Tabela 6:** Medidas de dureza de gelatina suína (GS) e de gelatinas de peixe de 1<sup>o</sup> e de 2<sup>o</sup> lotes (GP 1<sup>o</sup> lote; GP 2<sup>o</sup> lote).

	*Dureza (g)
GS	886,42 ± 148,71
GP 1 <sup>o</sup> lote	- 6,23 ± 0,93
GP 2 <sup>o</sup> lote	794,38 ± 64,10

\* Média ± desvio-padrão. n = 5  
As amostras foram preparadas na concentração de 6,67%.  
Velocidade de penetração= 2mm/seg; distância de penetração= 60% de profundidade.

Pode-se observar que a gelatina de peixe do 1<sup>o</sup> lote apresentou valor negativo para a dureza, resultado coerente com o baixo valor de força de gel determinado para este lote (Tabela 5). A gelatina suína e de peixe do 2<sup>o</sup> lote aparentemente não apresentaram diferenças acentuadas entre elas na análise de perfil de textura, assim como na determinação do *Bloom*.

## **5.2 Estudo das condições para produção de micropartículas coacervadas utilizando gelatina de peixe**

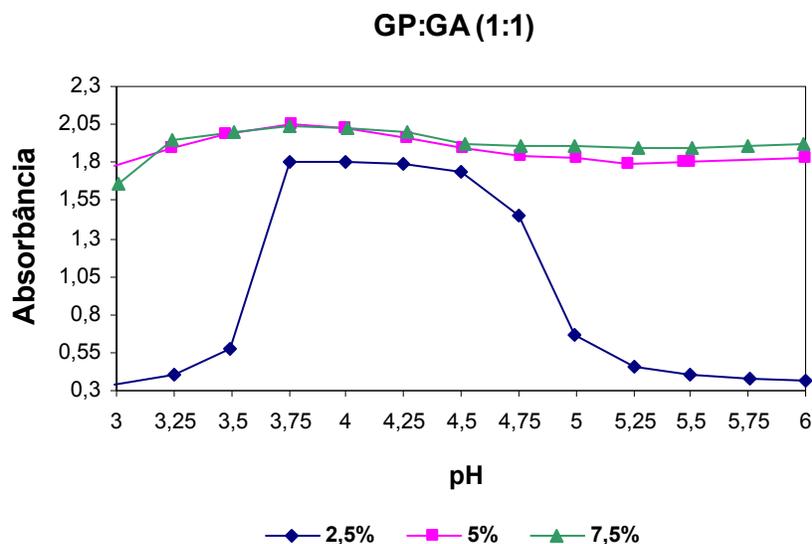
### **5.2.1 Determinação do pH de coacervação por turbidimetria para produção de micropartículas coacervadas**

A turbidimetria foi utilizada com a finalidade de se observar o efeito do pH na mudança de absorvância dos pares poliméricos Gelatina de peixe do 2<sup>o</sup> lote (GP) : Goma Arábica (GA) para se determinar o pH de coacervação mais adequado. O mesmo procedimento foi realizado com o par polimérico Gelatina

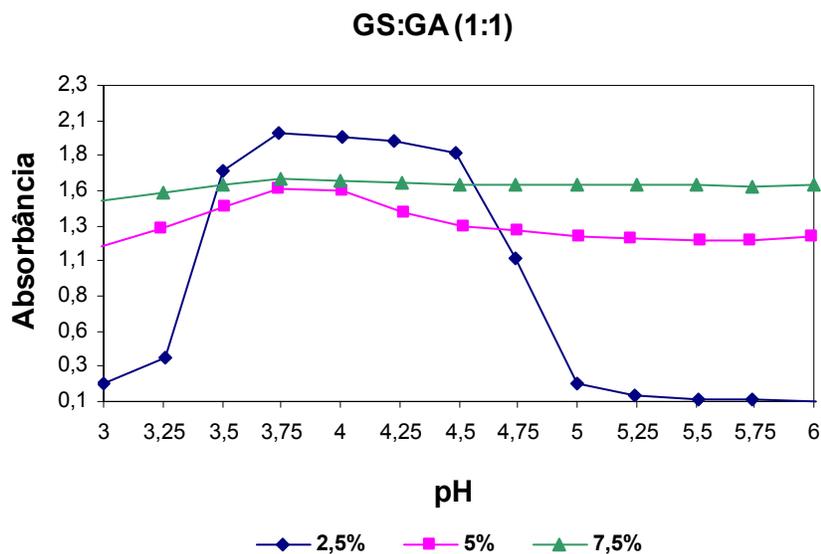
Suína (GS) : Goma Arábica (GA) para a comparação do comportamento da gelatina de peixe com a gelatina suína comercial, utilizada como um padrão de referência em todos os ensaios de caracterização da mesma. Para isso, foi fixada a proporção de 1:1 entre os polímeros e feita apenas a variação de concentração das soluções (2,5%, 5,0% e 7,5%). O surgimento de turbidez é normalmente atribuído ao aparecimento de gotas coacervadas no meio (DUCEL et al., 2004).

Nas Figuras 6 e 7 podem ser observadas as variações na absorvância dos dois diferentes pares poliméricos à medida que os pH foram sendo aumentados. Foi necessário realizar uma varredura do comprimento de onda, pois as soluções de maiores concentrações (5,0 e 7,5%) não puderam ter suas absorvâncias determinadas a 590 nm. O comprimento de onda de 292 nm foi adequado para a determinação da absorvância destas soluções de polímeros de maiores concentrações e de 590 nm para os pares poliméricos a 2,5% (Anexos 1, 2, 3 e 4).

O tipo dos polímeros interfere no pH de coacervação do sistema goma arábica-gelatina, que pode variar na faixa de 3,0 até 5,0 (THIES, 1995; IJICHI et al., 1997; MENGER & SYKES, 1998; BURGESS & PONSART, 1998; LAMPRECHT et al., 2000; LAMPRECHT et al., 2001). O processo de fabricação da gelatina, ou seja, gelatina tipo A ou tipo B, altera o ponto isoelétrico da proteína e seu balanço de cargas, o que acarreta pequenas diferenças na faixa de coacervação, conforme o que foi observado por BURGESS & CARLESS (1984). De acordo com PRATA (2006), pode ser observada uma redução na intensidade de coacervação em pH inferiores a 3,5, independente da proporção entre os biopolímeros. A adição de ácido à solução de goma arábica provoca a ionização dos grupos  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$  deste polissacarídeo, mas em meios muito ácidos ocorre uma inibição desta ionização, diminuindo a intensidade de interação com a proteína carregada positivamente (PRATA, 2006).



**Figura 6:** Efeito do pH na absorbância do par polimérico Gelatina de peixe do 2º lote (GP) : Goma arábica (GA) na proporção de 1:1, com 2,5% (a 590nm), 5% (a 292nm) e 7,5% (a 292nm) de polímero total de parede (p/p), como função do pH.



**Figura 7:** Efeito do pH na absorbância do par polimérico Gelatina suína (GS) : Goma arábica (GA) na proporção de 1:1, com 2,5% (a 590nm), 5% (a 292nm) e 7,5% (a 292nm) de polímero total de parede (p/p), como função do pH.

Pode-se observar nas Figuras 6 e 7 que os dois pares poliméricos testados apresentaram o maior valor de absorbância na faixa de pH entre 3,75 e 4,0. Portanto, as soluções formadas pelos polímeros, em todas as concentrações

testadas (2,5%, 5,0% e 7,5%), indicaram o ponto de máxima interação entre eles nesta faixa de pH em que se apresentaram mais turvas. Desta forma, para os ensaios do planejamento experimental, no qual se utilizou somente a gelatina de peixe do 2º lote como um dos polímeros de parede, foram adotados os seguintes pHs: pH 3,75 quando a concentração de polímeros foi de 5 ou 7,5% e pH 4,0 somente para a concentração de 2,5% de parede. Através do efeito das variações de pH sobre o comportamento dos sistemas, foi possível perceber a tendência à coacervação dos pares poliméricos antes mesmo da inserção do recheio e da influência dos demais parâmetros envolvidos no processo de microencapsulação.

### **5.2.2 Elaboração de micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja**

As micropartículas elaboradas por coacervação complexa no planejamento experimental foram formadas por gelatina de peixe do 2º lote produzido e goma arábica, responsáveis pela formação da parede. Como material de recheio, utilizou-se uma mistura de oleoresina de páprica e óleo de soja na proporção de 1:20 (p / p). A partir dos resultados de eficiência de encapsulação e análise de morfologia das micropartículas produzidas, foi possível determinar e fixar os melhores níveis das variáveis testadas no planejamento experimental para a posterior elaboração dos coacervados que passaram a conter óleo de salmão como recheio. As variáveis e os níveis utilizados no planejamento experimental e os resultados dos ensaios realizados estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Planejamento experimental (variáveis numéricas e codificadas) e resposta para avaliação da produção de micropartículas por coacervação complexa.

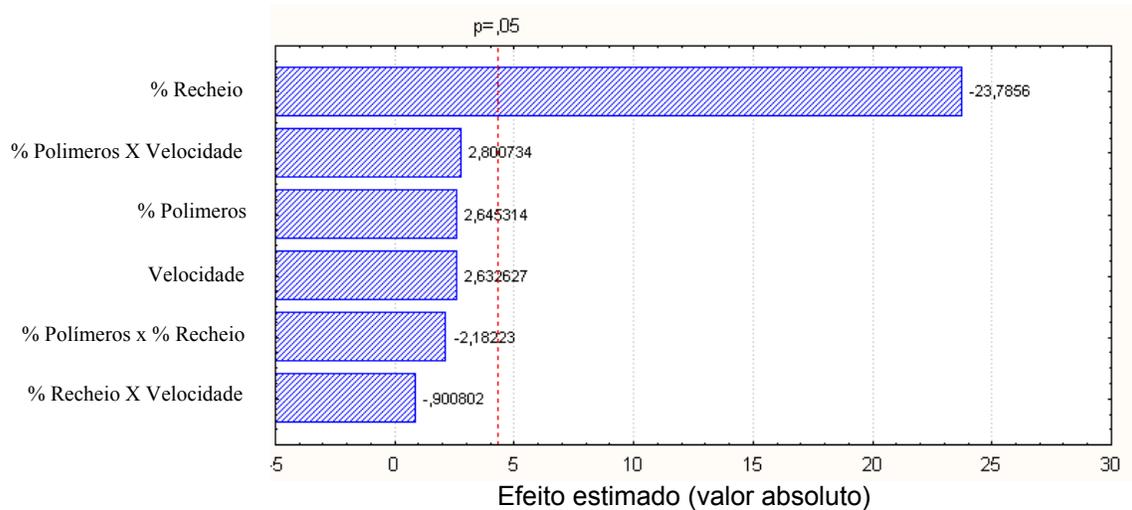
Ensaio	Variáveis*			Resposta EE% <sup>4</sup>
	Velocidade <sup>1</sup>	Concentração Polimeros <sup>2</sup>	Concentração Recheio <sup>3</sup>	
1	6000 (-1)	2,5 (-1)	50 (-1)	71,77 ± 2,14 <sup>d</sup>
2	6000 (-1)	2,5 (-1)	150 (+1)	42,45 ± 1,67 <sup>a,b</sup>
3	6000 (-1)	7,5 (+1)	50 (-1)	78,28 ± 1,93 <sup>d,e</sup>
4	6000 (-1)	7,5 (+1)	150 (+1)	35,45 ± 1,90 <sup>a</sup>
5	14000 (+1)	2,5 (-1)	50 (-1)	76,24 ± 2,13 <sup>d</sup>
6	14000 (+1)	2,5 (-1)	150 (+1)	37,45 ± 1,00 <sup>a</sup>
7	14000 (+1)	7,5 (+1)	50 (-1)	84,95 ± 5,92 <sup>e</sup>
8	14000 (+1)	7,5 (+1)	150 (+1)	45,91 ± 0,71 <sup>b,c</sup>
9	10000 (0)	5,0 (0)	100 (0)	51,56 ± 1,17 <sup>c</sup>
10	10000 (0)	5,0 (0)	100 (0)	48,04 ± 2,60 <sup>b,c</sup>
11	10000 (0)	5,0 (0)	100 (0)	47,43 ± 3,40 <sup>b,c</sup>

\*As variáveis codificadas do planejamento estão representadas pelos números sobrescritos.

1- Formação da emulsão em Ultraturrax (rpm/2minutos); 2- Proporção volumétrica (1:1) de mistura de gelatina de peixe do 2º lote e goma arábica; 3- Porcentagem de recheio em relação à massa de polímeros de parede; 4- Eficiência de Encapsulação: calculada com base na quantidade de óleo recuperada por grama de cápsula, em relação ao óleo inicialmente inserido. Média ± desvio-padrão das amostras em triplicata. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste de Tukey.

A avaliação do planejamento indicou um efeito bastante significativo da concentração de recheio sobre a Eficiência de Encapsulação dos coacervados, como mostra o gráfico de Pareto (Figura 8), construído a partir dos resultados do planejamento experimental e que indica a importância relativa dos fatores avaliados. Ao contrário, a concentração de polímeros de parede, a velocidade de agitação na formação da emulsão e todas as interações entre estas variáveis, não apresentaram efeito significativo sobre a Eficiência de Encapsulação. No planejamento experimental realizado por ALVIM (2005), em que foi empregada a gelatina bovina ao invés da gelatina de peixe para a formação da parede dos coacervados contendo oleoresina de páprica/óleo de soja (1:7) como recheio, foi observado um efeito significativo da concentração de polímeros de parede, da concentração de recheio, e da interação entre essas duas variáveis sobre a Eficiência de Encapsulação. A velocidade de agitação não apresentou efeito

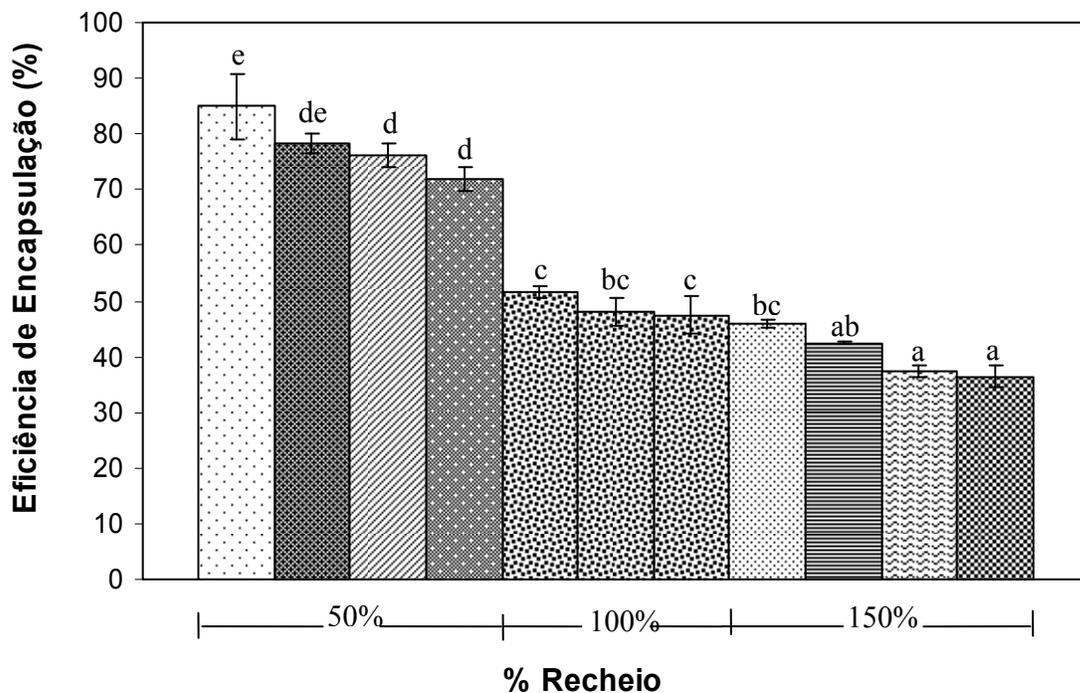
significativo. Além disso, de modo geral, os resultados de Eficiência de Encapsulação obtidos por ALVIM (2005) foram relativamente superiores.



**Figura 8:** Gráfico de Pareto com valor estimado dos efeitos principais e interações de segunda ordem para as variáveis estudadas ao nível de 95% de confiança ( $p = 0,05$ ).

Foi construído um gráfico de barras para mostrar o comportamento da concentração de recheio em relação à Eficiência de Encapsulação (Figura 9), uma vez que foi a única variável que apresentou efeito significativo sobre a resposta avaliada, conforme observado no Gráfico de Pareto (Figura 8).

Pode-se observar na Figura 9 que à medida que se aumenta a concentração de recheio, diminui a Eficiência de Encapsulação. A análise estatística mostrou que, de modo geral, os sistemas de micropartículas constituídos por mesma concentração de recheio e diferentes concentrações de polímeros de parede e velocidades de formação da emulsão, não apresentaram diferenças significativas entre suas Eficiências de Encapsulação, em concordância com o Gráfico de Pareto (Figura 8).



- 7,5%P, 14000rpm    ■ 7,5%P, 6000rpm    ▨ 2,5%P, 14000rpm    ▩ 2,5%P, 6000rpm
- ▤ 5%P, 10000rpm    ▥ 5%P, 10000rpm    ▦ 5%P, 10000rpm    ▧ 7,5%P, 14000rpm
- ▨ 2,5%P, 6000rpm    ▩ 2,5%P, 14000rpm    ▪ 7,5%P, 6000rpm

**Figura 9:** Gráfico de barras contendo o efeito do aumento da quantidade de recheio sobre a Eficiência de Encapsulação das micropartículas coacervadas.

*5.2.2.1 Caracterização das micropartículas produzidas no planejamento experimental*

*5.2.2.1.1 Morfologia*

As características morfológicas das micropartículas produzidas no planejamento experimental foram observadas através de imagens de microscopia ótica em água e estão representadas nas Figuras 10, 11 e 12.

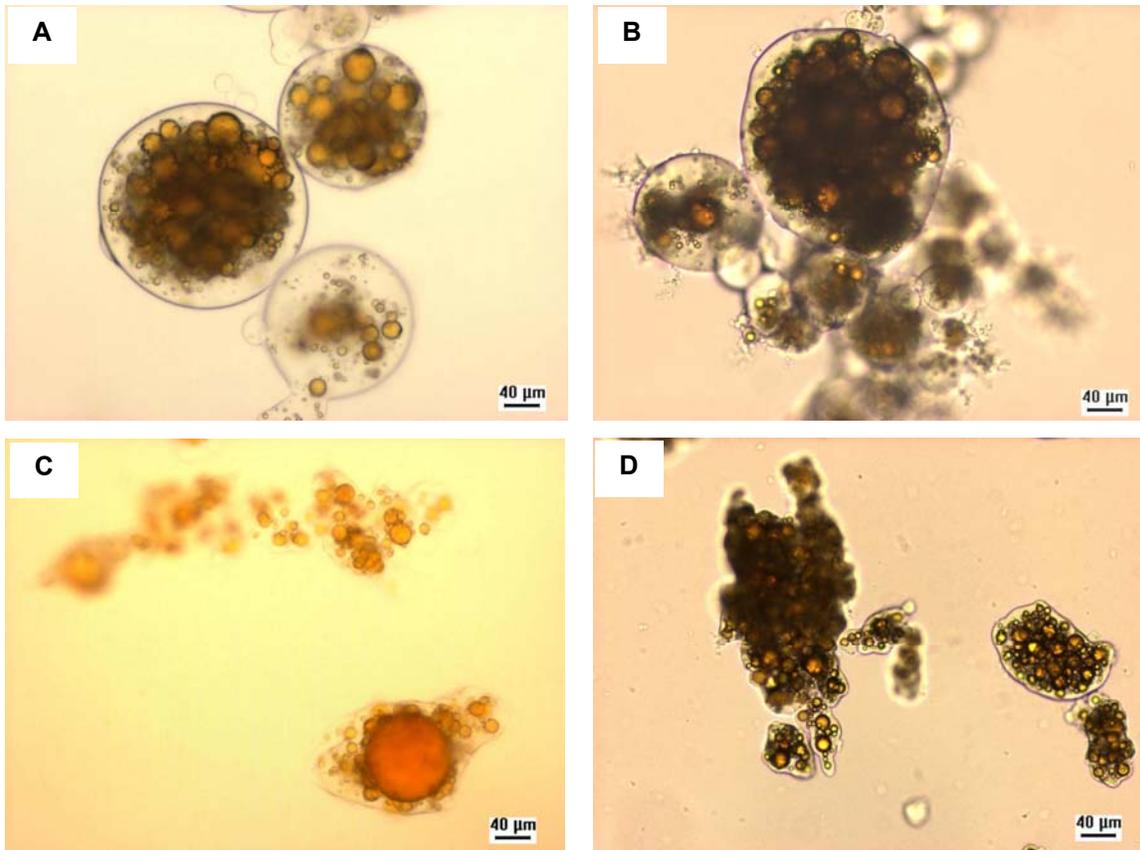
Pela observação das imagens nas Figuras 10 e 11 é possível perceber que, de forma geral, a agitação mais lenta (6000 rpm) produziu partículas com recheio composto por gotículas maiores do que aquelas nas quais foi empregada a agitação mais acelerada (14000 rpm). Este comportamento também foi

observado anteriormente por ALVIM (2005) ao comparar variadas maneiras de agitação para formar a emulsão. WEINBRECK et al. (2004), do mesmo modo, observou, utilizando um sistema coacervado de goma arábica e proteínas do soro de leite, que grandes gotas de óleo foram formadas pelo uso de agitador magnético e pequenas gotas foram obtidas pela agitação em ultraturrax que foram encapsuladas em uma matriz coacervada multinucleada.

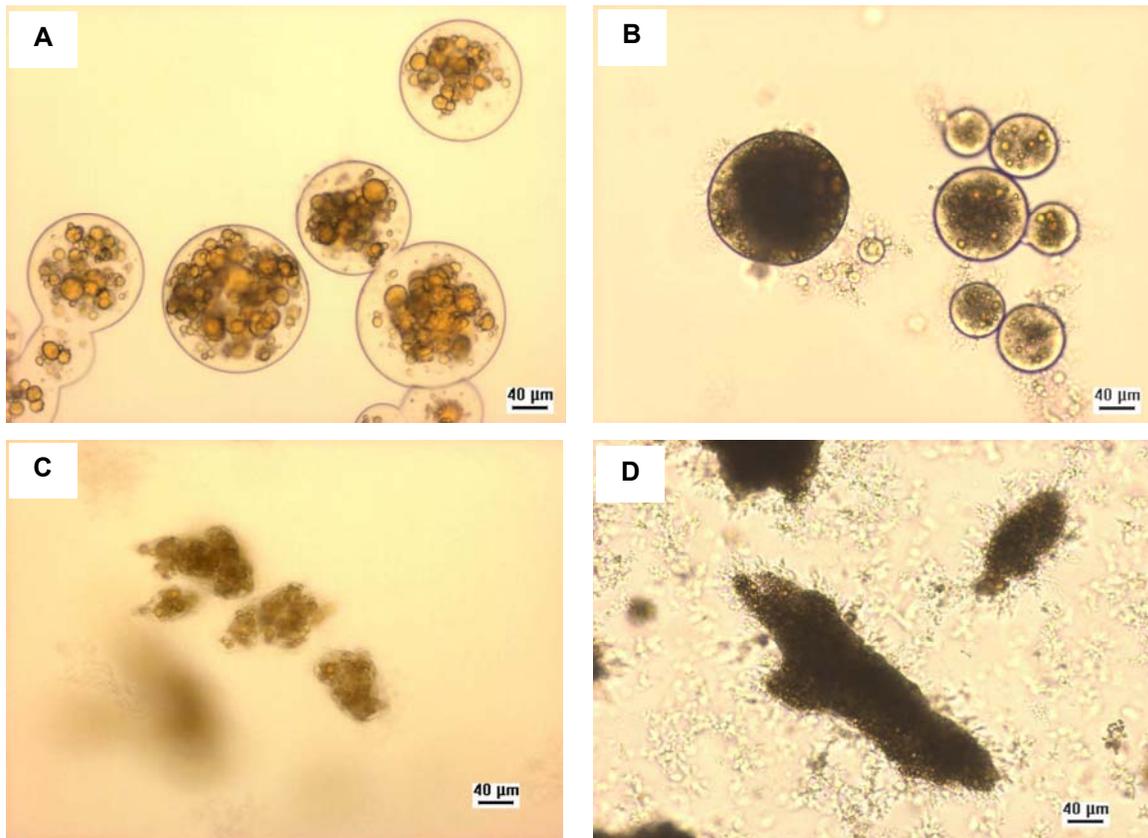
Nas Figuras 10 e 11 observa-se que o aumento da concentração de recheio adicionado às micropartículas resulta em aumento da quantidade aparente de recheio encapsulado, independente da concentração de polímeros de parede e velocidade de agitação utilizadas, em concordância com o observado por ALVIM (2005). LAMPRECHT et al. (2001) observaram em seus estudos que a quantidade crescente de recheio adicionado também aumentou sua quantidade aparente dentro das micropartículas até um determinado limite a partir do qual foi possível observar recheio não encapsulado.

As micropartículas elaboradas com 7,5% de parede, independente das concentrações de recheio e velocidades testadas, se apresentaram bastante irregulares, com perda da esfericidade característica (Figuras 10C, 10D, 11C e 11D). Além disso, foi possível observar a presença de polímeros dispersos que não formaram complexos, comportamento concordante com o observado por outros autores (SCHIMITT et al., 1999). A menor concentração de parede utilizada (2,5%) permitiu a produção de micropartículas com os formatos mais esféricos e regulares (Figuras 10A, 10B, 11A e 11B).

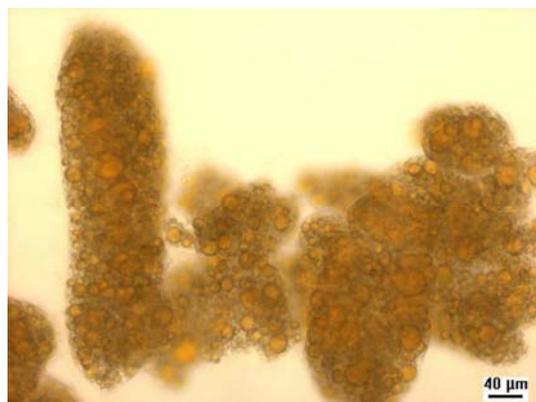
No ponto central do planejamento, as micropartículas também se apresentaram bastante disformes, porém repletas de recheio (Figura 12).



**Figura 10:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas produzidas com 6000 rpm de velocidade para a formação da emulsão (gelatina de peixe do 2º lote + oleoresina de páprica e óleo de soja 1:20 p/p), contendo proporção de polímeros de parede (gelatina de peixe do 2º lote : goma arábica) de 1:1 p/p. A: Micropartículas com 2,5% de parede, 50% recheio; B: Micropartículas com 2,5% de parede, 150% recheio; C: Micropartículas com 7,5% parede, 50% recheio; D: Micropartículas com 7,5% parede, 150% recheio. Barras = 40 µm



**Figura 11:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas produzidas com 14000 rpm de velocidade para a formação da emulsão (gelatina de peixe do 2º lote + oleoresina de páprica e óleo de soja 1:20 p/p), contendo uma proporção de polímeros de parede (gelatina de peixe do 2º lote : goma arábica) de 1:1 p/p. A: Micropartículas com 2,5% de parede, 50% recheio; B: Micropartículas com 2,5% de parede, 150% recheio; C: Micropartículas com 7,5% parede, 50% recheio; D: Micropartículas com 7,5% parede, 150% recheio. Barras = 40 µm



**Figura 12:** Imagem obtida por microscopia ótica de micropartículas coacervadas produzidas com as condições do ponto central do planejamento experimental: 10000 rpm de velocidade para a formação da emulsão (gelatina de peixe do 2º lote + oleoresina de páprica e óleo de soja 1:20 p/p), 5,0% de parede formada por gelatina de peixe do 2º lote : goma arábica na proporção de 1:1 p/p e 100% de recheio. Barras = 40µm.

Após a análise dos resultados de Eficiência de Encapsulação associados aos aspectos morfológicos, observados por microscopia ótica, das micropartículas produzidas no planejamento experimental, foram fixadas as melhores condições para a posterior elaboração de coacervados que passaram a conter óleo de salmão como recheio ao invés de oleoresina de páprica + óleo de soja, seguindo a metodologia de processamento descrita no fluxograma da Figura 3 (Sessão 4). Foram produzidos três tipos diferentes de micropartículas, contendo óleo de salmão, com relação aos materiais formadores de parede: (1) goma arábica associada à gelatina suína, (2) à gelatina de peixe do 1º lote e (3) à gelatina de peixe do 2º lote, mantendo-se fixa a proporção de 1:1 de polímeros de parede. As condições fixadas para o processamento foram: soluções a 2,5% de polímeros de parede, 50% de recheio em relação ao total de material de parede utilizado e 14000 rpm de velocidade para a formação da emulsão de gelatina com o recheio. Apesar dos sistemas 3 e 7 do planejamento experimental terem alcançado altos valores de Eficiência de Encapsulação (78,3% e 84,9% respectivamente), os níveis empregados na produção destas micropartículas não foram definidos como sendo os melhores, pois a análise complementar da morfologia por microscopia ótica mostrou micropartículas muito irregulares (Figuras 10C e 11C, respectivamente). Isto quer dizer que uma concentração de polímeros de parede muito alta (7,5%) provocou uma deformação dos coacervados, o que também pôde ser constatado anteriormente por ALVIM (2005). Foram fixados os níveis utilizados para a produção do sistema 5, pois além de ter alcançado alta Eficiência de Encapsulação (76,2%), apresentou micropartículas com esfericidade característica (Figura 11A).

#### *5.2.2.1.2 Aspecto geral das micropartículas*

Conforme esperado, os percentuais de umidade das micropartículas coacervadas produzidas no planejamento experimental foram altos, variando de 70,5 a 85,0%.

As micropartículas formadas por 2,5 ou 5,0% de parede com qualquer concentração de recheio testada precipitaram de forma característica no recipiente de preparo das mesmas. Com 7,5% de parede as micropartículas precipitaram menos, resultando na formação de um sistema turvo sem a separação nítida da fase característica contendo os coacervados. Isto parece ter ocorrido pelo excesso de polímeros presentes no sistema quando foi utilizada a concentração maior (7,5%) de parede. Segundo SCHIMITT et al. (1999) um excesso de polímero pode levar a uma quantidade de cargas excedentes, prejudicando a formação do complexo. Além disso, o aumento da viscosidade do meio pelo aumento da quantidade de polímeros em solução pode também interferir na formação das micropartículas, já que a mobilidade das macromoléculas pode ser reduzida de forma que a competição com as moléculas do solvente torna-se maior (THIES, 1995; BURGESS, 1994).

Para todas as concentrações de parede, a utilização de 100 e 150% de recheio provocou a formação de um halo vermelho na superfície do sobrenadante do recipiente de preparo das micropartículas, indicando a presença de recheio não encapsulado.

#### *5.2.2.1.3 Diâmetro médio e distribuição de tamanho*

Os diâmetros médios e distribuição de tamanho não puderam ser determinados em um número considerável de sistemas de micropartículas coacervadas úmidas (sistemas: 2, 3, 4, 7, 8, 9 e 10) por não terem apresentado a esfericidade que permitisse a determinação destas medidas. Os demais sistemas apresentaram os formatos esféricos, possibilitando a obtenção destes resultados, que estão apresentados na Tabela 8.

Apenas o sistema 1 diferenciou-se significativamente dos demais sistemas de micropartículas, em relação ao diâmetro médio, conforme observado pelo teste de Tukey.

As partículas do sistema 6, que continham a máxima quantidade de recheio (150%), apresentaram o maior desvio-padrão, indicando uma grande

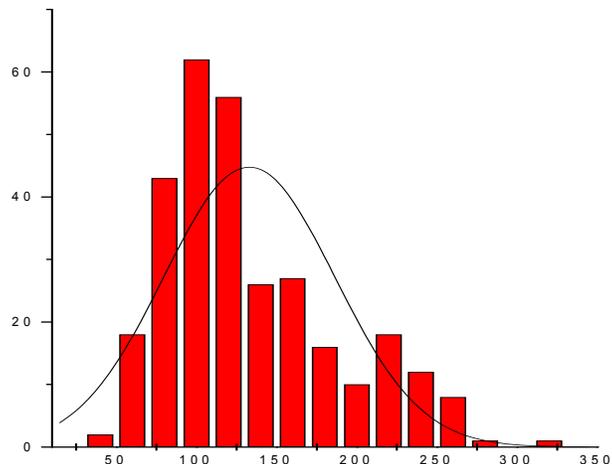
heterogeneidade de tamanhos. Os desvios-padrão foram altos para todas as determinações, em função do método utilizado para a produção das micropartículas, onde a variação de tamanho é alta, independente do planejamento utilizado.

Os histogramas também mostram a existência de diâmetros bastante variados entre as partículas e as distribuições de tamanho foram unimodais e próximas à normal.

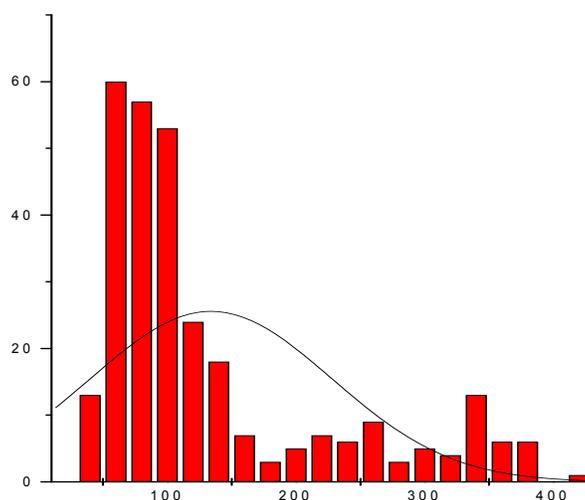
**Tabela 8:** Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ) e distribuição de tamanho das micropartículas coacervadas úmidas contendo uma mistura de oleoresina de páprica e óleo de soja.

Sistema*	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ Desvio-padrão	Distribuição de tamanho
1	$150,48 \pm 79,42^a$	

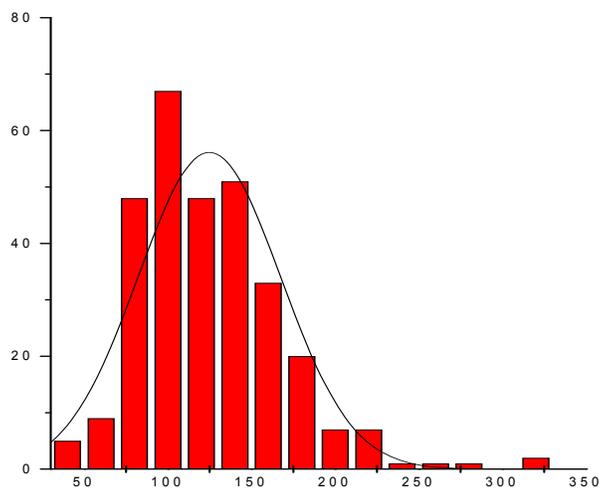
**5**       $132,97 \pm 53,47^b$



**6**       $133,99 \pm 93,66^b$



**11**       $124,77 \pm 42,65^b$



\*Sistemas de micropartículas coacervadas: **1**= 2,5% parede, 50% recheio, 6000 rpm velocidade; **5**= 2,5% parede, 50% recheio, 14000 rpm velocidade; **6**= 2,5% parede, 150% recheio, 14000 rpm velocidade; **11**= 5,0% parede, 100% recheio, 10000 rpm velocidade. Média  $\pm$  desvio-padrão. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste de Tukey.

A faixa de variação de tamanho das micropartículas produzidas no planejamento experimental foi de 124 a 150  $\mu\text{m}$  (Tabela 8), em concordância com diâmetros médios de coacervados reportados em diversos trabalhos da literatura, os quais apontam uma variação entre 10 e 800  $\mu\text{m}$ . A existência de diferentes diâmetros é o reflexo de diversos fatores, tais como: proporção entre os polímeros de parede, total de polímeros utilizados, quantidade de recheio, tamanho das gotas da emulsão (recheio + solução de gelatina), velocidade de agitação do sistema, taxa de resfriamento, forma de reticulação, secagem, entre outros (LAMPRECHT et al., 2001; MENGER et al., 2000; BACHTSI & KIPARISSIDES, 1996; NAKAGAWA et al., 2004).

### **5.3 Elaboração de micropartículas contendo óleo de salmão**

Para a elaboração das micropartículas contendo óleo de salmão, as concentrações de polímeros de parede, de recheio e velocidade para formação da emulsão foram previamente definidas através da resposta de Eficiência de Encapsulação juntamente com os aspectos morfológicos das micropartículas coacervadas produzidas no planejamento experimental, conforme explicado anteriormente ao final do item 5.2.2.1.1: soluções a 2,5% de polímeros de parede, 50% de recheio em relação ao total de material de parede utilizado e 14000 rpm de velocidade para a formação da emulsão de gelatina com o recheio.

#### **5.3.1 Caracterização das micropartículas contendo óleo de salmão**

Os percentuais de umidade e Eficiência de Encapsulação das micropartículas estão apresentados na Tabela 9. Os valores de umidade encontrados para estas micropartículas variaram entre 80 a 84,6%. A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre as micropartículas quanto às Eficiências de Encapsulação, indicando que a origem da gelatina para a formação da parede não interferiu neste resultado. Adicionalmente, comparando-

se os valores de Eficiência de Encapsulação das micropartículas contendo uma mistura de oleoresina de páprica e óleo de soja como recheio (76,24% ± 2,13 - ensaio 5 da Tabela 7) com as Eficiências de Encapsulação das micropartículas de óleo de salmão (69,9% ± 3,9 - sistema de micropartículas com parede formada por gelatina peixe do 2º lote e goma arábica da Tabela 9), verifica-se pelo teste de Tukey que houve uma pequena alteração entre elas, portanto, a mudança para o recheio de óleo de salmão parece ter afetado esta resposta. Diferenças significativas na Eficiência de Encapsulação decorrentes da mudança do tipo de lipídeo utilizado foram observadas anteriormente para o par gelatina suína – goma arábica. Entretanto, os tipos de óleos empregados foram muito diferentes quanto à hidrofobicidade e conseqüentemente produziram diferenças acentuadas na Eficiência de Encapsulação (PRATA, 2006). Por outro lado, os resultados obtidos com o óleo de salmão utilizado como recheio não indicaram diferenças significativas na Eficiência de Encapsulação para micropartículas produzidas com gelatina suína ou gelatina de peixe do 2º lote.

**Tabela 9:** Eficiência de Encapsulação e percentual de umidade das micropartículas contendo óleo de salmão.

Sistema *	Umidade (%)	Eficiência de Encapsulação (%)
MGS	83,5 ± 0,9	72,4 ± 10,6 <sup>a</sup>
MGP1	84,6 ± 0,5	59,7 ± 8,3 <sup>a</sup>
MGP2	83,0 ± 0,9	69,9 ± 3,9 <sup>a</sup>

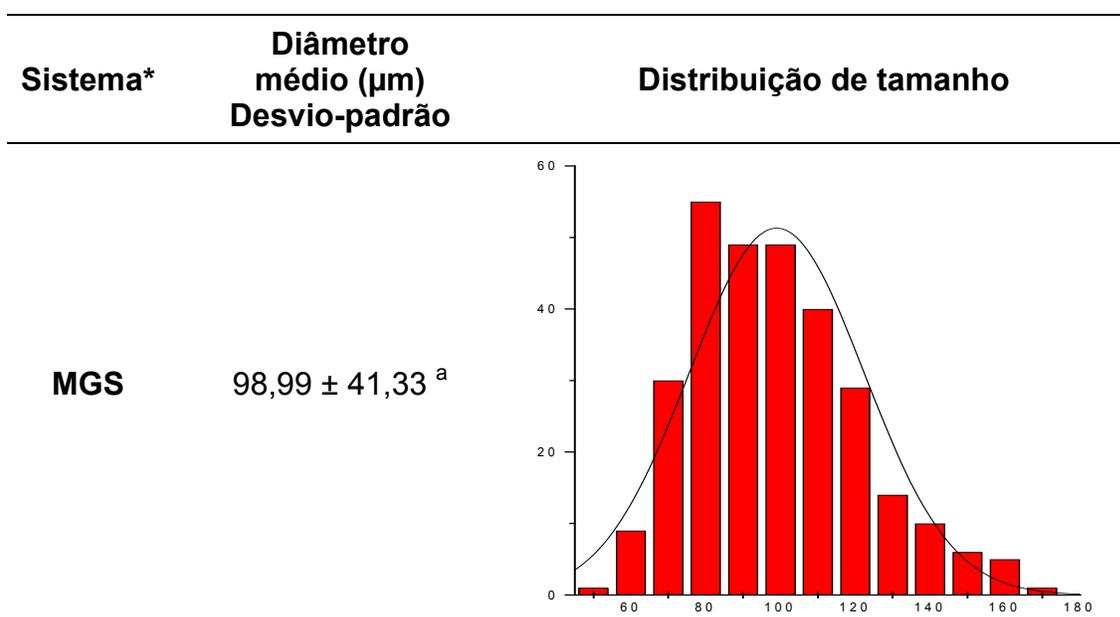
\* Os sistemas de micropartículas foram produzidos com 2,5% de parede (goma arábica e gelatina na proporção de 1:1), 50% de recheio (óleo de salmão) e 14000 rpm de velocidade para a formação da emulsão. MGS = micropartículas com parede formada por gelatina suína e goma arábica; MGP1 = micropartículas com parede formada por gelatina de peixe do 1º lote e goma arábica; MGP2 = micropartículas com parede formada por gelatina peixe do 2º lote e goma arábica. Média ± desvio-padrão. n = 3

Nota: letras iguais na mesma coluna representam que não houve diferença significativa (p<0,05) entre as médias obtidas através do teste de Tukey.

### 5.3.1.1 Diâmetro médio e distribuição de tamanho

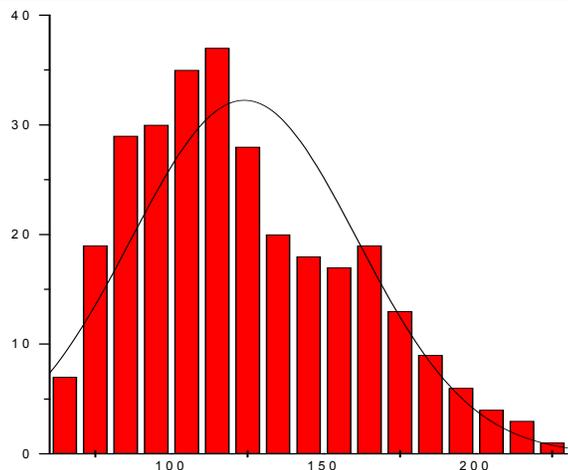
Os diâmetros médios e distribuição de tamanho das micropartículas coacervadas úmidas, e liofilizadas seguidas de reidratação em água destilada estão apresentados nas Tabelas 10 e 11. As micropartículas úmidas não apresentaram diâmetros médios diferentes significativamente entre elas, indicando que o tipo de gelatina utilizada para a formação da parede não afetou a medida. As micropartículas reidratadas apresentaram diâmetros médios semelhantes às úmidas, indicando que o processo de secagem utilizado (liofilização) permitiu o retorno próximo ao tamanho original, após a reidratação em água.

**Tabela 10:** Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ) e distribuição de tamanho das micropartículas coacervadas úmidas contendo óleo de salmão como recheio.



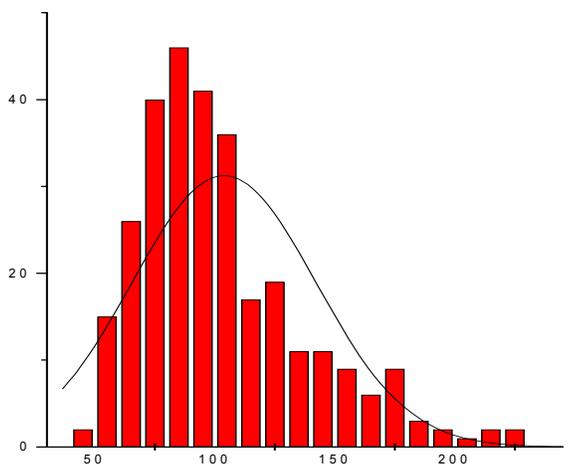
**MGP1**

$123,87 \pm 61,55^a$



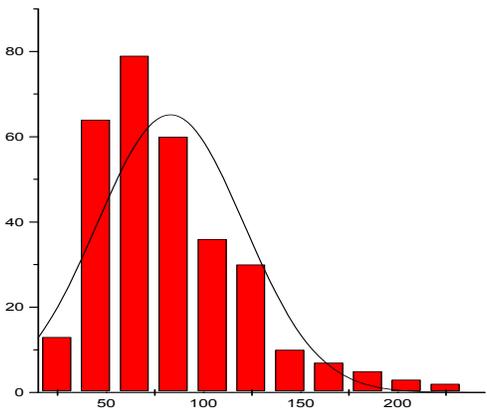
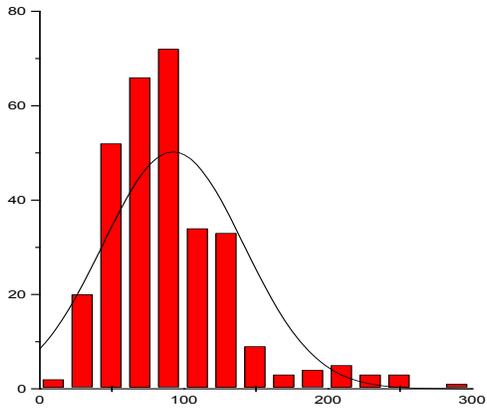
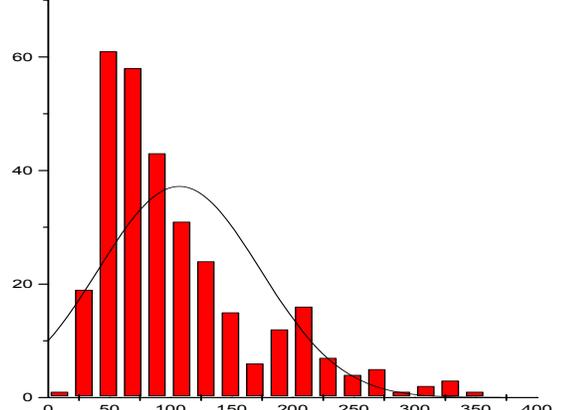
**MGP2**

$103,80 \pm 62,42^a$



\* Os sistemas de micropartículas foram produzidos com 2,5% de parede (goma arábica e gelatina na proporção de 1:1), 50% de recheio (óleo de salmão) e 14000 rpm de velocidade para a formação da emulsão. MGS = micropartículas com parede formada por gelatina suína e goma arábica; MGP1 = micropartículas com parede formada por gelatina de peixe do 1º lote e goma arábica; MGP2 = micropartículas com parede formada por gelatina peixe do 2º lote e goma arábica. Média  $\pm$  desvio-padrão. Nota: letras iguais na mesma coluna representam que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste de Tukey.

**Tabela 11:** Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ) e distribuição de tamanho das micropartículas coacervadas reidratadas, contendo óleo de salmão como recheio.

Sistema*	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) Desvio-padrão	Distribuição de tamanho
MGS	83,10 $\pm$ 37,85	
MGP1	92,63 $\pm$ 49,10	
MGP2	107,28 $\pm$ 66,27	

\*Micropartículas produzidas com as mesmas condições descritas na **Tabela 10**, porém a determinação de diâmetro médio e distribuição de tamanho foram realizadas após a reidratação das mesmas em água. Média  $\pm$  desvio-padrão.

### 5.3.1.2 Morfologia e microestrutura

As características morfológicas das micropartículas úmidas e reidratadas em água estão apresentadas nas Figuras 13 e 14. A Figura 15 apresenta a microscopia eletrônica de varredura (MEV) das micropartículas coacervadas liofilizadas.

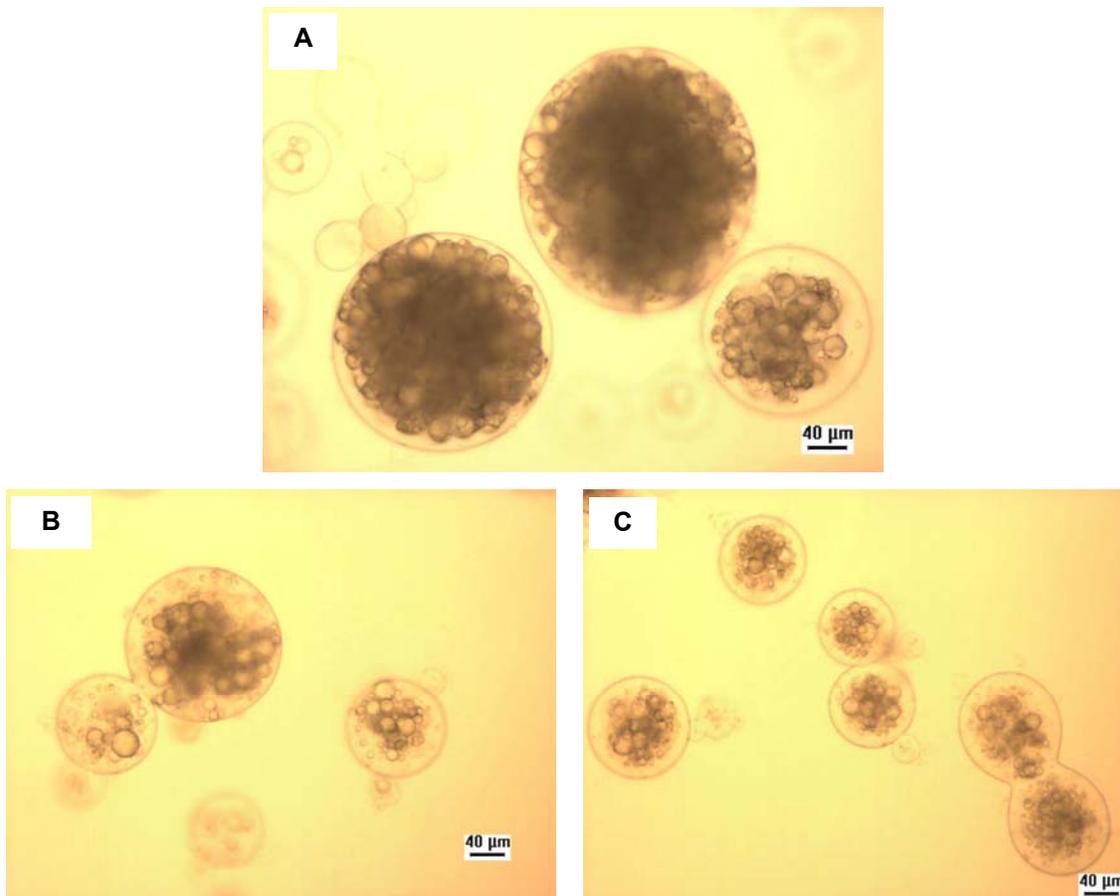
Através das imagens de microscopia ótica das Figuras 13 e 14 é possível visualizar a alteração de distribuição de recheio dentro das micropartículas, havendo algumas praticamente vazias outras bastante repletas e todas multinucleadas. Pode-se também observar uma heterogeneidade de tamanhos entre as partículas, confirmando os resultados de diâmetro médio e de distribuição de tamanho obtidos anteriormente por microscopia ótica. De modo geral, todas as partículas úmidas e reidratadas se apresentaram esféricas e aparentemente íntegras (Figuras 13 e 14), independente do tipo de gelatina utilizada para a formação da parede. Adicionalmente, pôde-se observar que o processo de liofilização das micropartículas foi adequado, pois as partículas reidratadas mantiveram sua integridade e capacidade normal de inchamento, retornando à estrutura inicial esférica muito semelhante à amostra úmida original. MUKAI-CORRÊA et al (2005) e ALVIM (2005) também observaram a boa reidratação das partículas produzidas por gelificação iônica e coacervadas respectivamente após liofilização e reidratação, com recuperação da forma original. ALVIM (2005) estudou diversas formas de secagem de coacervados e concluiu que a liofilização foi o melhor processo de secagem para coacervados sem reticulação. A técnica de *spray dryer* provocou a destruição das partículas e o uso de estufa com circulação de ar resultou na formação de um filme contínuo, duro e quebradiço de partículas, que ficaram aderidas umas às outras.

Foi adotada a forma de congelamento lento (a  $-18^{\circ}\text{C}$  em freezer) previamente à liofilização. O passo de congelamento é de fundamental importância por determinar a estrutura dos cristais formados (DAWSON & HOCKLEY, 1991). O congelamento rápido acontece de maneira descontrolada e provoca o crescimento de cristais de gelo não uniformes causando, assim, uma

heterogeneidade de poros (O'BRIEN et al., 2004). ALVIM (2005), PRATA (2006) e DAWSON & HOCKLEY (1991), examinaram por microscopia eletrônica de varredura a estrutura de preparações liofilizadas após a variação da taxa de congelamento das amostras e puderam concluir que o congelamento lento permitiu a obtenção de estruturas mais lisas. Já o congelamento rápido provocou a formação de muitos poros da superfície ao interior das partículas.

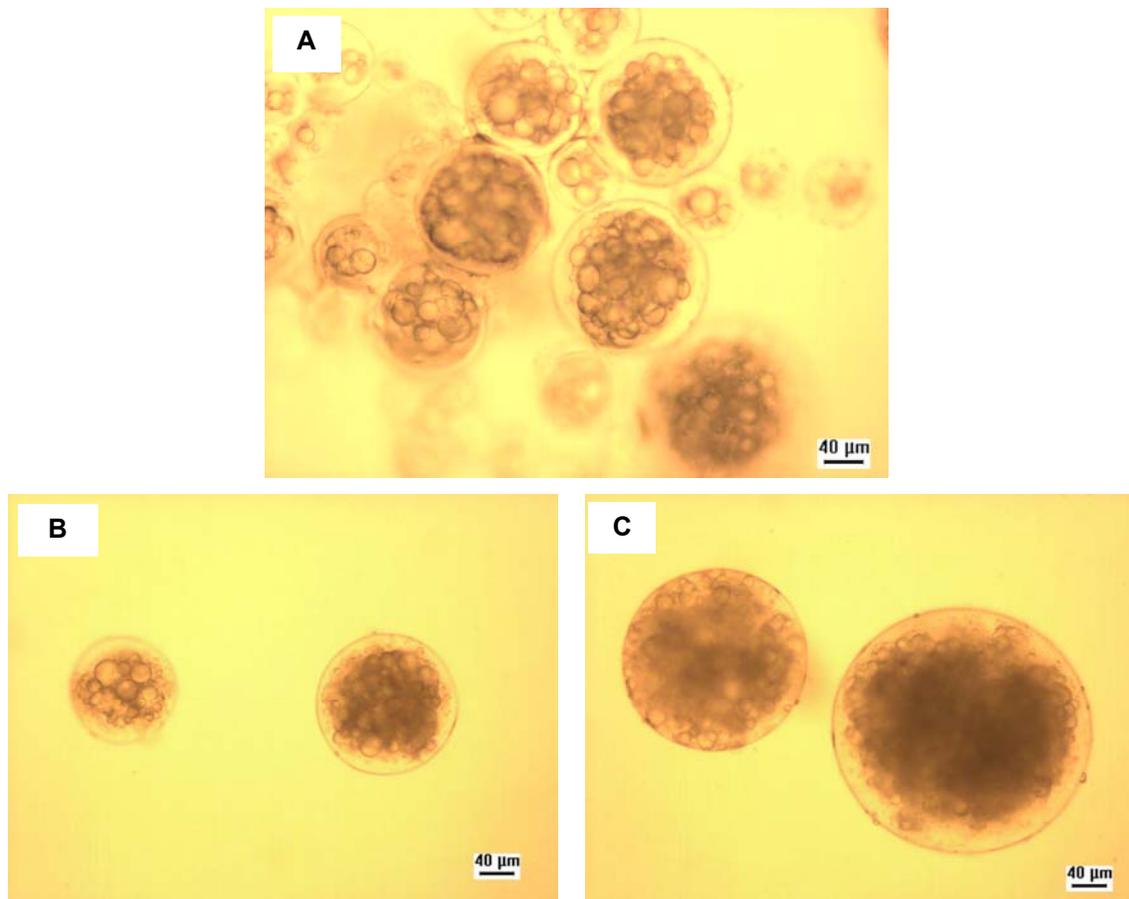
Após a liofilização das micropartículas, todas elas apresentaram tendência à aglomeração (Figura 15). As partículas produzidas com gelatina de peixe do 1º lote ficaram aparentemente um pouco mais aglomeradas, o que pode ter sido decorrência da porcentagem de lipídeos ligeiramente maior observada neste lote.

Pela observação das imagens de microscopia eletrônica de varredura na Figura 15, verificou-se que independente da gelatina utilizada para a formação da parede, a liofilização resultou na obtenção de amostras compostas por partículas com paredes contínuas, lisas, sem rachaduras evidentes, que embora estivessem conectadas entre si através de pontes sólidas nas suas superfícies, mantiveram a esfericidade. ALVIM (2005) e PRATA (2006) também observaram pontes sólidas entre unidades individuais coacervadas e liofilizadas.

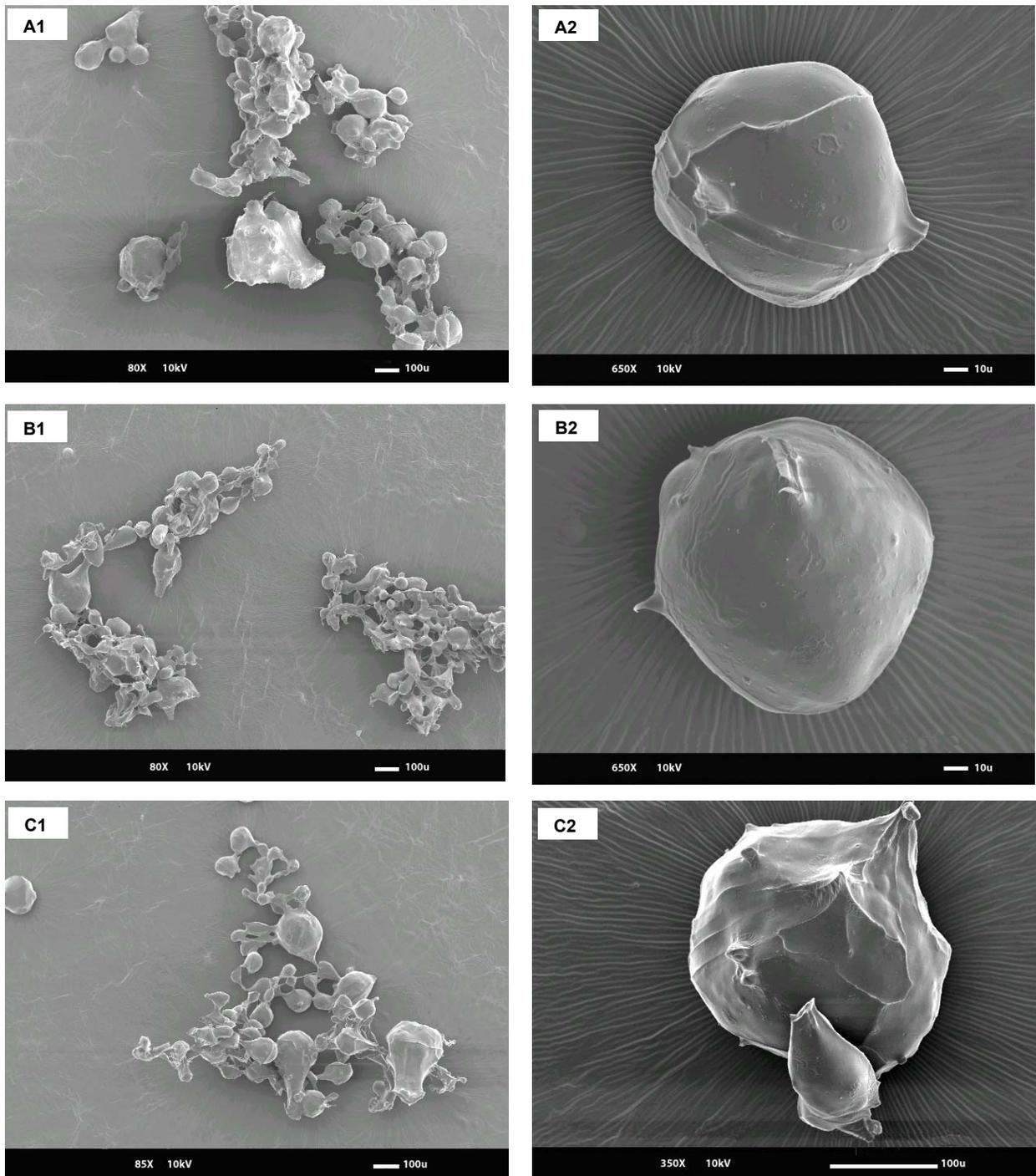


**Figura 13:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas úmidas produzidas com as seguintes condições: 14000 rpm de velocidade para a formação da emulsão, 2,5% de parede contendo a proporção de 1:1 p/p de gelatina: goma arábica e 50% de recheio (óleo de salmão).

A: MGS - Micropartículas contendo parede formada por goma arábica e gelatina suína comercial; B: MGP1 - Micropartículas contendo parede formada por goma arábica e gelatina de peixe do 1º lote; C: MGP2 - Micropartículas contendo parede formada por goma arábica e gelatina de peixe do 2º lote. Barras = 40 µm. Meio de captação: água.



**Figura 14:** Imagens obtidas por microscopia ótica de micropartículas coacervadas liofilizadas seguidas de reidratação em água, produzidas com as mesmas condições descritas na Figura 13. A: MGS - Micropartículas contendo parede formada por goma arábica e gelatina suína comercial; B: MGP1 - Micropartículas contendo parede formada por goma arábica e gelatina de peixe do 1º lote; C: MGP2 - Micropartículas contendo parede formada por goma arábica e gelatina de peixe do 2º lote. Barras = 40µm. Meio de captação: água.



**Figura 15:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de micropartículas coacervadas liofilizadas produzidas com as mesmas condições descritas na Figura 13. A: MGS - Micropartículas contendo parede formada por goma arábica e gelatina suína comercial (A1 barra = 100µm; A2 barra = 10 µm); B: MGP1 - Micropartículas contendo parede formada por goma arábica e gelatina de peixe do 1º lote (B1 barra = 100 µm; B2 barras = 10 µm); C: MGP2 - Micropartículas contendo parede formada por goma arábica e gelatina de peixe do 2º lote (C1, C2 barras = 100 µm).

## 6. CONCLUSÕES

De forma geral, o segundo lote de gelatina de peixe apresentou valores de força de gel e de ponto de fusão bastante similares aos da gelatina suína comercial, porém superiores aos do primeiro lote em decorrência da existência de um conteúdo lipídico relativamente maior na gelatina do primeiro lote.

Através do perfil eletroforético das gelatinas, observou-se que os dois lotes de gelatina de peixe não apresentaram diferenças nas suas distribuições de massas molares, indicando que o processo de extração se repetiu, produzindo bandas eletroforéticas bem definidas quanto à massa molar em comparação à gelatina suína comercial, que apresentou ampla e difusa distribuição de massas molares.

Os resultados do planejamento experimental para a elaboração de micropartículas permitiram concluir que a velocidade de agitação de 14000 rpm para formação da emulsão, 2,5% de concentração de polímeros de parede e 50% de recheio foram as melhores condições para a produção das micropartículas, considerando-se a eficiência de encapsulação e a análise morfológica.

As micropartículas se apresentaram esféricas com recheio disposto de forma multinucleada e distribuição unimodal com relação ao tamanho de micropartículas. Aumento na concentração do material de parede prejudicou a morfologia acarretando perda da esfericidade das micropartículas e o aumento da concentração de recheio ( $\geq 50\%$ ; peso do recheio em relação ao peso total do material de parede) resultou em diminuição da eficiência de encapsulação.

O processo de secagem por liofilização foi adequado para as micropartículas coacervadas que, após a reabsorção de água, retornaram ao tamanho e formato esférico original e mantiveram-se aparentemente íntegras.

A substituição da gelatina suína comercial pela gelatina de peixe para a elaboração da parede de micropartículas coacervadas não alterou significativamente os valores de eficiência de encapsulação e de diâmetro médio. Tanto as micropartículas de gelatina suína quanto as de peixe apresentaram-se

esféricas, multinucleadas, com paredes lisas, contínuas e sem rachaduras evidentes.

A substituição do recheio de oleoresina de páprica + óleo de soja pelo óleo de salmão não provocou alterações de morfologia das micropartículas, que permaneceram esféricas e com as paredes íntegras. É possível substituir gelatina suína comercial por gelatina de pele de tilápia e oleoresina de páprica + óleo de soja por óleo de salmão, na produção de micropartículas por coacervação complexa ricas em ômega 3 e com uma possível maior atratividade na alimentação de larvas de peixes, sem perdas significativas na eficiência de encapsulação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists), Official methods of analysis, 16<sup>th</sup> ed., Arlington, v.1-2, 1998.

ADEODATO, S. Peles exóticas e ecológicas. Globo Ciência, v.51, p.56-60, 1995.

AEWSIRI, T., BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W; TANAKA, M. Chemical compositions and functional properties of gelatin from pre-cooked tuna fin. International Journal of Food Science and Technology, v. 43, p. 665-693, 2008.

ALCESTE, E.; JORY, D. E. World tilapia farming 2002. In: Aquaculture Magazine, may/june, p. 39-45, 2002.

ALMEIDA, R.R. A pele de peixe tem resistência e flexibilidade? Revista do Couro, v.127, p.49-53, 1998.

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

ANDREEVA, A.P. Thermostability of cutaneous collagen of some species and subspecies of the cod family. Tsitologiya, v. 13, p. 1004-1008, 1971.

ANTONOV, Y. A.; ZUBOVA O. M. Phase state of aqueous gelatin-polysaccharide (1) polysaccharide (2) systems. International Journal Biology Macromolecular, v. 29, p. 67-71, 2001.

ARNESEN, J.A.; GILDEBERG, A. Extraction and characterization of gelatin from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 53-57, 2007.

ARSHADY, R. Microcapsules for food. *Journal of Microencapsulation*, v. 10, n.4, p. 413-435, 1993.

BABEL, W. Gelatine – a versatile biopolymer. *Chemie in unserer Zeit*, 06.98; Information from Deutsche Gelatine – Fabriken Stoess AG, 10p, 1996.

BACHTSI, A.R.; KIPARISSIDES, C. Synthesis and release studies of oil containing poly (vinyl alcohol) microcapsules prepared by coacervation. *Journal of Controlled Release*, v. 38, p. 49, 58, 1996.

BAKAN, J. A. Microencapsulation of foods and related products. *Food Technology*. Chicago, p. 34-44, 1973.

BARD, J. Piscicultura intensiva das tilápias. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.6, n.67, p. 24-29, 1980.

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

BERTAN, L. C. Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e complexos à base de gelatina, ácidos graxos e breu branco. *Dissertação*. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 157p., 2003.

BINSI, P.K.; SHAMASUNDAR, B.A.; DILEEP, A.O.; BADI, F.; HOWELL, N.K. Rheological and functional properties of gelatin from the skin of Bigeye snapper (*Priacanthus hamrur*) fish: influence of gel on the gel forming ability of fish mince. *Food Hydrocolloids*, doi:10.1016/j.foodhyd2007.12.004, 2007.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry Physiology*, v. 46, n. 1, p. 31-37, 1959.

BORGES, P.; PINO, J.A.; FERNÁNDEZ, N. Obtención de oleoresina de pimenton dulce. Evaluación de solventes de extracción. *Alimentaria*, Octubre, p. 59-60, 1997.

BRAZEL, C.S. Microencapsulation: Offering solutions in the food industry. *Cereal Foods World*, v. 44, p. 388-393, 1999.

BUFFO, R. A.; REINECSIUS, G. A.; OEHLERT, G. W. Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acacia in beverage emulsions. *Food Hydrocolloids*, v. 15, n. 1, p. 53-66, 2001.

BURGESS D.J.; PONSART S. Beta-glucuronidase activity following complex coacervation and spray drying microencapsulation. *Journal of Microencapsulation*, v. 15, n. 5, p. 569-579, 1998.

BURGESS, D. J. Practical analysis of complex coacervate systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 140, n.1, p. 227-238, 1990.

BURGESS, D.J. Complex coacervation: microcapsule formation. In *Macromolecular complexes in chemistry and biology*. Springer-Verlag: Berlim, cap. 17, p. 285-325, 1994.

BURGESS, D.J.; CARLESS, J.E. Microelectrophoretic studies of gelatin and acacia for the prediction of complex coacervation. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 98, n. 1, p. 1-8, 1984.

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

CARVALHO, R. A. Elaboração e caracterização de filmes a base de gelatina modificada enzimática e quimicamente. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP, 227p, 2002.

CASTILLO CAMPO, L. F. Tilápia Roja 2006: una evolución de 25 años, de la incertidumbre al éxito, 124p, 2006.

CHEN, B. H-Y.; MORR, C.V. Solubility and foaming properties of phytate-reduced soy protein isolate. *Journal of Food Science*, v. 50, 1985.

CHIOU, BON-SEN; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; SHEY, J.; YEE, E.; BECHTEL, P.J.; IMAM, S.H.; GLENN, G.M.; ORTS, W.J. Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins. *Polymer* v. 47, p. 6379-6386, 2006.

CHO S.M.; GU Y.S.; KIM S.B.; Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 221-229, 2005.

CHOI S. S.; REGENSTEIN J. M.; Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. *Journal of Food Science*, v. 65, p. 194-199, 2000.

DAWSON, P.J.; HOCKLEY, D.J. Scanning electron microscopy of freeze-dried preparations: Relationship of morphology and freeze-drying parameters. *Developments in Biological Standardization*, v. 74, p. 185-192, 1991.

DHOOT, N. O. Microencapsulation for therapeutic applications. último acesso 20/08/2006 em [http://dspace.library.drexel.edu/retrieve/47/dhoot\\_thesis.pdf](http://dspace.library.drexel.edu/retrieve/47/dhoot_thesis.pdf)

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influences on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, v. 17, p. 25-39, 2003.

DICKINSON, E.; PAWLOWSKI, K. Effect of i-carrageenan on flocculation, creaming, and rheology of a protein-stabilized emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, p. 3799-3806, 1997.

DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIER, P.; POPINEAU, Y.; BOURY, F. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 232, n. 2-3, p. 239-247, 2004.

EL-SAYED, A.-F.M. *Tilapia Culture*. Cambridge: Cambridge University, 277 p, 2006.

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

FERNÁNDEZ-DÍAZ, M.D.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatin. *Food Hydrocolloids*, v. 17, p. 281-286, 2003.

FITZSIMMONS, K. The most important aquaculture species of the 21 century. In: FITZSIMMONS, K. E CARVALHO FILHO, J. (Eds.) *Proceedings from the fifth international symposium on tilapia aquaculture*. Rio de Janeiro: Panorama da Aquicultura Magazine, p. 3-8, 2000.

FOEGEDING, E.A.; LANINER, T.C.; HULTIN, H.O. (1996). Collagen. In: *Food Chemistry*, 3<sup>rd</sup> edition (edited by O.R. Fennema), p. 902-906. New York, NY: Marcel Dekker.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2007. United Nations Fishery Information, Data and Statistics Unit (FIDI). <http://www.fao.org/figis/servlet/static>

FURUYA, W. M.; SILVA, L. C. R; HAYASHI, C.; FURLAN, A. C.; NEVES, P. R.; BOTARO, D.; SANTOS, V. G. Substituição do milho pela silagem de sorgo com alto e baixo teor de tanino em dietas para juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 25, n. 2, p. 243-247, 2003.

GALAZKA, V. B.; SMITH, D.; LEDWARD, D. A.; DICKINSON, E. Complexes of bovine serum albumin with sulfated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. *Food Chemistry*, v. 64, p. 303-310, 1999.

GALLI, L.F.; TORLONI, C.E.C. Criação de peixes. 3. ed. São Paulo: Nobel, 118p, 1986.

GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 50, p. 213-224, 1999.

GILSENAN, P.M.; ROSS-MURPHY, S.B. Rheological characterization of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, v. 14, p. 191-195, 2000.

GIMÉNEZ B.; TURNAY J.; LIZARBE M.A.; MONTERO P.; GÓMEZ-GUILLÉN M.C.; Use of lactic acid for extraction of fish skin gelatin. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 941-950, 2005a.

GIMÉNEZ B.; GÓMEZ-GUILLÉN M.C.; MONTERO P.; The role of salt of fish skins in chemical and rheological properties of gelatin extracted. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 951-957, 2005b.

GIMÉNEZ B.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, P. Storage of dried fish skins o quality characteristics of extracted gelatin. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 958-963, 2005c.

GODWIN, J. T.; SOMERVILLE, G. R. Physical methods for preparing microcapsules in: *Microencapsulation: Processes and Applications*. VANDERGAER. J. E. ed Plenum Press, New York, p.1-20, 1974.

GOMEZ-GUILLÉN M.C.; TURNAY J., FERNANDEZ-DIAZ M.D.; ULMO N. LIZARBE M.A.; MONTERO P. *Food Hydrocolloids*, v. 34, p. 16-25, 2002.

GÓMEZ-GUILLÉN M.C.; TURNAY J.; FERNÁNDEZ-DIÁZ M.D.; ULMO N.; LIZARBE M.A.; MONTERO P.; Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, v. 16, p. 25-34, 2002.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO P. Extraction of gelatin from Megrim (*Lepidorhombus boscii*) skins with several organic acids. *Food Chemistry and Toxicology*, v. 66, n .2, p. 213-216, 2001.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; IHL, M.; BIFANI, V.; SILVA, A.; MONTERO, P. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). *Food Hydrocolloids*, doi:10.1016/j.foodhyd.2006.08.006, 2006.

GONZÁLEZ, J.E.; MATEO, M.M.; CASTELLANOS, R.V.; AMO SAUS, M.; GÓMEZ LADRÓN de GUEVRA, R. Evaluación de la calidad de pimentones procedentes de variedades seleccionadas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Alimentaria*, Octubre, p. 81-84, 1997.

GROSSMAN, S.; & BERGMAN, M. Process for the production of gelatin from fish skins. US Patent 5,093,472 (1992).

GUDMUNDSSON M.; HAFSTEINSSON H.; Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *Journal of Food Science*, v. 62, p. 37-39, 1997.

GUDMUNDSSON M.; Rheological properties of fish gelatins. *Journal of Food Science*, v. 67, p. 2172-2176, 2002.

GUSTAVSON, K.H. Hydrothermal stability and intermolecular organization of collagen from mammalian and teleost skin. *Svensk Kem. Tidskr*, v. 65, p. 70-77, 1953.

HJALTASON, B. New frontiers in the processing and utilization of fish oil, in Somogyi J.C and Muller H.R. *Nutritional Impact of Food Processing. Bibl Nutr Dieta* n. 43, Basel, Karger Publishin, p. 96-106, 1989.

HARALDSSON G.G.; HJALTASON, B. Fish oils as sources of polyunsaturated fatty acids, in Gunstone F.D. *Structured and modified lipids*, New York, Marcel Dekker, Inc., p. 313-350, 2001.

HASHIDZUME, A.; OHARA, T.; MORISHIMA, Y. Coacervation of Hydrophobically Modified Polyanions by Association with Nonionic Surfactants in Water. *Langmuir*, v. 18, p. 9211-9218, 2002.

HAUG J.I.; DRAGET I.K.; SMIDROD O.; Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, v. 18, p. 203-213, 2004.

HAUMANN, B.F. Alternative sources for n-3 fatty acids. *Inform*, v. 9, p. 1108-119, 1998.

HEGER, R. Release kinetics/mechanism in: Microencapsulation of Food Ingredients, VILSTRUP, P. Heatherhead publishing, 55-75, 255p, 2001.

HENDERSON, R.J. The production of n-3 polyunsaturated fatty acids in marine organisms. Lipid Technol., v. 11, p. 5-10, 1999.

HOINACKI, E. Peles e couro: origens, defeitos e industrialização. 2.ed. Porto Alegre: CFP de Artes Gráficas "Henrique d'Ávila Bertaso", 319p, 1989.

HOLZER, D.. inventor. Gelatin production. U.S Patent 5,484,888 (1996).

HORNERO-MENDEZ, D.; MINGUEZ-MOSQUERA, M.I. Rapid spectrophotometric determination of red and yellow isochromic carotenoid fractions in paprika and red pepper oleoresins. Journal Agricultural and Food Chemistry, v. 49, p. 3584-3588, 2001.

IJICHI, K.; YOSHIKAWA, H.; UEMURA, Y.; HATATE, Y. Multi-layered gelatin/Acacia microcapsules by complex coacervation. Journal of Chemical Engineering of Japan, v. 30, n. 5, p. 793-798, 1997.

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

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

JAMILAH, B.; HARVINDER, K.G. Properties of gelatins from skins of fish – black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). Food Chemistry, v. 77, p. 81-84, 2002.

JENNING V.; SCHAFER-KORTING M.; GOHLA S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for tropical use: drug release properties. *Journal of Controlled Release*, v. 66, p. 115-126, 2000.

JIZOMOTO, H.; KANAOKA, E.; SUGITA, K.; HIRANO, K. Gelatin-Acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic drugs and ready disintegration in the gastrointestinal tract. *Pharmaceutical Research*, v. 10, n. 8, p. 115-122, 1993.

JOHNSTON-BANKS, F.A. Gelatin. In: *Food gels* (edited by P. Harris). London: Elsevier Applied Science, p. 233-289, 1990.

JOLY-DUHAMEL, C., HELLIO, D., AJDARI, A., & DJABOUROV, M. All gelatin networks: 2. The master curve for elasticity. *Langmuir*, v. 18, p. 7158-7166, 2002.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. *Food hydrocolloids*, v. 20, p. 1216-1222, 2006.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JOAZEIRO, P.P.; MONTES, G.S. et al. The collagen fiber architecture of Brazilian naked skin. *Brazilian Journal Medicinal Biological Research*, v.16, p.313-316, 1983.

KAREL, M. Encapsulation and controlled release of food components in: *Biotechnology and Food Processes Engineering*. Schwartzberg, H. G.; RAO, M. A. Eds IFT Basic Symposium Series. Marcel Dekker, p.277-293, 1990.

KOŁODZIESJSKA, I., KACZOROWSKI, K.; PIOTROWSKA, B.; SADOWSKA, M. Modification of the properties of gelatin from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) with transglutaminase. Food Chemistry, v. 86, p. 203-209, 2004.

KOŁODZIESJSKA, I., SKIERKA, E., SADOWSKA, M., KOŁODZIEJSKI, W., NIECIKOWSKA, C. Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. Food Chemistry, p. 700-706, 2008.

KRUIF, C. G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. Food Hydrocolloids, v. 15, p. 555-563, 2001.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage. Nature, v. 227, p. 680, 1970.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, C. M. Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for  $\omega$ -3 unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. Journal of Microencapsulation, v. 18, n.3, p. 347-357, 2001.

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

LANGDON, C. J.; BUCHAL, M. A. Comparison of lipid-walled microcapsules and lipid spray beads for the delivery of water-soluble, low-molecular-weight materials to aquatic animal. Aquaculture Nutrition, v. 4, p. 275-284, 1998.

LAU, M.H.; TANG, J.; PAULSON, A.T. Texture profile and turbidity of gellan / gelatin mixed gels. *Food Research International*, v. 33, p. 665-671, 2000.

LE HÉNAFF, S. Microparticules de complexes de protéines de lactosérum et de xanthane comme substitut de matière grasse. Mémoire de maîtrise, 1996, Université Laval, Québec.

LEE, S. J.; ROSENBERG, M. Whey protein-based microcapsules prepared by double emulsification and heat gelation. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v. 33, p. 80-88, 2000.

LEONHARDT, J. H. Efeito da reversão sexual em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757), 128 p, 1997. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

LEUENBERGER B.H.; Investigation of viscosity and gelation properties of different mammalian and fish gelatins. *Food Hydrocolloids*, v. 5, p. 353-361, 1991.

LUND, V. X. ; FIGUEIRA, M. L. O. Criação de tilápias. São Paulo: Livraria Nobel, 63 p, 1989.

MACEDO-VIEGAS, E.M., SOUZA, M.L.R., KRONKA, S.N. Estudo da carcaça de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em quatro categorias de peso. *Revista UNIMAR*, v.19, n.3, p.863-870, 1997.

MARSHALL, M.C.; WELLINGHOFF, S.; BRAZEL, C.; ALEXANDER, M.; AKATAGAWA, S. Controlled delivery of pesticides through synthetic biodegradable polymer compositions, in H. Scher, ed. *Controlled release delivery systems for pesticides*, New York: Marcel Dekker, Inc., p. 363-394, 1999.

MENGER, F. M.; PERESYPKIN, A. V.; CARAN, K. L.; APKARIAN, R.P.A. Sponge Morphology in an Elementary Coacervate. *Langmuir*, v. 16, p. 9113-9116, 2000.

MENGER, F.M.; SYKES, B.M. Anatomy of a coacervate. *Langmuir*, v. 14, p. 4131-4137, 1998.

MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Extracting conditions for Megrim (*Lepidorhombus boscii*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. *Journal of Food Science*, v. 65, p. 434-438, 2000.

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.

MUYONGA J.H.; COLE, C.G.B.; DUODU, K.G. Extraction and physico-chemical characterization of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*, v. 18, n. 4, p. 581-592, 2004.

NACAGAWA, K.; IWAMOTO, S.; NAKAJIMA, M.; SHONO, A.; SATOB, K. Microchannel emulsification using gelatin and surfactant-free coacervate microencapsulation. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 278, p. 198-205, 2004.

NEBEL, R.L.; SAACKE, R.G. Technology and applications for encapsulated spermatozoa. *Biotechnology Advances*, v. 12, n. 1, p. 41-48, 1994.

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

NORI, M. A. Ingredientes e aditivos microencapsulados na indústria de alimentos. Engenharia de Alimentos. São Paulo 1, p. 33-34, 1996.

NORLAND, R.E. In M. N. Voigt, & J. K. Botta (Eds.), Fish gelatin. Advances in fisheries and biotechnology for increased profitability, Lancaster: Technomic; p. 325-333, 1990.

O'BRIEN, F.J.; HARLEY, B.A.; YANNAS, I.V.; GIBSON, L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. Biomaterials, v. 25, n. 6, p. 1077-1086, 2004.

OCKERMAN, H.W.; HANSEN, C.L. Animal by-product processing and utilization. Technomic Publishing, Lancaster, USA, 2000.

ONAL, U.; LANGDON, C. Characterization of lipid spray beads for delivery of glycine and tyrosine to early marine fish larvae. Aquaculture, v. 233, n. 1-4, p. 495-511, 2004a.

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

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

OSBORNE, R.; VOIGT, M.N.; & HALL, D.E. Utilization of lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) carcasses for the production of gelatin. In M.N. Voigt, & J.K. Botta, Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability, p.143-150. Lancaster: Technomic Publishing Co.

OSMAN, M.E.; WILLIAMS, P.A.; MENZIES, A.R.; PHILLIPS, G.O. Characterization of commercial samples of gum Arabic. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 41, n. 1, p. 71-77, 1993.

OSUNA-GARCIA, J.A.; WALE, M.M.; WADDELL, C.A. Natural antioxidants for preventing color loss in stored paprika. *Journal of Food Science*, v. 62, n. 5, p. 1017-1021, 1997.

PEDROZA-ISLAS, R.; ALVARES-RAMIREZ, J.; VERNON-CARTER, E. J. Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation – II. Dissolution and floatability kinetics as selection criteria. *Food Research International*, v. 33, p. 119-124, 2000.

PIEZ, K. A., & GROSS, J.G. The amino acid composition of some fish collagens: The relation between composition and structure. *Journal of Biological Chemistry*, v. 235 (4), p. 995-998, 1960.

POPMA, T.; MASSER, M. Tilapia: life history and biology. Auburn, Southern Regional Aquaculture Center publication, n. 283, 4 p, 1999.

POPPE, J. Gelatin, In: Thickening and gelling agents for food, New York, Ed. Incompability of proteins. *Food Hydrocolloids*, v. 11, p. 171-180, 1997.

POPPEWELL, L.M.; BLACK, J.M.; NORRIS, L.M.; PORZIO, M. Encapsulation system for flavors and colors. *Food Technology*, v. 49, p. 76-82, 1995.

POTHAKAMURY, U. R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science & Technology*, v. 6, p. 397-406, 1995.

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

RANDALL, R.C.; PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. Fractionation and characterization of gum from *Acacia Senegal*. Food Hydrocolloids, v. 3, n.1, p. 65-75, 1989.

RÉ, M. I. Microencapsulação em busca de produtos inteligentes. Último acesso 22/08/2003 em <http://www2.uol.com.br/ciencia/hoje/chmais/pass/ch162/microcap.pdf>

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

REMUNAN-LOPEZ, C.; BODMEIER, R. Effect of formulation and process variables on the formation of chitosan-gelatin coacervates. International Journal of Pharmaceutics, v. 135, n.1-2, p. 63-72, 1996.

RODRIGUES-HUEVO, M E.; PEDROZA-ISLAS, R.; PRADO-BARRAGAM, L. A.; BERISTAIN, C. I.; VERNON-CARTER, EJ. Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. Journal of Food Science, v. 69, p.351-359, 2004.

SADOWSKA, M.; KOLODZIEJSKA, I.; NIECIKOWSKA, C. Isolation of collagen from skins of Naltic cod (*Gadus morhua*). Food Chemistry, v. 81, p. 257-262, 2003.

SARABIA, A.I.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, P. The effect of added salts on the viscoelastic properties of fish skin gelatin. Food Chemistry, v. 70, p. 71-76, 2000.

SCHIMITT, C.; SANCHEZ, C.; THOMAS, F.; HARDY, J. Complex coacervation between beta-lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. Food Hydrocolloid, v. 13, n. 6, p. 483-496, 1999.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 38, p. 689-753, 1998.

SCHULER, P. Natural antioxidants exploited commercially, in Hudson B.J.F. *Food Antioxidants*, London, Elsevier Applied Science, p. 99-170, 1990.

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

SHELKE, K. Hidden ingredients take cover in a capsule, available at: [www.foodprocessing.com/articles/2005/421.html](http://www.foodprocessing.com/articles/2005/421.html), 2005.

SIMS, T.J., BAILEY, A. J., & FIELD, D. S. The chemical basis of molecular weight differences in gelatins. *The Imaging Science Journal*, v. 45, p. 171-177, 1997.

SINGH, O. N.; BURGESS, D. J. Characterization of albumin-alginic acid complex coacervation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 41, p. 670-673, 1989.

SINKO, P.; KOHN, J. Polymeric Drug Delivery Systems: An Overview. Cap2 In. *Polymeric Delivery Systems: Properties and Applications*, p.18-41, El-Nokaly, MA.; Piatt, D. M.; Charpentier, B. A. American Chemical Society, Washington, 1993.

SONGCHOTIKUNPAN, P.; TATTIYAKUL, J.; SUPAPHOL, P. Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. *International Journal Biological Macromolecules*, v. 42, p. 247-255, 2008.

SOUZA, M.L.R. Processamento do filé e da pele da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*): aspectos tecnológicos, composição centesimal, rendimento, vida útil do filé defumado e testes de resistência da pele curtida. 169p. Jaboticabal, 2003a. Tese (doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista.

SOUZA, M.L.R., LIMA, S., FURUYA, W.M., PINTO, A.A., LOURES, B.T.R.R.L., POVH, J.A . Estudo de carcaça do bagre africano (*Clarias gariepinus*) em diferentes categorias de peso. Acta Scientiarum, v. 21, p. 637-644, 1999.

SOUZA, M.L.R., MACEDO-VIEGAS, E.M. Comparação de quatro métodos de filetagem utilizado para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre o rendimento do processamento. Infopesca International, v. 7, p. 26-31, 2001.

SOUZA, M.L.R.; CASACA, J.M.; FERREIRA, I.C.; GANECO, L.N.; NAKAGKI, L.S.; FARIA, R.H.S; MACEDO-VIEGAS, E.M.; RIELH, A. Histologia da pele e determinação da resistência do couro da tilápia do Nilo e carpa espelho. Revista do Couro, Estância Velha, n. 159, p. 32-40, 2002.

SOUZA, M.L.R.; DOURADO, D.M.; MACHADO, S.D.; BUCCINI, D.F.; JARDIM, M.I.A.; MATIAS, R.; CORREIA, C.; FERREIRA, I.C. Análise da Pele de Três Espécies de Peixes: Histologia, Morfometria e Testes de Resistência R. Bras. Zootec, v. 32, n. 6, p. 1551-1559, 2003b.

SPARKS, R. E. Microencapsulation. In “Encyclopedia of Chemical Technology” ed. Kirk-Othemer. 3<sup>rd</sup> ed, v. 15, p. 470. John Willey and Sons, Inc., New York, 1981.

STAINSBY, G. Gelatin Gels. In A. M. Pearson, T. R. Dutson, & A.J. Bailey (Eds.), Advances in Meat Research, v. 4, p. 209-222. Collagen as a Food. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1977.

STAINSBY, G. Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides. *Food Chemistry*, v. 6, p. 3-14, 1980.

STATSOFT, INC. Statistica for Windows, Computer Program Manual, Tulsa, 1995. Catalogue.

STOTT, P. W.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B.B. W. Characterization of complex coacervates of some tricyclic antidepressants and evaluation of their potential for enhancing transdermal flux. *Journal of Controlled Release*, v. 41, p. 215-227, 1996.

STRAUSS, G.; GIBSON S. M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids*, v. 18, p. 81-89, 2004.

THIES, C. Chapter 5: Complex Coacervation. How to make Microcapsules – Lecture and Laboratory Manual. 1995.

TOLSTOGUZOV, V. Thermodynamic aspects of dough formation and functionality. *Food Hydrocolloids*, v. 11, p. 181-193, 1997.

TOLSTOGUZOV, V. Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, v. 17, p. 1-23, 2003.

TORRE, M.L.; FAUSTINI, M.; NORBERTI, R.; STACCHEZZINI, S.; MAGGI, L.; MAFFEO, G.; CONTE, U.; VIGO, D. Boar semen controlled delivery system: storage and in vitro spermatozoa release. *Journal of Controlled Release*, v. 85, n. 1-3, p. 83-89, 2002.

TURGEON, S. L.; BEAULIEU, M.; SCHIMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and

structural aspects. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 8, p. 401-414, 2003.

VANDERGAER, J.E. Encapsulation by coacervation in: *Microencapsulation: processes and applications*. VANDERGAER, J.E. ed Plenum Press, New York, p.1-20, 1974.

VASILIU, S.; POPA, M.; RINAUDO, M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. *European Polymer Journal*, v. 41, p. 923-932, 2005.

VEISS A. 1964. The gelatin-collagen transition. In: Veis A, editor. *Macromolecula Chemistry of Gelatin*. New York: Academic Press, p.261-270, 1964.

VIDOTTI, R.M.; GONÇALVES, G.S. Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de tilápia e sua utilização na alimentação animal. Instituto de Pesca. Disponível em: [www.pesca.sp.gov.br](http://www.pesca.sp.gov.br) em out. 2006.

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

WANG, Y.; KIMURA, K.; DUBIN, P. L.; JAEGER, W. Polyelectrolyte-Micelle Coacervation: Effects of Micell Surface Charge Density, Polymer Molecular Weight, and Polymer/Surfactant Ratio. *Macromolecules*, v. 33, p. 3324-3331, 2000.

WANG, Y.; KIMURA, K.; HUANG, Q.; DUBIN, P. L.; JAEGER, W. Effects of Salt on Polyelectrolyte-Micelle Coacervation. *Macromolecules*, v. 32, p. 7128-7134, 1999.

WATANABE, M. Resíduo de cervejaria na ração para recria de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em tanque-rede, Pirassununga, SP: produção e qualidade. 2001. 80p. Dissertação (Mestrado em Concentração de Qualidade e Produtividade Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2001.

WATSON, P.F. The potential impact of sperm encapsulation technology on the importance of timing of artificial insemination: a perspective in the light of published work. *Reproduction, Fertility & Development*, v. 5, n. 6, p. 691-699, 1993.

WEINBRECK, F.; WIENTJES, R.H.W.; NIEUWENHUIJSE, H.; ROBIJN, G.W.; DE KRUIF, C.G. Rheological properties of whey protein / gum arabic coacervates. *Journal of Rheology*, v. 48, n. 6, p. 1215-1228, 2004.

WHISTLER, R.L.; DANIEL, J.R. Carbohydrates. In: Fennema O.R. (ed.). *Food Chemistry*. 2<sup>nd</sup> Ed., Marcel Dekker, New York, 1985.

WIELAND-BERGHAUSEN, S.; SCHOTE U.; FREY, M.; SCHMIDT F. Comparison of microencapsulation techniques for the water-soluble drugs nitenpyram and clomipramine HCL. *Journal of Controlled Release*, v. 85, n. 1-3, p. 35-43, 2002.

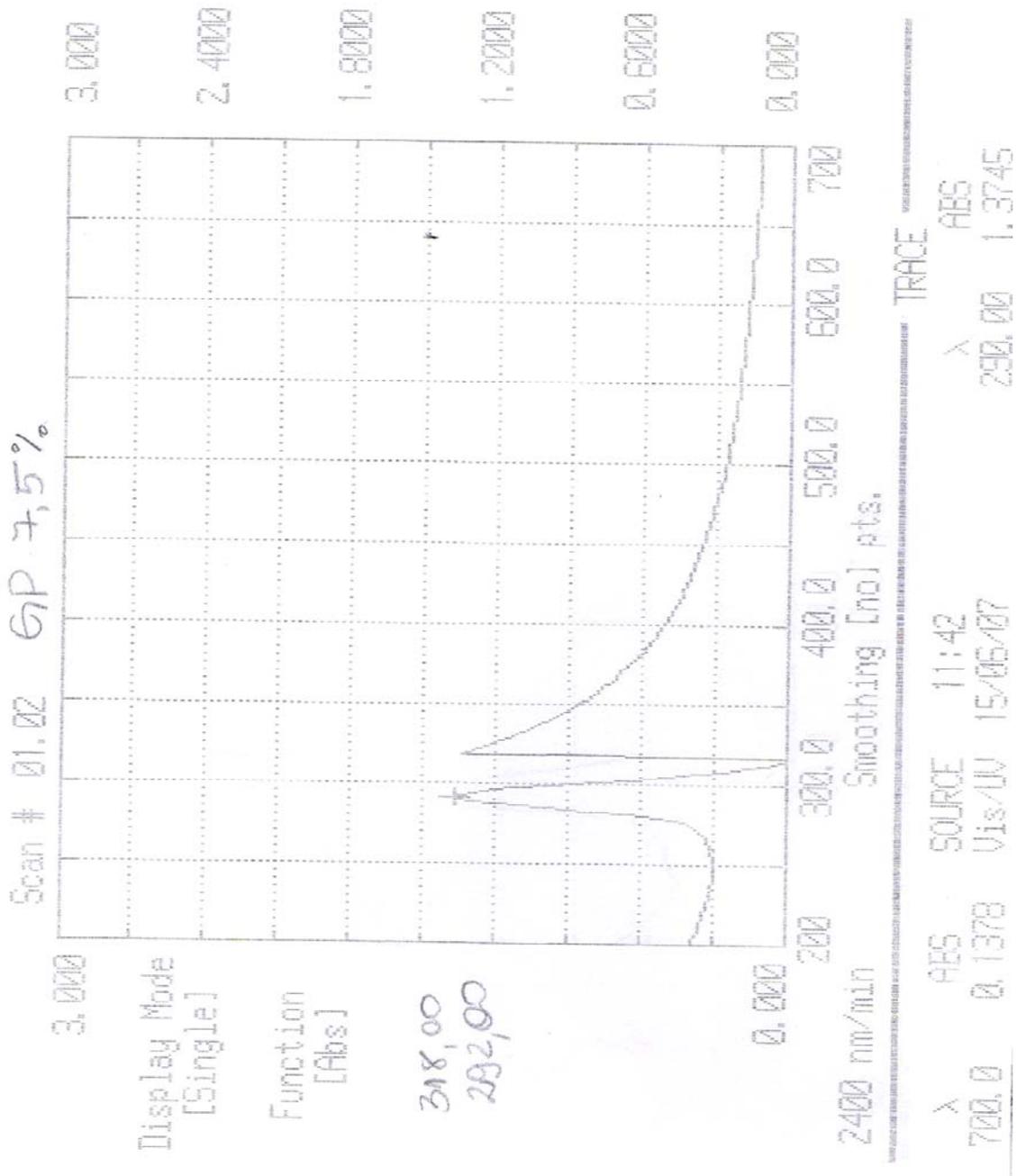
YANG, H., et. al. Effects of alkaline and acid pretreatment on the physical properties and nanostructures of the gelatin from channel catfish skins. *Food Hydrocolloids*, doi: 10.1016/j.foodhyd.2007.10.007, 2007.

ZHOU, P.; MULVANEY, S.J.; REGENSTEIN, J.M. Properties of Alaska Pollock skin gelatin: a comparison with tilapia and pork skin gelatins. *Journal of Food Science*, v. 71, p. 312-321, 2006.

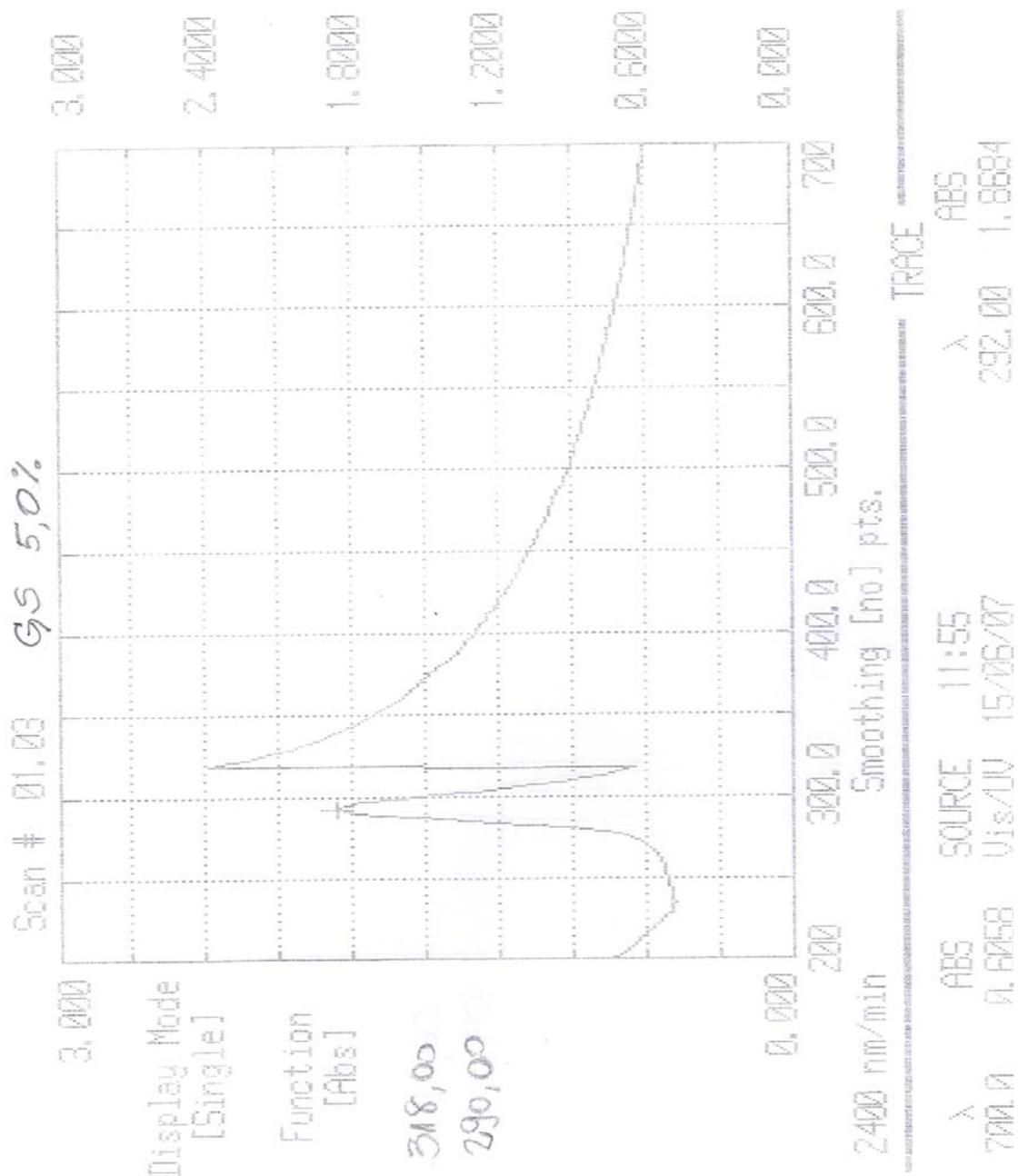
ZHOU, P.; REGENSTEIN, J.M. Comparison gel desserts from fish skin and pork gelatins using instrumental measurements. *Journal of Food Science*, v. 72, n. 4, p. 196-201, 2007.



**8.2 Anexo 2:** Espectro de varredura de gelatina de peixe do segundo lote solubilizada em água destilada na concentração de 7,5%.



8.3 Anexo 3: Espectro de varredura de gelatina suína solubilizada em água destilada na concentração de 5,0%.



8.4 Anexo 4: Espectro de varredura de gelatina suína solubilizada em água destilada na concentração de 7,5%.

