



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

MICROENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO DE PEIXE UTILIZANDO
GOMA ARÁBICA/MALTODEXTRINA E O COMPLEXO
CASEÍNA-PECTINA/MALTODEXTRINA

PATRÍCIA DE CASTRO MOREIRA DIAS

Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ficha Catalográfica

D541m Dias, Patrícia de Castro Moreira.
Microencapsulação de óleo de peixe utilizando goma arábica/maltodextrina e o complexo caseína-pectina/maltodextrina / Patrícia de Castro Moreira Dias;
orientadora Mônica Freiman de Souza Ramos.– Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2009.
xx, 107f. : il. col. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRJ / Faculdade de Farmácia, 2009.
Inclui bibliografia.

1. Microencapsulação. 2. Ômega-3. 3. Caseína. 4. Pectina.
I. Ramos, Mônica Freiman de Souza. II. Título

CDD 615.19

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**MICROENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO DE PEIXE UTILIZANDO
GOMA ARÁBICA/MALTODEXTRINA E O COMPLEXO
CASEÍNA-PECTINA/MALTODEXTRINA**

PATRÍCIA DE CASTRO MOREIRA DIAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mônica Freiman de Souza Ramos

**Rio de Janeiro
2009**

PATRÍCIA DE CASTRO MOREIRA DIAS

**MICROENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO DE PEIXE UTILIZANDO
GOMA ARÁBICA/MALTODEXTRINA E O COMPLEXO
CASEÍNA-PECTINA/MALTODEXTRINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

Orientador(a):

Prof^ª. Dr^ª. Mônica Freiman de Souza Ramos
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Gisela Maria Dellamora Ortiz
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof. Dr. Osvaldo de Freitas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

Prof^ª. Dr^ª. Lucia Maria Jaeger de Carvalho
Instituto de Nutrição – UFRJ

Prof. Dr. Eduardo Ricci Júnior
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Prof^ª. Dr^ª. Ana Cláudia de Macêdo Vieira
Faculdade de Farmácia - UFRJ

*À Wal,
por tudo...*

Aos meus pais, José Delton e Beatriz, pelo exemplo de força e caráter; mas principalmente pelo apoio incondicional em todos os momentos e por sempre; sempre acreditarem em mim.

Ao meu irmão, André, por ter ajudado a transformar a minha vida, passando a enxergá-la com um pouco mais de arte. Mas principalmente, por me fazer entender que tudo é relativo, nada é absoluto.

"Eu acredito que a humanidade aceitará como axioma para a sua conduta o princípio pelo qual dei a minha vida - o direito de investigar. É o credo dos homens livres - esta oportunidade de experimentar, este direito de errar, esta coragem de experimentar de novo. Nós, os cientistas do espírito humano, experimentaremos, experimentaremos, experimentaremos sempre. Atravessando séculos de tentativa e erro, atravessando agonias de pesquisa... experimentaremos leis e costumes, sistemas monetários e governos, até traçarmos o único curso verdadeiro - até encontrarmos a majestade da nossa própria órbita, tal como os planetas no alto encontraram a sua... E então seguiremos, finalmente, todos juntos na harmonia das nossas esferas sob o grande impulso de uma única criação - uma unidade, um sistema, um desígnio."

(Roger Bacon)
Inglaterra séc. XIII

"Hoje entendo bem meu pai. Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar do calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver."

(Amyr Klink)

AGRADECIMENTOS

À Pro^{fa} Dr^a. Mônica Freiman de Souza Ramos, pela orientação deste trabalho, pela paciência infinda e pelos profundos conhecimentos adquiridos.

À Pro^{fa} Dr^a Miriam Ribeiro Leite Moura, meus sinceros agradecimentos não apenas pelo empréstimo do laboratório para a realização das análises, mas principalmente pelo convívio maravilhoso, pelos ensinamentos e pela paciência, meu profundo respeito e admiração.

À Pro^{fa} Dr^a Gisela Dellamora Ortiz, certamente a maior responsável por eu ter chegado até aqui, e, por nunca ter deixado de me incentivar e acreditar em mim.

Ao Prof. Dr. Joaquim Fernando Mendes da Silva e à Pro^{fa}. Dr^a. Elisabete Pereira dos Santos, que de certa forma, indiretamente, ajudaram muito nesta conquista.

Ao Marcos Jun, um profissional exemplar, certamente o melhor técnico de laboratório com o qual tive o prazer de trabalhar; sem ele nada aconteceria. Obrigada por todos os bons e maus momentos em que você estava ali, sempre ao lado. Foram muitos balõezinhos. Não vou esquecer suas gargalhadas.

À queridíssima e flamenguista Elisete, por todas as inúmeras lavagens, pelo cheiro de peixe, pelo seu apoio, pela sua boa vontade e pelo seu carinho para comigo. Obrigada, Lili.

À Amora Pêra, Fernanda Gonzaga, Isadora Medella e Paula Leal - As Chicas, por serem uma constante fonte de inspiração em minha vida, há muitos anos. E por estarem ali junto aos meus ouvidos me inspirando nos momentos mais difíceis.

A todos os meus colegas de trabalho no LQFEx, que me ouviram, me apoiaram e me incentivaram a seguir em frente. Em especial a Mônica, Andréa, Gislane, Albuquerque, Suliano, Caroline, Cardoso, Alencar, Nogueira, Patrícia e Bianca. Sem vocês eu não conseguiria.

Aos professores da Universidade Estácio de Sá, meus colegas queridos, que me passaram suas experiências e muitos ensinamentos. Em especial a Pro^{fa} Dr^a. Regina Braga, por suas correções e considerações.

À Ana Karla, Luciana Gonçalves e Dulcinéia pelas maravilhosas contribuições na reta final.

Às técnicas de laboratório Ana Lúcia e Jorgecéia, pela ajuda e apoio incondicional. Vocês são muito queridas.

À Facção Dissidente, meus amigos queridos e eternos, minha força, minha sustentação. Já são quase 20 anos de amizade e tudo começou aqui nesta Universidade. Obrigada por vocês existirem e fazerem parte da minha vida.

À Pitu, Arthur, Jordana, Luciana, Carla, por me aturarem muito, aturarem minha chatice, durante esse tempo todo. Eu realmente não conseguiria sem vocês.

À Maria Clara, Gustavo, Monique, Júnior e Natasha, pelos bons momentos de alegria e descontração.

À minha prima querida Márcia, por sua amizade e apoio familiar tão importante. E ao Alexandre, por nos aturar a todos.

Ao meu afilhado Marcelo, que ilumina minha vida.

Ao meu primo, tão amado, Bruno Ferrari, pela amizade e companheirismo.

Às minhas primas Adriana, Paula, Lúcia e seus respectivos maridos Binho, Denis e Fernando, por serem minha família mais querida.

À Cacá por cuidar de mim com tanto carinho.

À minha amiga Lis Helena, companheira de trabalho e de amizade, coordenadora, chefe, uma grande incentivadora e um grande ouvido.

À Paula Bentes Leal.

Ao Carlos Bizarro pelas imagens do confocal a laser e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Marreto pelos profundos ensinamentos, pelo bom humor e pelo excelente convívio.

Ao Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro e a Prof^ª. Dr^ª. Martha Sorenson pelo empréstimo do laboratório e do nitrogênio.

A Prof^ª. Dr^ª. Mônica Lopes Aguiar e especialmente a Doutora Juliana Milanez, técnica do Laboratório de Controle Ambiental do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pelo enorme apoio na realização dos ensaios de tamanho de partículas.

Ao Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento Farmacotécnico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pelo apoio durante todas as etapas do trabalho.

A todo o pessoal de Farmanguinhos, especialmente do laboratório de produtos naturais e farmacologia aplicada, que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

A muitos entes e amigos queridos que infelizmente não puderam acompanhar esta minha conquista, mas que contribuíram em muito, para que eu chegasse até aqui. Minha madrinha Izilda, Tia Vera, Tio Maneco e Xuru, vocês sempre estarão em meu coração.

À Carolina Moneró e ao Pablo Coimbra pelas inúmeras secagens e análises, vocês foram meus braços direito e esquerdo

Aos meus alunos queridos, com os quais aprendo muito, diariamente.

Aos membros da banca por gentilmente terem aceitado o convite.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

RESUMO

DIAS, Patrícia de Castro Moreira. **Microencapsulação de óleo de peixe utilizando goma arábica/maltodextrina e o complexo caseína-pectina/maltodextrina**. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

As matérias-primas de origem natural, como o óleo de peixe (OP), são uma fonte rica em ácidos graxos poliinsaturados, do tipo ômega-3 e ômega-6. Essas substâncias são também conhecidas como alimentos funcionais, os quais participam de importantes atividades fisiológicas no organismo. No entanto, essas substâncias são altamente suscetíveis a processos de oxidação, em função do seu grau de insaturação. A oxidação destes sistemas resulta na perda de seu valor nutricional além, de alterar o sabor dos produtos que as contém. Muitos têm sido os estudos no intuito de minimizar este efeito oxidativo, entre eles, destacam-se a utilização de agentes antioxidantes e a microencapsulação. Diversos materiais, tanto de origem sintética quanto natural são descritos na literatura para formação de microcápsulas. Dentre os materiais de origem natural se destacam: os carboidratos, as proteínas, as gomas, e alguns lipídios. A proposta desse trabalho foi a preparação e caracterização de microcápsulas contendo óleo de peixe utilizando os ~~como~~ biopolímeros: a goma arábica/maltodextrina (GA+MD) e o complexo caseína-pectina/maltodextrina (CP+MD) acrescidos ou não de mistura antioxidante (ALT). As microcápsulas foram obtidas por dois processos: atomização por *spray dryer* e coacervação complexa, seguida de secagem em *spray dryer*, respectivamente. A eficiência do processo de encapsulação foi determinada através de análise gravimétrica. A estabilidade química das microcápsulas, após estocagem por 28 dias a 40°C e 75% de umidade relativa, foi determinada pelos valores de índice de peróxido e das TBARS. A eficiência total de microencapsulação GA-MD foi: 99,61% para GA+MD+OP (1:1:1); 99,56% para GA+MD+OP+ALT (1:1:1) e 97,11% para GA+MD+OP+ALT (1:2:1). Para as preparações CP-MD a eficiência total de encapsulação foi de 97,61%, 97,51% e 98,54% para CP+MD+OP (1:1:1), CP+MD+OP+ALT (1:1:1) e CP+MD+OP+ALT (1:2:1), respectivamente. A análise microscópica por MEV demonstrou que tanto as microcápsulas de GA-MD quanto às de CP-MD apresentaram um formato esférico e depressões na superfície. As micrografias de partículas rompidas de GA-MD demonstraram uma fina parede que reveste o óleo de peixe, aprisionando-o na microcápsula, indicando a formação de um sistema mononucleado. Os estudos de estabilidade química das microcápsulas demonstraram que a adição de agentes antioxidantes não alterou ou preveniu o processo oxidativo. Além disso, as diferentes preparações de microcápsulas apresentaram comportamento similar entre si, indicando um grande aumento nos índices de peróxido a partir do 14º dia, acompanhado pelo aumento das TBARS. No entanto, o complexo caseína-pectina/maltodextrina foi mais eficiente na prevenção da oxidação que a mistura polimérica goma arábica/maltodextrina sugerindo ser ser uma alternativa promissora para microencapsulação de óleo de peixe.

Palavras-Chave: microencapsulação, óleo de peixe, ômega-3, caseína, pectina, goma arábica, maltodextrina

ABSTRACT

DIAS, Patrícia de Castro Moreira. **Microencapsulation of fish oil using gum arabic/maltodextrin and complex casein-pectin/maltodextrin**. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Raw materials of natural origin such as fish oil (FO) are a rich source of polyunsaturated fatty acids, omega-3 and omega-6. These substances are known as functional foods because they are rich in nutrients that lead to important physiological activities in the body. However, these substances are highly susceptible to oxidation processes, depending on their degree of unsaturation. The oxidation of these systems results in loss of its nutritional value in addition to changing the taste of the product. Many studies have been done in order to minimize this oxidative effect, including the use of antioxidants and microencapsulation. Various materials are described in the literature and used as wall material in the manufacture of microcapsules. Many of these materials have natural origin, among these are: carbohydrates, protein, gums, and some lipids. The purpose of this work was the preparation and characterization of microcapsules of fish oil using biopolymers such as gum arabic/maltodextrin (AG+MD) and casein-pectin complex /maltodextrin (CP+MD). The preparation of microcapsules was carried out by two processes, spray-drying (AG-MD) and complex coacervation followed by drying in spray-dryer (CP-MD). The efficiency of the encapsulation was determined by gravimetric analysis. The chemical stability of the microcapsules after storage (28 days at 40 °C and 75% relative humidity) was determined by the values of peroxide and TBARS. Total efficiency of microencapsulation was 99.61% for preparation AG+MD+FO (1:1:1), 99.56% for preparation AG+MD+FO+ALT (1:1:1) and 97.11% for preparation AG+MD+FO+ALT (1:2:1). To casein-pectin complex/maltodextrin/fish oil the total efficiency of encapsulation were 97.61%, 97.51% and 98.54% for preparations CP+MD+FO (1:1:1), CP+MD+FO+ALT (1:1:1) and CP+MD+FO+ALT (1:2:1), respectively. Microscopic analysis by SEM showed that both the microcapsules GA-MD and the CP-MD showed a spherical shape and depressions on the surface. The micrographs of particles broken in GA-MD demonstrated that a thin wall that is the fish oil trapped in the microcapsules, indicating the formation of a mononuclear capsule. Studies of stability of the microcapsules showed similar behavior between the formulations, indicating a large increase in the rates of peroxide after the 14th day, accompanied by an increase in TBARS. The addition of antioxidants did not alter or prevent the oxidative process. The casein-pectin complex was more efficient in preventing the oxidative stability than the gum arabic/maltodextrin microcapsules and is a promising alternative for microencapsulation of fish oil, besides being be a raw material of low cost and easy obtention.

Key-Words: microencapsulation, fish oil, omega-3, casein, pectin, arabic gum, maltodextrin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química de alguns dos ácidos graxos poliinsaturados das “famílias” ômega-6 e ômega-3	25
Figura 2.	Metabolismo dos ácidos graxos ω -3 e ω -6	27
Figura 3.	Esquema do processo de secagem por <i>spray drying</i>	33
Figura 4.	Representação esquemática da separação de fases por coacervação complexa (traduzido de WEINBRECK, 2004)	38
Figura 5.	Equipamento <i>Mini-Spray-Dryer</i> (Modelo B-191, Buchi)	47
Figura 6.	Cromatograma de íons totais da amostra de óleo de peixe. Os números indicam os componentes identificados por CG-EM conforme a Tabela 3. ...	57
Figura 7.	Fotomicroscopia ótica das microcápsulas obtidas pelo processo de coacervação complexa em pH básico. A. Formação das microcápsulas do complexo caseína-pectina (20x); B. Após adição do óleo de peixe ao complexo (20x); C. Complexo caseína-pectina/óleo de peixe após homogeneização com Turrax (40x)	59
Figura 8.	Fotomicroscopia ótica das microcápsulas obtidas pelo processo de coacervação complexa em pH ácido (3,5). A. Microcápsulas do complexo caseína-pectina / óleo de peixe (20x); B. Após adição de maltodextrina à suspensão (20x)	59
Figura 9.	Gráfico representativo da eficiência de encapsulação das preparações de microcápsulas goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe.	61
Figura 10.	Gráfico representativo da eficiência de encapsulação das preparações de microcápsulas do complexo caseína-pectina/óleo de peixe	61
Figura 11.	Gráfico representativo do teor de umidade nas diferentes preparações de microcápsulas	62
Figura 12.	Fotomicrografias eletrônicas das microcápsulas contendo óleo de peixe. A. Microcápsulas de goma arábica-matodextrina/óleo de peixe (50x; 10 KV). B. Microcápsulas complexo caseína-pectina-maltodextrina/óleo de peixe (160x; 15 KV)	63

Figura 13.	Fotomicrografias eletrônicas das microcápsulas de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe. A. Aglomerado de microcápsulas (1100x; 15KV); B. Microcápsula em destaque (2200x, 15 KV); C. Microcápsula rompida (1900x, 15 KV)	63
Figura 14.	Fotomicrografias eletrônicas das microcápsulas do complexo caseína-pectina-maltodextrina/óleo de peixe. A. Aglomerado de microcápsulas (1700x; 15KV); B. Microcápsula em destaque (2500x, 15 KV)	64
Figura 15.	Imagens obtidas por microscopia confocal a laser das microcápsulas de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe. A e D - Microcápsulas coradas com FITC (mistura polimérica). B - Microcápsulas coradas com vermelho do nilo (óleo de peixe). C e F - Imagens A e B e D e E sobrepostas	65
Figura 16.	Imagens obtidas por microscopia confocal a laser das microcápsulas do complexo caseína-pectina-maltodextrina/óleo de peixe A - Microcápsulas coradas com FITC (mistura polimérica) B - Microcápsulas coradas com vermelho do nilo (o óleo de peixe). C. Imagens A e B sobrepostas	66
Figura 17.	Distribuição do tamanho de partículas para as preparações de goma arábica-maltodextrina	69
Figura 18.	Distribuição do tamanho de partículas para as preparações com o complexo caseína-pectina	70
Figura 19.	Curva Padrão do Hidroperóxido de Cumeno	71
Figura 20.	Valores médios de índice de peróxido nas amostras de óleo de peixe com ou sem antioxidante (ALT), pelo período de 28 dias sob condições de estresse oxidativo. * e ** indicam $P < 0,05$ entre os dias	72
Figura 21.	Valores médios de TBARS nas amostras de óleo de peixe com ou sem antioxidante (ALT), pelo período de 28 dias sob condições de estresse oxidativo. *, **, Δ indicam $P < 0,05$ entre os dias	73
Figura 22.	Valores médios de IP determinados no óleo de superfície das três preparações de microcápsulas goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe, pelo período de 28 dias sob condições de estresse oxidativo. *, **, Δ , •, •• indicam $P < 0,05$ entre os dias	74
Figura 23.	Valores médios de IP determinados no óleo encapsulado das três preparações de microcápsulas goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe, pelo período de 28 dias sob condições de estresse oxidativo. * indica $P < 0,05$ entre os dias.....	75

Figura 24.	Estudo da estabilidade das microcápsulas de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe através da determinação dos valores médios das TBARS. *, **, Δ indicam $P < 0,05$ entre os dias	76
Figura 25.	Valores médios de IP determinados no óleo de superfície das três preparações de microcápsulas do complexo pectina-caseína/maltodextrina/óleo de peixe, pelo período de 28 dias sob condições de estresse oxidativo. *, **, Δ indicam $P < 0,05$ entre os dias.	77
Figura 26.	Valores médios de IP determinados no óleo encapsulado das três preparações de microcápsulas do complexo pectina-caseína/maltodextrina/óleo de peixe, pelo período de 28 dias sob condições de estresse oxidativo. *, **, indicam $P < 0,05$ entre os dias.	78
Figura 27.	Estudo da estabilidade das microcápsulas do complexo caseína-pectina/maltodextrina/óleo de peixe através da determinação dos valores médios das TBARS. *, **, *** indicam $P < 0,05$ entre os dias.	78
Figura 28.	Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido medido espectrofotometricamente a 532 nm	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Valores percentuais de cada componente empregado nas preparações de microcápsulas de goma arábica, maltodextrina e óleo de peixe	44
Tabela 2.	Valores percentuais de cada componente empregado nas preparações de microcápsulas do complexo caseína-pectina e óleo de peixe	45
Tabela 3.	Condições operacionais do equipamento <i>mini-spray-dryer</i> para a secagem das microcápsulas	47
Tabela 4.	Composição e percentual de ácidos graxos identificados na amostra de óleo de peixe	56
Tabela 5.	Descrição dos valores médios de volume e densidade das preparações das microcápsulas desenvolvidas	67
Tabela 6.	Distribuição do tamanho de partícula entre as preparações de microcápsulas	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
AG	Ácido Graxo
AGE	Ácidos Graxos Essenciais
AGPIs	Ácidos Graxos Poliinsaturados
ALT	Ácido ascórbico, Lecitina, Tocoferol
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BM	Banho-Maria
CAS	Caseína
CAS-PEC	Complexo Caseína-Pectina
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a detector de massa
CG-FID	Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama
COX	Cicloxigenase
CYP-450	Enzima Citocromo P-450
DE	Dextrose Equivalente
DHA	Ácido Docosahexaenóico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GA	Goma Arábica
HETE	Hidróxi-Eicosatetraenóicos
IP	Índice de Peróxido
LA	Ácido Linoléico
LOX	Lipoxigenase
LT	Leucotrieno
MC	Microcápsula
MD	Maltodextrina
MDA	Malonaldeído
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OP	Óleo de Peixe
PEC	Pectina

PG	Propilgalato
PGE	Prostaglandina E
PGF	Prostaglandina F
SANBRA	Sociedade Algodoeira do Nordeste Brasileiro
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TXA ₂	Tromboxano A ₂
ω-3	Ácido Graxo Ômega-3
ω-6	Ácido Graxo Ômega-6

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Percentual
μL	Microlitro(s)
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
G	Gramma(s)
M	Molar
MG	Miligramma(s)
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar (milimoles / Litro)
N	Normal
N_2	Gás Nitrogênio
Nm	Nanômetro(s)
N°	Número
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Ω	Ômega
δ	Delta
rpm	Rotações por minuto
CO_2	Dióxido de Carbono
Kg	Quilo(s)
UI	Unidade Internacional
UR	Umidade Relativa
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
BF_3	Trifluoreto de boro
p/p	Peso/peso
v/v	Volume/volume
min	Minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 OS ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS E INSATURADOS	23
1.1.1 Os ácidos graxos ômega-3 e ômega-6	24
1.1.2 Metabolismo dos ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 e principais propriedades farmacológicas	25
1.2 MICROENCAPSULAÇÃO	30
1.3 BIOPOLÍMEROS	33
1.3.1 Goma Arábica e Maltodextrina	34
1.3.2 Complexo Caseína-Pectina	36
2 OBJETIVOS	40
2.1 OBJETIVO GERAL	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 MATERIAL	41
3.2 PREPARAÇÃO E ANÁLISE QUALITATIVA DO ÓLEO DE PEIXE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA	42
3.2.1 Preparo das amostras de óleo de peixe para análise	42
3.2.2 Condições cromatográficas para análise das amostras	42
3.3 PREPARAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE GOMA ARÁBICA, MALTODEXTRINA E ÓLEO DE PEIXE	43
3.4 PREPARAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE MALTODEXTRINA, COMPLEXO PECTINA-CASEÍNA E ÓLEO DE PEIXE	43
3.5 OBTENÇÃO E SECAGEM DAS MICROCÁPSULAS POR ATOMIZAÇÃO EM <i>SPRAY-DRYER</i>	46
3.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS	48

3.6.1 Determinação do óleo de superfície das microcápsulas	48
3.6.2 Determinação do óleo encapsulado das microcápsulas	48
3.7 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDO (IP)	49
3.7.1 Curva padrão do hidroperóxido de cumeno	49
3.7.2 Avaliação do índice de peróxido do concentrado de óleo de peixe	50
3.7.3 Avaliação do índice de peróxido do óleo de superfície das microcápsulas	50
3.7.4 Avaliação do índice de peróxido do óleo encapsulado das microcápsulas	51
3.8 DETERMINAÇÃO DOS VALORES DAS SUBSTÂNCIAS QUE REAGEM COM O ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	51
3.9 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DO ÓLEO DE PEIXE E DAS MICROCÁPSULAS APÓS CONDIÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO ...	52
3.10 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DAS MICROCÁPSULAS	52
3.11 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DAS PARTÍCULAS	53
3.12 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS	53
3.13 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS MICROCÁPSULAS	53
3.13.1 Microscopia eletrônica por varredura	53
3.13.2 Microscopia confocal a laser	53
3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55
4 RESULTADOS	56
4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE PEIXE	56
4.2 PROCESSO DE MICORENCAPSULAÇÃO: COMPLEXO CASEÍNA-PECTINA (COACERVAÇÃO COMPLEXA)	57
4.3 RENDIMENTO	60
4.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE ÓLEO DE PEIXE	60
4.5 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DAS MICROCÁPSULAS	62
4.6 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS MICROCÁPSULAS	62

4.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura das microcápsulas	62
4.6.2 Microscopia confocal a laser das microcápsulas	64
4.7 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DAS PARTÍCULAS	67
4.8 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS	67
4.9 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DAS MICROCÁPSULAS E DO ÓLEO DE PEIXE APÓS ESTRESSE OXIDATIVO	71
4.9.1 Determinação da curva padrão do hidroperóxido de cumeno	71
4.9.2 Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo de peixe	71
4.9.3 Avaliação da estabilidade oxidativa das microcápsulas	73
5 DISCUSSÃO	79
6 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS	98

ANEXOS

Anexo 1 – Tabelas de estabilidade

Anexo 2 – Tabelas de tamanho de partícula

Anexo 3 – Tabelas das análises estatísticas

1 INTRODUÇÃO

Muitos estudos clínicos, ao longo dos anos, demonstraram a relação estreita entre saúde, qualidade de vida e alimentação. Os alimentos de origem natural, principalmente, frutas, legumes e produtos de origem marinha, são fontes ricas em nutrientes e podem ser considerados alimentos funcionais (MONTES-PÉREZ & CONRERAS-FERNÁNDEZ, 1995).

O termo alimento funcional é utilizado para designar os alimentos ricos em nutrientes, os quais desempenham importantes atividades fisiológicas do organismo (DUGGAN, GANNON; WALKER, 2002). Baseado nisto, as indústrias farmacêuticas e alimentícias, juntamente com profissionais de saúde, vêm demonstrando interesse, tanto econômico quanto tecnológico, no desenvolvimento de produtos obtidos a partir destes alimentos funcionais. A possibilidade da transformação destes nutrientes em produtos farmacológicos tem sido alvo de inúmeros estudos, os quais confirmam que estes produtos, quando administrados em doses superiores às necessidades fisiológicas diárias, podem apresentar atividade farmacológica, sendo, portanto, uma alternativa promissora no tratamento e prevenção de doenças (KOLETZKO *et al.*, 1998; SHAHIDI, 2004).

Alguns desses compostos, como a glutamina, a arginina e os ácidos graxos essenciais (AGE), desempenham um papel importante e cada vez mais reconhecido, na saúde humana. A avaliação clínica do papel desses nutrientes no organismo confirma as atividades farmacológicas exercidas por cada um deles (DUGGAN; GANNON; WALKER, 2002). Dentre esses produtos, destacam-se os óleos vegetais e os óleos de peixe, ricos em ácidos graxos (AG).

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) têm papel importante na nutrição humana, pois intervêm em uma série de funções fisiológicas, entre elas a capacidade de reduzir os níveis de triacilglicerol e colesterol do sangue (SHAHIDI, 2004). Além disso, muitos estudos têm demonstrado a ação dessas substâncias na redução dos fatores de risco de doenças cardiovasculares (CARRERO *et al.*, 2005; IGNARRO; BALESTRIERI; NAPOLI, 2007; SCHMIDT *et al.*, 2006); na redução do desenvolvimento do câncer (HUBBARD; LIM; REICKSON, 1998; ARONSON *et al.*, 2001); no processo inflamatório (MAROON & BOST, 2006; MARGIORIS, 2009; SEKI; TANI; ARITA, 2009) e na redução esporádica de adenomas colônicos em humanos (ANTI *et al.*, 1994; MOLLERUP & HAUGEN, 1996).

1.1 OS ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS E INSATURADOS

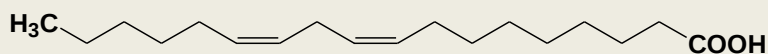
Os ácidos graxos são classificados como saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados dependendo do número de duplas ligações em sua cadeia. Os ácidos graxos saturados são predominantemente encontrados em alimentos de origem animal e derivados como: carne, queijo, leite, manteiga, ovos e gorduras; sendo também abundantes em muitos óleos vegetais (coco, palma, semente de palma e gorduras vegetais). Os ácidos graxos insaturados são classificados em duas categorias: monoinsaturados (contêm uma ligação dupla) e poliinsaturados (NEWTON, 2001). O organismo dos mamíferos é capaz de sintetizar os ácidos graxos saturados e monoinsaturados, mas não é capaz de sintetizar os ácidos graxos poliinsaturados. Pelo fato dessas substâncias desempenharem papel fundamental no metabolismo humano esses ácidos são denominados essenciais. Os ácidos linoléico e alfa-linolênico são precursores dos ácidos poliinsaturados de

cadeia longa do tipo ômega-6 (ω -6) e ômega-3 (ω -3), respectivamente, e são considerados ácidos graxos essenciais para a saúde humana porque não são sintetizados pelo organismo, mas podem ser obtidos pela dieta. Os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (ω -3) são obtidos principalmente das folhas verdes dos vegetais comestíveis e dos óleos de peixes marinhos; e os ômega-6 (ω -6), encontrados em grandes quantidades nos óleos vegetais (SIMOPOULOS, 2004).

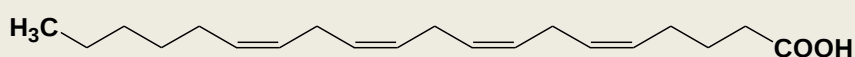
1.1.1 Os ácidos graxos ômega-3 e ômega-6

Os ácidos graxos poliinsaturados são constituídos por uma cadeia hidrocarbônica e classificados pela posição das duplas ligações em relação ao grupo metil ou ao grupo carboxílico terminal. Nos ácidos do tipo “ômega” a numeração da dupla ligação se inicia no grupo metil terminal da cadeia carbônica (SIMOPOULOS, 2004). Quando a primeira insaturação, a partir do grupo metil, ocorre entre os carbonos 3 e 4 ele é denominado ω -3; e, quando a primeira insaturação está situada entre os carbonos 6 e 7, ele é denominado de ω -6. Entre os ácidos graxos da família ômega-6 têm-se o ácido linoléico (precursor), o ácido araquidônico e o ácido docosapentaenóico (DPA) e na família ômega-3: o ácido linolênico (precursor), ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA). Suas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 1.

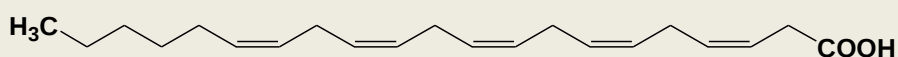
Ácidos graxos da família ômega-6



Ácido Linoleico (C18:2n-6)

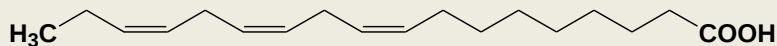


Ácido Araquidônico (C20:4n-6)

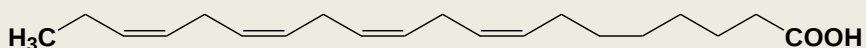


Ácido Docosapentaenóico (C22:5n-6)

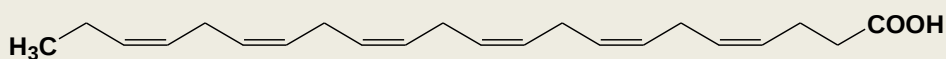
Ácidos graxos da família ômega-3



Ácido Linolênico (C18:3n-3)



Ácido Eicosapentaenóico (C20:5n-3) EPA



Ácido Docosahexaenóico (C22:6n-3) DHA

Figura 1 – Estrutura química de alguns dos ácidos graxos poliinsaturados das “famílias” ômega-6 e ômega-3.

1.1.2 Metabolismo dos ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 e principais propriedades farmacológicas

Depois de ingeridos os ácidos graxos essenciais são metabolizados em substâncias biologicamente ativas passando a intervir em uma série de funções fisiológicas do organismo. Estes ácidos, portanto, são: precursores na produção de hormônios, responsáveis pela absorção de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), formam a base constitutiva dos fosfolipídeos, que são parte de todas as membranas celulares e também regulam os índices de colesterol (MONTES-PÉREZ & CONRERAS-FERNÁNDEZ, 1995).

Os ácidos linoléico e α -linolênico, obtidos da dieta, uma vez no interior das células, sofrem uma série de reações de alongamento e dessaturação no retículo endoplasmático, produzindo ácidos graxos com maior número de átomos de carbono e grau de insaturação (Figura 2). O ácido linoléico é convertido a ácido araquidônico (AA) (20:4n-6), passando por ácido γ -linolênico e dihomo- γ -linolênico. O α -linolênico é convertido sucessivamente para o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e, por β -oxidação no peroxissomo, até o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3). O ácido linoléico, o ácido araquidônico e o DHA são os ácidos graxos predominantes nos fosfolipídeos de membrana (OLIVEIRA, 2006).

O ácido araquidônico pode ser mobilizado da membrana celular pela ação de enzimas fosfolipases, principalmente fosfolipases A2 e C. Subseqüentemente, o ácido araquidônico é metabolizado (Figura 2) por ciclooxigenases (COX-1, enzima constitutiva, ou COX-2, enzima induzida em resposta à inflamação) ou lipooxigenases (LOX-5, LOX-12 ou LOX-15), ou ainda por monooxigenases ligadas ao citocromo P450 microssomal (CYP-450) (JUMP, 2002).

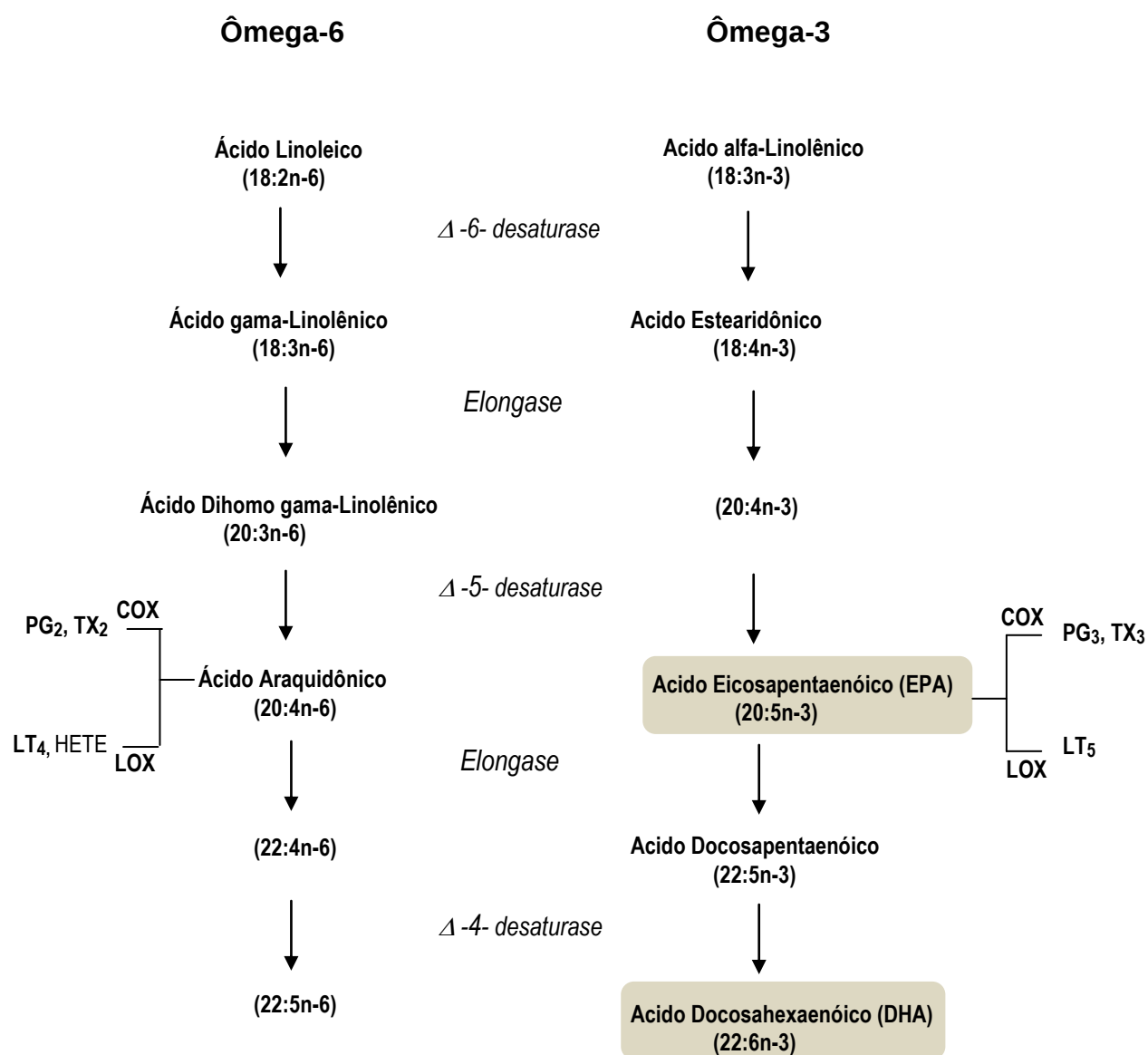


Figura 2 – Metabolismo dos ácidos graxos ω -3 e ω -6.

A ação da COX sobre o ácido araquidônico produz prostaglandinas (PGE_2 e PGF_{2a}) e tromboxanos da série 2 (TXA_2). A LOX catalisa a formação de leucotrienos (LT) da série 4 e derivados ácidos hidróxi-eicosatetraenóicos (HETE). De maneira bastante simplificada, os produtos originados da ação da COX são moduladores de efeitos trombaregulatórios, inflamatórios e quimiostáticos, enquanto que os produtos da LOX estão envolvidos na permeabilidade vascular, vaso e broncoconstrição (STULNIG, 2003).

Os ácidos graxos ômega-3 aumentam o “clearance” metabólico dos eicosanóides, acelerando seu catabolismo no peroxissomo. Estas observações explicam, em parte, as propriedades antiinflamatórias observadas para os ácidos graxos ômega-3 (PATCH; TAPSELL; WILLIAMS, 2005).

Outra via de produção de eicosanóides envolve monoxigenases ligadas a citocromo P-450 microsomal (CYP-450). A oxidação de AA produz uma grande variedade de eicosanóides, dentre os quais os derivados epóxidos que, entre outras atividades biológicas, estão envolvidos na modulação de sinalização por cálcio e têm efeito na pressão arterial. Os ácidos graxos ômega-3 também podem ser metabolizados pela CYP-450 e este mecanismo pode ser importante em células que possuam pouca atividade enzimática tipo COX ou LOX, como as células do parênquima hepático (JUMP, 2002).

Os ácidos graxos poliinsaturados EPA e DHA são sintetizados por fitoplânctons, que são consumidos por peixes, moluscos e crustáceos. Assim, os peixes ricos em gordura constituem a principal fonte exógena de AG- ω 3 para os seres humanos (RUXTON *et al.*, 2004). No óleo de peixe os níveis destes ácidos graxos polinsaturados podem variar entre 10 e 25%. A natureza e a quantidade dos

lipídios presentes no óleo de peixe varia de acordo com a espécie e o *habitat* (NETTLEON, 1995).

Os métodos convencionais de extração, fracionamento e purificação dos AGPIs incluem: destilação a vácuo, cristalização com uréia, extração com hexano e cristalizações convencionais e, extração com fluido supercrítico. Todos apresentam vantagens e desvantagens. Os métodos convencionais requerem altas temperaturas no processo resultando em perda e decomposição de compostos termolábeis, além do emprego de solventes inflamáveis ou tóxicos. A utilização do fluido supercrítico, especialmente com dióxido de carbono (CO₂), tem sido uma alternativa promissora para a extração destes óleos, no entanto, ainda tem desvantagens econômicas quando comparada aos processos convencionais (SAHENA *et al*, 2009).

Os AG (ω -6 ou ω 3) atuam em uma grande variedade de processos fisiológicos e fisiopatológicos, embora sejam necessários ainda muitos esforços para esclarecer seus intrincados mecanismos de ação, em particular dos ω -3.

Contudo, como ocorre com outros óleos comestíveis, o concentrado de óleo de peixe é altamente suscetível à oxidação, principalmente porque apresenta um alto número de sistemas 1,4 pentadienos em sua cadeia molecular. A oxidação destes sistemas resulta na perda de seu valor nutricional além de alterar o sabor do produto (SIMOPOULOS, 2004; SUH; YOO; LEE, 2007). Muitos têm sido os estudos no intuito de minimizar este efeito oxidativo, entre eles, a utilização de agentes antioxidantes e a microencapsulação (HEINZELMANN & FRANKE, 1999; VELASCO; DOBARGANES; MARQUEZ-RUIZ, 2000).

Existe ainda, um consenso dos benefícios reais que a ingestão de ácidos graxos ω -3 possa trazer à saúde de maneira preventiva ou ainda que estes AG possam ser utilizados como auxiliares no tratamento de pacientes com certos tipos

de doenças crônicas (HODGE *et al.*, 2006) tais como: artrite reumatóide, (PENNINGTON, 2002; PATCH; TAPSELL; WILLIAMS, 2005; PATCH *et al.*, 2006) doenças inflamatórias do intestino, distúrbios neurológicos e em desordens de humor (YOUNG & MARTIN, 2003; MARANGELLA *et al.* 2006); doenças cardiovasculares (WIJENDRAN & HAYES, 2004; STEHR & HELLER, 2006; REIFFEL & MCDONALD, 2006; MAROON & BOST, 2006); redução dos níveis de lipídios plasmáticos, controle do metabolismo de glicose e amplificação da resposta imune (SAMPATH & NTAMBI 2004), doenças coronarianas e pulmonares (BALK *et al.*, 2006), bem como na redução do desenvolvimento de certos tipos de cânceres, como mama, próstata e colo-retal (ROYNETTE *et al.*, 2004).

1.2 MICROENCAPSULAÇÃO

Nos últimos 20 anos o processo de microencapsulação de pequenas partículas e a formação de sistemas microparticulados tem se tornado um avanço tecnológico na área farmacêutica e alimentícia. O processo de microencapsulação consiste em envolver materiais sólidos, líquidos e até mesmo gasosos, por uma fina membrana polimérica, cujos compostos ou polímero pode ser de origem natural ou sintética (BAKAN, 2001).

Inicialmente, as microcápsulas produzidas apresentavam dimensões variadas de 5 μm a 2 mm. Mais recentemente, esses sistemas microparticulados vêm sendo produzidos com tamanhos que podem variar de 1 a 5000 μm e essa variação depende de diversos fatores envolvidos no processo de preparação das microcápsulas (HERRERO; MARTÍN DEL VALLE; GÁLAN, 2006).

Diversos compostos são descritos na literatura e utilizados como material de parede na fabricação de microcápsulas. Muitos desses materiais têm origem natural ou semi-sintética, dentre esses se destacam: os carboidratos, as proteínas, as gomas, os ésteres de celulose e alguns lipídios. De acordo com o processo de obtenção das micropartículas dois tipos básicos de estruturas podem ser obtidos: um sistema do tipo reservatório, onde o material nuclear forma uma única partícula mononucleada, a qual está envolvida por uma fina camada, denominado de microcápsula; e outro sistema do tipo matricial, onde o material encapsulado está disperso de maneira uniforme sob uma matriz polimérica, denominado de microsfera (ANAL & SINGH, 2007).

O processo de microencapsulação apresenta inúmeras aplicações em diversos segmentos da indústria (BOH *et al.*, 1999) como: a incorporação de substâncias hidrofóbicas em sistemas aquosos (PALMIERI *et al.*, 2002); para o mascaramento de sabor e odor desagradáveis; aumento da estabilidade e prazo de validade (HAWKINS; BLEDSOE; DUNCAN, 2000; ERSUS & YURDAGEL, 2007); redução de toxicidade, e liberação modificada de fármacos (QUENELLE *et al.*, 1999; CHAMPAGNE & FUSTIER, 2007).

Os métodos de obtenção das microcápsulas podem ser divididos em: métodos mecânicos, onde se destaca a atomização com secagem ou *spray drying*; métodos físico-químicos, como os processos de coacervação ou separação de fases; e métodos químicos, como por exemplo, a polimerização interfacial (RÉ, 1998). A escolha do método depende de alguns fatores importantes, principalmente das características físico-químicas do material nuclear e do material de cobertura. Fatores, como o tamanho das partículas obtidas e o custo operacional também

podem influenciar na escolha do método de preparação (WENDEL & ÇELIK, 1997; WATANABEA *et al.*, 2004).

Dentre os métodos mecânicos de obtenção de microcápsulas descritos, a secagem por *spray drying* é a mais utilizada (RATTES & OLIVEIRA, 2007; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Este método consiste na formação de um material particulado sólido a partir da atomização de um sistema líquido sob uma corrente de ar quente, no interior de uma câmara de secagem. Este sistema líquido pode se apresentar como uma dispersão ou uma pasta (RÉ, 1998; LOKSUWAN, 2007).

De forma sucinta o processo de secagem por *spray drying* pode ser descrito em 4 etapas distintas (MARRETO, 2006), conforme demonstrado na Figura 3:

- a) Atomização do líquido
- b) Contato do líquido atomizado com o ar aquecido
- c) Secagem do material
- d) Separação do produto seco a partir do ar aquecido

Além dessas etapas, alguns parâmetros irão interferir diretamente na eficiência do processo, como a temperatura de entrada e saída do ar, o fluxo de ar, a pressão de ar, a distribuição da temperatura e umidade, entre outros. Inúmeros trabalhos apresentam a técnica de secagem com *spray drying* como sendo a mais utilizada para a obtenção de microcápsulas. Apesar de ser um processo de desidratação, é possível, ainda assim, utilizá-lo para a secagem de compostos termolábeis, além de transformar sistemas líquidos em sólidos, obtendo partículas uniformes e esféricas e com uma boa eficiência (WENDEL & ÇELIK, 1997; SUH; YOO; LEE, 2007).

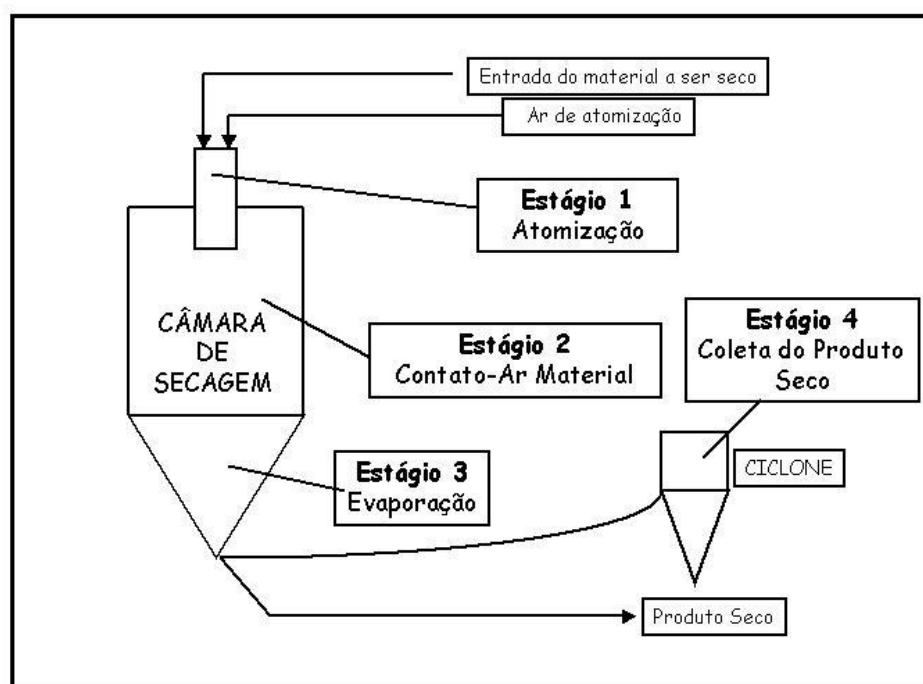


Figura 3 - Esquema do processo de secagem por *spray drying* (MARRETO, 2006).

1.3 BIOPOLÍMEROS

Um dos passos determinantes para o processo de microencapsulação é a seleção do material de revestimento. A composição deste material e suas características físico-químicas irão determinar as propriedades das microcápsulas assim como o método de obtenção das mesmas (SHAHIDI & HAN, 1993).

Em função dessas características, muitos polímeros de origem natural têm se apresentado como um excelente material de cobertura, principalmente no processo de encapsulação de substâncias de natureza hidrofóbica. A combinação desses polímeros torna-se uma alternativa ainda mais eficaz, aumentando as características desejáveis desses materiais durante o processo de microencapsulação (SILVA & MALCATA, 2005; KANAKDANDE; BHOSALE; SINGHAL, 2007). Considerando especificamente a técnica por *spray-drying* para microencapsulação de ácidos

graxos poliinsaturados, misturas de carboidratos de alto e baixo peso molecular ou açúcares reduzidos e alcoóis derivados de açúcares têm sido patenteadas (DRUSCH *et al.*, 2009).

1.3.1 Goma Arábica e Maltodextrina

As gomas são formadas por uma longa cadeia polimérica, sendo capazes de aumentar a viscosidade quando solubilizadas ou dispersas em água. Podem, ser utilizadas para encapsulação, estabilização de emulsões e algumas são capazes de formar géis (SHAHIDI & HAN, 1993).

A goma arábica (GA) ou goma acácia é um exsudato natural de espécies de Acácias. A principal fonte é a *Acacia senegal* L., mas pode ser obtida de outras espécies. Espécies de Acácias são encontradas na África (zonas sub-Saara), Austrália, Índia e América, onde foram plantadas para reduzirem a erosão do solo e como fonte de goma. Os principais países produtores de goma são Senegal, Mali, Mauritania, Nigéria e Sudão. A goma arábica obtida da *A.senegal* L. tem aproximadamente uma massa molecular de 580.000 Da, sendo constituída de açúcares (~ 45% galactose, 24% de arabinose, 13% de raminose), ácido glucurônico (~ 16%), ácido 4-o-metil glucurônico (~15%) (NUSSINOVITCH, 1997). Devido à estrutura altamente ramificada, a goma arábica é facilmente dispersível em água em concentrações de até 50%, porém com baixa viscosidade aparente (THEVENET, 1988), formando emulsões estáveis (SHAHIDI & HAN, 1993). A estrutura complexa da goma arábica, constituída principalmente de polissacarídeos e glicoproteínas, lhe confere propriedades emulsificantes (RÉ, 1998) que favorecem a encapsulação, em especial, de materiais hidrofóbicos.

Ao longo dos anos esta goma vem sendo utilizada como polímero de escolha para a microencapsulação de substâncias voláteis, por apresentar uma alta eficiência de encapsulação, e permitir um alto teor de material sólido de revestimento (KRISHNAN; KSHIRSAGAR; SINGHAL, 2005). No entanto, sua estrutura é altamente permeável ao oxigênio, o que limita sua aplicação em materiais susceptíveis a oxidação (SOOTTITANTAWAT *et al.*, 2005). A combinação de outro polímero à goma arábica tem sido uma alternativa que vem sendo investigada buscando a redução desta permeabilidade ao oxigênio (BUFFO & REINECCIUS, 2000).

As maltodextrinas (MD) são carboidratos obtidos a partir da hidrólise do amido de milho, sendo constituídas por um grupo de oligossacarídeos composto de pelo menos três unidades de glicose. Estas são obtidas pela acidificação e/ou hidrólise enzimática do amido de milho e subsequente secagem para obtenção do material em forma de pó. Estes polímeros normalmente contêm glicose, maltose, maltotriose além de derivados poliméricos de glicose de alto peso molecular, que variam dependendo do grau e do método de hidrólise empregado. As maltodextrinas são largamente empregadas na indústria alimentícia especialmente em produtos infantis como uma fonte alternativa de carboidratos (AL-KHATIB; DUGGAL; TOUMGA, 2001). Além disso, estes polímeros têm sido empregados como agentes encapsuladores, em função de sua alta funcionalidade, baixo custo e segurança (KRISHNAN; BHOSALE; SINGHAL, 2005; KANAKDANDE; BHOSALE; SINGHAL, 2007). Embora, a maltodextrina não apresente bons resultados como agente de retenção de substâncias voláteis, alguns trabalhos vêm demonstrando sua eficiência quando combinada com a goma arábica tanto para óleos voláteis quanto para óleos fixos (MINEMOTO *et al.* 2002; BUFFO & REINECCIUS, 2000).

1.3.3 Complexo Caseína-Pectina

A caseína é uma glicofosfoproteína encontrada no leite, sendo constituída de quatro cadeias (α_{s1} , α_{s2} , β e κ), com massa molecular de aproximadamente 82.240 Da e ponto isoelétrico de 4,6 (FIAT & JOLLÉS, 1989).

A caseína apresenta a capacidade de formar estruturas similares a micelas quando em solução, que advém da natureza anfifílica de suas moléculas. No leite, as caseínas são associadas com fosfato de cálcio, e quando o fosfato é removido, as micelas se dissociam em monômeros e/ou submicelas de caseína (WALSTRA,1990). A estabilidade das micelas se deve principalmente à caseína κ . Em função do pH 6,7 (pH do leite), as cadeiras κ se encontram estendidas perpendiculares à superfície das micelas. Essa conformação impede que outras micelas vizinhas se aproximem, porque a sobreposição das cadeias κ resultaria em perda de entropia. Este fenômeno é chamado de estabilização estérica. Com a redução do pH, os grupos carboxílicos presentes na cadeia κ , deixam de se repelir, a conformação estendida colapsa e, sem o mecanismo de estabilização, as micelas se agregam e precipitam (REDIGUIERI, 2008).

A caseína intacta ou modificada vem sendo estudada sob diversos aspectos, como polímero formador de filmes (BULGARELI; FORNI; BERNABEI, 2000), como excipiente em sistemas matriciais de liberação controlada de fármacos (HERNANDES; FREITAS; PEREIRA, 1998), para revestimento de formas sólidas e na preparação de microcápsulas (BAYOMI *et al.* 1998).

As pectinas constituem misturas complexas de polissacarídeos, encontrados na parede celular dos vegetais inferiores e superiores, onde contribuem, associadas a outros polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e proteínas, para a firmeza da

estrutura do tecido vegetal. É um polissacarídeo aniônico constituído, predominantemente, de polímeros lineares de ácido α -(1-4)-D-galacturônico com açúcares neutros como L-ramnose inseridos ou anexados às cadeias principais (SINHÁ & KUMRIA, 2003). A pectina é extraída e isolada comercialmente das cascas das frutas cítricas, do tomate e do bagaço da maçã, e outros produtos vegetais de importância econômica. Também pode ser obtida por suspensão de cultura de células (cenoura, espinafre e rosa), no entanto esta representa uma fração muito pequena de mercado (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEM, 2001).

A propriedade mais atrativa da pectina para a indústria é a sua capacidade de formar gel. Sua utilização na indústria alimentícia é amplamente conhecida, como agente espessante e estabilizante. Estudos mais recentes demonstram um grande potencial de uso no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, em especial, os de liberação cólon-específico (RUBINSTEIN, 1990; DRUSCH, 2007).

Tanto a caseína, quanto a pectina, são polímeros que possuem disponibilidade de grupos funcionais possibilitando a interação entre eles e/ou modificações em maior ou menor extensão, o que possibilita adequá-los ao sistema de liberação planejado (MUHIDDINOVY *et al.*, 2004; NURJAYA & WONG, 2005). No entanto, misturas de polissacarídeos e proteínas em meio aquoso são geralmente instáveis e a separação de fases, que é uma consequência da instabilidade do sistema, ocorre devido a interações repulsivas (segregativas) ou atrativas (associativas) (DOUBLIER *et al.*, 2000; SCHMITT *et al.*, 1998; TURGEON; SCHMITT; SANCHEZ, 2007). No primeiro caso, também conhecido como incompatibilidade termodinâmica, os dois biopolímeros não se atraem e, depois de cessada a agitação, a dispersão se separa em duas fases, cada uma contendo predominantemente um dos polímeros. No outro caso, que inclui coacervação

complexa, os biopolímeros se atraem porque possuem cargas opostas, resultando em uma fase que contém os biopolímeros complexados e outra que contém principalmente solvente (REDIGUIERI, 2008).

“Coacervação” deriva do latim “acervus”, que significa agregação. O prefixo “co” significa junto. Portanto, coacervação se refere à união de partículas coloidais, termo introduzido por Bungenberg de Jong e Kruyt em 1929 (apud REDIGUIERI, 2008, p. 37). Neste caso, entende-se por partículas coloidais, as gotículas de fase polimérica formadas durante a separação de fases, também chamadas de coacervados. Esses coacervados depois coalescem e formam uma fase contínua de complexo insolúvel.

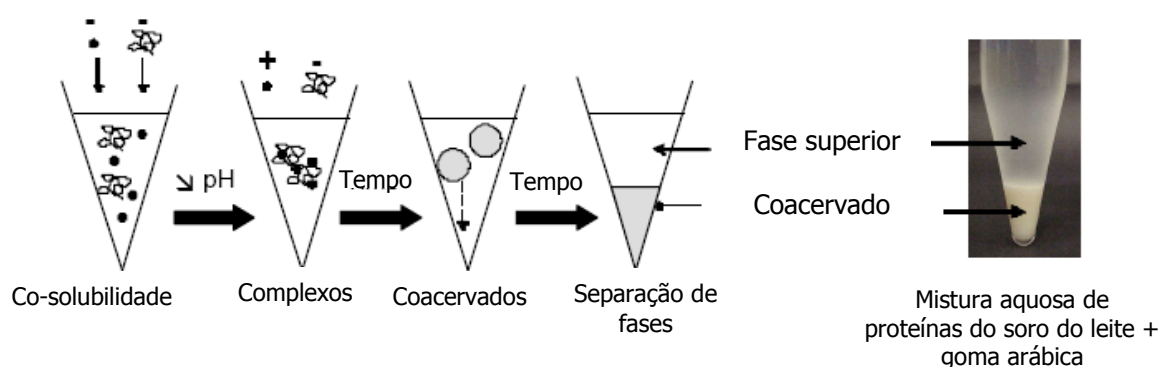


Figura 4 - Representação esquemática da separação de fases por coacervação complexa (traduzido de WEINBRECK, 2004).

A coacervação pode ser simples ou complexa. Na coacervação simples para que haja a separação das fases ocorre a adição de um eletrólito ou de um solvente não miscível com a solução polimérica. Já na coacervação complexa, dois polímeros de cargas opostas são neutralizados em solução aquosa (DONG & BODMEIER, 2006).

As interações entre pectinas e micelas de caseína em bebidas lácteas acidificadas vêm sendo bastante estudadas (MAROZIENE & DE KRUIF, 2000;

TUINIER; ROLIN; DE KRUIF, 2002; TROMP *et al.*, 2004), no entanto, nenhum desses estudos utilizou concentrações de pectina acima de 1% (p/p), pois o interesse estava focado na estabilização de bebidas lácteas, o que requer pequenas quantidades de pectina. Baracat (2004) observou, em misturas de caseína e pectina, a formação de sistemas organizados capazes de encapsular cristais de indometacina e de paracetamol e sugeriu que eles pudessem controlar a liberação de fármacos (BARACAT, 2004; MORESCHI *et al.*, 2007). Redigueri (2008), estudando a mesma mistura polimérica, demonstrou que estes sistemas eram resultados da formação de um complexo entre a caseína e a pectina. Foi evidenciado que em faixas de pH 6 e 3 ocorre a atração entre os polímeros, pois a caseína se torna positivamente carregada e atrai a pectina carregada negativamente, resultando na formação de partículas do complexo. Essas partículas não coalescem e são resistentes à adição de sal (NaCl 100 mM), apresentando um diâmetro médio aproximado de 4 μm . As micropartículas de pectina/caseína obtidas por este método são capazes de encapsular com alta eficiência tanto substâncias hidrofóbicas quanto hidrofílicas, possibilitando sua aplicação na encapsulação de compostos variados para fins diversos (REDIGUIERI, 2008).

O presente trabalho teve como proposta a avaliação do óleo de peixe microencapsulado em duas misturas poliméricas: 1) goma arábica e maltodextrina e 2) complexo caseína-pectina/maltodextrina, na formação de micropartículas para encapsulação do óleo de peixe. O processo de microencapsulação visou proteger e/ou reduzir a oxidação do óleo de peixe, além de possibilitar o mascaramento do odor e gosto desagradáveis do óleo de peixe.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral a preparação e caracterização microcápsulas contendo concentrado de óleo de peixe, rico em ácidos graxos ômega-3.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O desenvolvimento deste projeto compreendeu os seguintes objetivos específicos:

- a) Identificação química dos componentes do óleo de peixe por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa;
- b) Preparação e secagem de microcápsulas, por *spray-drying*, utilizando duas misturas poliméricas: a primeira constituída de goma arábica e maltodextrina e a segunda de caseína-pectina e maltodextrina;
- c) Avaliação da eficiência de encapsulação por análise química quantitativa;
- d) Determinação do tamanho das partículas;
- e) Avaliação morfológica das microcápsulas;
- f) Avaliação da estabilidade química e morfológica das microcápsulas após condições de estresse oxidativo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

O concentrado de óleo de peixe (lote nº 07030070) foi gentilmente fornecido pela empresa Relthy Laboratórios LTDA. A goma arábica, Instant Gum IRX 49345, foi doada pela CNI – Colloides Natules –Brasil. A maltodextrina (FARMALTM MD 5, DE 5,9 - lote nº 301.7060002) foi gentilmente fornecida pela Corn Products S.A. A pectina (Genu[®] Tipo USP-B, lote LS 1037) foi fornecida pela CPKELCO, Brasil e a caseína láctea (lote nº HA04037) pela Wenda Int. Trade Co. TTD. Os solventes, como hexano, isopropanol, metanol, clorofórmio e acetona (todos grau P.A.), assim como o ácido ascórbico e o propilgalato foram adquiridos da empresa Vetec Química Fina Ltda. O reagente de Karl Fischer, o sulfato ferroso, o tiocianato de amônio, o ácido tricloroacético (TCA) e o ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA) foram adquiridos da Merck Reagentes S.A. O hidroperóxido de cumeno, o ácido tiobarbitúrico (TBA), o trifluoreto de boro (solução a 50%) e os corantes isotiocianato de fluoresceína (FITC) e vermelho do Nilo foram obtidos da empresa Sigma Aldrich Química Brasil Ltda. A lecitina de soja foi doada pela Sociedade Algodoeira do Nordeste Brasileiro (SANBRA). O tocoferol foi adquirido a partir de cápsulas comerciais de vitamina E 1000 UI (acetato de DI-alfa tocoferol e D-alfa tocoferol) da empresa Rexall Sundown do Brasil Ltda.

3.2 ANÁLISE QUALITATIVA DO ÓLEO DE PEIXE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

Amostras de óleo de peixe e de microcápsulas foram preparadas para análise por cromatografia em fase gasosa segundo a metodologia descrita por METCALFE SCHMITZ; PELKA (1966), com modificações como descrito a seguir.

3.2.1 Preparo das amostras de óleo de peixe para análise

Cerca de 50 mg de óleo, acondicionados em balão, foram adicionados de 2,5 mL de solução metanólica de BF_3 a 14%. O balão foi acoplado a um condensador refrigerado à temperatura de 15°C. O sistema foi mantido sob agitação e, após aquecimento até 80°C, foi realizado refluxo por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mL de n-heptano e o sistema foi mantido em aquecimento e refluxo por mais 10 minutos. Após este período, o sistema foi resfriado e 2 mL de solução saturada de NaCl foram adicionados ao balão e o conteúdo homogeneizado; a fase orgânica foi separada e reservada em frasco lacrado para análise cromatográfica.

3.2.2 Condições cromatográficas para análise das amostras de óleo de peixe

Um volume de 1,0 μL da fase orgânica foi injetado e analisado por cromatografia em fase gasosa, em cromatógrafo HP Hewlett-Packard 6890 com detector de ionização de chama (CG-FID) com injetor tipo split (270°C), com divisão de vazão de 1:10, utilizando coluna capilar Varian 6501767 (100m x 0,25mm x 0,25 μm de espessura do filme). A vazão foi de 1,5 mL/min para o hélio, como gás de arraste, sob fluxo constante. Temperatura inicial de 110°C por 0,5 min, seguida de

aquecimento a 5°C/min até 270°C, e permanecendo 10 minutos sob esta temperatura.

Alíquotas de mesmo volume foram analisadas em cromatógrafo HP Hewlett-Packard 6890, acoplado a um detector de massa (CG-EM) nas mesmas condições de análise acima descritas.

Uma mistura padrão de ácidos graxos poliinsaturados (C4, C6, C8, C10, C11, C12, C14, C14:1, C15, C15:1, C16, C16:1, C17, C17:1, C18, C18:1n9, C18:2n6, C18:3n6, C20, C20:1, C20:5, C21, C22, C22:6, C24 e C24:1; Sigma) diluída em quantidade suficiente de n-heptano foi injetada e analisada por CG-FID e CG-EM para auxiliar na identificação dos componentes do óleo de peixe.

3.3 PREPARAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE GOMA ARÁBICA, MALTODEXTRINA E ÓLEO DE PEIXE

As microcápsulas foram preparadas variando-se as concentrações de polímero e de óleo de peixe, conforme descrito abaixo:

Preparação 1: Goma Arábica (**GA**) + Maltodextrina (**MD**) + Óleo de Peixe (**OP**) (1:1:1)

Preparação 2: **GA + MD + OP + ALT** (1:1:1)

Preparação 3: **GA + MD + OP + ALT** (1:2:1)

Nas preparações 2 e 3 foi adicionada uma mistura antioxidante (ácido ascórbico 8,6%, lecitina 5,2% e tocoferol 86,20%), denominada ALT na concentração de 0,58% em relação à massa de óleo de peixe da preparação (apud HIGGINS, *et al*, 1999).

Os valores percentuais de massa (g) de polímero, óleo de peixe e da mistura antioxidante estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores percentuais de cada componente empregado nas preparações de microcápsulas de goma arábica, maltodextrina e óleo de peixe.

Preparações	Goma Arábica	Maltodextrina	Óleo de Peixe	ALT
1	15%	15%	15%	---
2	15%	15%	15%	0,58%
3	10%	20%	10%	0,58%

* Porcentagem em relação à quantidade de óleo total na formulação

Para cada preparação, a goma arábica e a maltodextrina, foram pesadas e dispersadas em água destilada separadamente, com auxílio de um agitador mecânico (IKA, RW-20) a 300 rpm. Em seguida, a respectiva massa de óleo de peixe foi adicionada à dispersão de GA e submetida à agitação com um homogeneizador do tipo Turrax (IKA, T25 basic, 13.500 rpm) por 2 minutos. Para as preparações 2 e 3 a mistura antioxidante ALT foi adicionada ao óleo de peixe antes da incorporação à goma arábica. Em seguida, a dispersão de maltodextrina foi adicionada, e a mistura permaneceu sob agitação por 15 minutos. Antes de iniciar o processo de atomização e secagem (item 3.5), a dispersão foi novamente homogeneizada em Turrax por 1 minuto e submetida a um fluxo de nitrogênio (N₂) por cerca de 1 minuto.

3.4 PREPARAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE MALTODEXTRINA, COMPLEXO CASEÍNA-PECTINA E ÓLEO DE PEIXE

Identicamente às anteriores, as microcápsulas foram preparadas variando-se as concentrações de maltodextrina, do complexo caseína-pectina e de óleo de peixe, conforme descrito abaixo:

Preparação 4: Maltodextrina (**MD**) + Complexo Caseína-Pectina (**CP**) + Óleo de Peixe (**OP**) (1:1:1)

Preparação 5: MD + CP + OP + ALT (1:1:1)

Preparação 6: MD + CP + OP + ALT (1:2:1)

Nas preparações 5 e 6 foi adicionada uma mistura antioxidante ALT na concentração de 0,58% em relação à massa de óleo de peixe da preparação.

Os valores percentuais de massa (g) de polímero, óleo de peixe e da mistura antioxidante estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores percentuais de cada componente empregado nas preparações de microcápsulas do complexo caseína-pectina e óleo de peixe.

Preparações	Caseína-Pectina	Maltodextrina	Óleo de Peixe	ALT
4	7,5%	7,5%	7,5%	---
5	7,5%	7,5%	7,5%	0,58%
6	7,5%	15%	7,5%	0,58%

* Porcentagem em relação à quantidade de óleo total na formulação

As microcápsulas foram obtidas pela metodologia descrita por Baracat (2004), com algumas modificações. Para cada 100 mL de dispersão do complexo caseína-pectina, 3,5 g de pectina foram dispersas em 60 mL de água destilada (aproximadamente 3 horas) com o auxílio de agitador mecânico (IKA, RW-20) a 400 rpm. 3,5 g de caseína foram dispersas em 40 mL de água destilada, sendo o pH da dispersão ajustado lentamente com solução de NaOH 4 N até aproximadamente $8 \pm 0,5$. Em seguida, a dispersão de pectina foi vertida sobre a de caseína e o pH da nova dispersão polimérica foi novamente ajustado para $8 \pm 0,5$, permanecendo sob agitação por 12 horas. Após este período, o óleo de peixe e a mistura de antioxidantes foram adicionados à dispersão de caseína/pectina e homogeneizados

em Turrax por 2 minutos. Em seguida, foram adicionadas, lentamente, quantidades suficientes de solução de HCl 1 M até que se atingisse pH $3,5 \pm 0,3$. Logo após, a maltodextrina foi adicionada lentamente à dispersão até completa solubilização.

Durante todo o processo de formação do complexo caseína-pectina, as microcápsulas foram acompanhadas por microscopia ótica (Microscópio Olympus CBA). Uma amostra de dispersão do complexo caseína-pectina em pH 8,0, com ou sem óleo de peixe, foi corada com corante de contraste panótico rápido nº 2 (solução de xantenos a 0,1%) para melhor evidenciar as micropartículas formadas. Igualmente, uma amostra da dispersão ácida foi corada com panótico rápido nº 1 (solução de triarilmetano a 0,1%).

Antes de iniciar o processo de atomização e secagem, a dispersão foi novamente submetida à homogeneização no Turrax por 1 minuto e, em seguida, a um fluxo de nitrogênio por mais 1 minuto. O material obtido foi submetido à atomização e secagem, nas condições descritas no item 3.5.

3.5 OBTENÇÃO E SECAGEM DAS MICROCÁPSULAS POR ATOMIZAÇÃO EM *SPRAY-DRYER*

As dispersões aquosas de goma arábica/maltodextrina/óleo de peixe, e as microcápsulas obtidas pelo complexo caseína-pectina/maltodextrina/óleo de peixe foram atomizadas e secas em *Spray-dryer* - Buchi, modelo B-191 (Figura 4) sob as seguintes condições:

Tabela 3 - Condições operacionais do equipamento *mini-spray-dryer* para a secagem das microcápsulas.

Condições operacionais	Parâmetro
Temperatura de entrada	170°C
Temperatura de saída	118-120°C
Aspirador	100%
Vazão	3 mL/min
Fluxo	700 L/h
Pressão	4 Kgf/cm ²

O bico atomizador operou sob refrigeração com o auxílio de um banho de refrigeração (HAAKE, F6) a 20°C.



Figura 5 - Equipamento *Mini Spray-Dryer* (Modelo B-191, Buchi).

3.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

3.6.1 Determinação do óleo de superfície das microcápsulas

Em tubos de ensaio tipo Falcon, contendo amostras de cerca de 1 g de microcápsulas, foram adicionados 15 mL de hexano P.A. A mistura foi homogeneizada em agitador do tipo vortex (Thermolyne, Maxi Mix II) por 2 minutos, e, em seguida, centrifugada por 20 minutos a 2800 x g, (centrífuga Beckman Coulter, Allegra™ 21R). O sobrenadante foi filtrado e evaporado sob fluxo de nitrogênio e o conteúdo lipídico determinado gravimetricamente (BAIK *et al.*, 2004). Todas as análises foram realizadas, em pelo menos, triplicata.

3.6.2 Determinação do óleo encapsulado das microcápsulas

Para as preparações 1, 2, 4 e 5 amostras de cerca de 0,3 g de microcápsulas foram analisadas. No entanto, para as preparações 3 e 6 amostras de cerca de 0,4 g de microcápsulas foram utilizadas. Todas as amostras foram pesadas em tubo Falcon de 50 mL, ao qual foram adicionados 4 mL de hexano e, em seguida, homogeneizadas em agitador tipo vortex por 1 minuto, seguida de centrifugação por 20 minutos a 2800 x g. O sobrenadante foi descartado e ao resíduo foram adicionados 2 mL de água destilada, o que foi seguido de nova agitação em vortex por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 25 mL de uma solução hexano/isopropanol (3:1 v/v), e agitado em vortex por mais 2 minutos, seguido de centrifugação por 20 minutos a 2800 x g. A fase orgânica foi cuidadosamente separada com auxílio de pipeta *pasteur* e transferida para um erlenmeyer previamente tarado. O processo de extração com a solução hexano/isopropanol foi repetido por mais duas vezes e a fase orgânica coletada no mesmo erlenmeyer. A

fase orgânica coletada foi evaporada sob fluxo de nitrogênio e o conteúdo lipídico determinado gravimetricamente (HARDAS *et al.*, 2002). Todas as análises foram realizadas em pelo menos triplicata.

3.7 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDO (IP)

3.7.1 Curva padrão do hidroperóxido de cumeno

Para quantificação do índice de peróxido nas microcápsulas e no óleo de peixe foi elaborada uma curva analítica utilizando-se como substância padrão o hidroperóxido de cumeno (Sigma-Aldrich). Amostras de 10 µL de hidroperóxido de cumeno foram transferidas para balão volumétrico adequado, diluídas com solução de clorofórmio/metanol (2:1 v/v) e adicionadas de 50 µL de uma solução de Fe^{+2} (0,005 M) e 50 µL de uma solução de tiocianato de amônio a 3%. Logo após a adição dos reagentes, as soluções foram homogeneizadas e incubadas em sala escura por 20 min. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância das amostras, em espectrofotômetro UV (Shimadzu; mod. UV Mini-1240), de concentrações, 10,13, 12,16, 14,18, 16,21 e 18,24 µM, no comprimento de onda de 500 nm (UV-visível) para posterior confecção da curva analítica (MIHALJEVIC; KATUSIN-RAZEM; RAZEM, 1996).

3.7.2 Avaliação do índice de peróxido do concentrado de óleo de peixe

A análise do índice de peróxido (IP) na amostra do concentrado do óleo de peixe foi realizada segundo a metodologia descrita por BAIK *et al.* (2004) e MIHALJEVIC; KATUSIN-RAZEM; RAZEM (1996), com pequenas alterações. Amostras de cerca de 0,1 g do óleo de peixe foram transferidas para balão volumétrico (50 mL) e diluídas com uma solução de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v). Ao balão foram adicionados ainda 50 µL de uma solução de Fe^{+2} (0,005 M) e 50 µL de uma solução de tiocianato de amônio a 3% e o volume ajustado com a solução de clorofórmio/metanol. Logo após a adição dos reagentes, a amostra foi agitada em homogeneizador do tipo vortex e incubada em sala escura por 20 minutos. A amostra foi levada para leitura em espectrofotômetro UV-Visível no comprimento de onda de 500 nm e o índice de peróxido foi quantificado através da curva padrão do hidroperóxido de cumeno.

3.7.3 Avaliação do índice de peróxido do óleo de superfície das microcápsulas

Para a determinação do índice de peróxido nas preparações 1, 2, 4 e 5, amostras de cerca de 0,3 g de microcápsulas foram empregadas. Para as preparações 3 e 6, amostras de cerca de 0,4 g de microcápsulas foram analisadas. Todo o procedimento para determinação do índice de peróxido seguiu a metodologia descrita no item 3.7.2 acima.

3.7.4 Avaliação do índice de peróxido do óleo encapsulado das microcápsulas

A determinação do índice de peróxido nas microcápsulas foi feita segundo a metodologia anteriormente descrita para a extração do óleo encapsulado, seguido da avaliação do índice de peróxido conforme descrito no item 3.6.1.

3.8 DETERMINAÇÃO DOS VALORES DAS SUBSTÂNCIAS QUE REAGEM COM O ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Amostras de massas entre 0,1 a 0,16 g de microcápsulas e do concentrado de óleo de peixe foram adicionadas de 2 mL de uma solução contendo 7,5% de ácido tricloroacético/ 0,1% de propilgalato/ 0,1% de EDTA e homogeneizadas com auxílio de um agitador do tipo vórtex. Em seguida, foram adicionados 2 mL de hexano seguido de nova homogeneização e posterior centrifugação a 2800 x g por 5 minutos. A fase orgânica foi cuidadosamente separada para recipiente fechado. Este procedimento foi repetido duas vezes e a fase orgânica transferida para o mesmo recipiente. Em seguida o solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio. O resíduo da evaporação foi ressuspendido com 5 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico 0,02 M. A amostra foi incubada por 15 minutos em banho-maria, e levada para leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 532 nm. A quantificação das amostras foi realizada com base no coeficiente de extinção molar do malonaldeído ($15.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (BAIK, *et al.*, 2004; SRINIVASAN & XIONG, 1996).

3.9 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DO ÓLEO DE PEIXE E DAS MICROCÁPSULAS APÓS CONDIÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Cada formulação, tanto de óleo de peixe quanto de microcápsulas, foi acondicionada individualmente em placa de petri fechada e armazenada no interior de uma câmara climática (FANEM, Modelo 345) mantendo-se a temperatura de 40°C e 75% de umidade, pelo período de 30 dias. A avaliação da estabilidade química foi realizada a cada 7 dias através da determinação do índice de peróxido, tanto do material lipídico de superfície quanto do encapsulado, conforme descrito nos itens 3.7.3 e 3.7.4, respectivamente, bem como a proporção relativa dos aldeídos formados através da determinação dos valores das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), usando o método modificado de Srinivasan e Xiong (1996), conforme descrito no item 3.8.

3.10 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DAS MICROCÁPSULAS

O teor de umidade das microcápsulas foi determinado através de titulação direta com reagente do tipo Karl Fischer (Metler Toledo, mod DL31) seguindo o Método I descrito na Farmacopéia Americana 30^a Edição (2007), para umidade de pós. Cerca de 100 mg de cada amostra foram adicionados ao titulador e a quantidade de água presente nestas determinada através da reação quantitativa da água com a solução titulométrica.

3.11 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DAS PARTÍCULAS

Amostras, em triplicata, de massa entre 1,3758 g a 1,7138 g foram analisadas em picnômetro Micrometrics modelo Accupyc 1330 V3.03, à temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$, com vazão de hélio de 17 psi.

3.12 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS

A análise granulométrica das microcápsulas foi realizada por difração a laser em um analisador CSD: Malvern Mastersize Microplus MAF 5001. Amostras de massa entre 1,3758 g e 1,7138 g foram dispersas em 500 mL de acetona, à temperatura ambiente. Durante toda a análise a dispersão foi mantida sob agitação constante. A distribuição do tamanho das partículas foi expressa em % de volume de partículas em uma faixa de tamanho.

3.13 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS MICROCÁPSULAS

3.13.1 Microscopia eletrônica por varredura

Amostras de microcápsulas foram distribuídas sobre uma fita dupla-face, aderidas a um suporte metálico e revestidas, sob atmosfera de argônio, com ouro coloidal utilizando um *Sputer Coater* (BAL TEC BALZERS SDC-050) com uma cobertura de ouro de 240 segundos. Em seguida, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura JSM T330A - JEOL[®].

3.13.2 Microscopia confocal a laser

A análise morfológica das microcápsulas por microscopia confocal a laser foi realizada segundo a metodologia descrita por Lamprecht, Schäfer e Lehr (2000a), com algumas modificações.

À dispersões de goma arábica em água (Preparações 1 e 2), foram adicionadas alíquotas de 250 μ L de solução de isotiocianato de fluoresceína (FITC (Aldrich); 1mg/mL em DMSO). As dispersões com o corante foram mantidas sob agitação por 40 minutos, na ausência de luz. À massa de óleo de peixe correspondente (com e sem ALT) foram adicionados cristais de corante vermelho nilo (0,05% p/p de óleo) que, com auxílio de agitação manual, foram completamente dispersos no óleo. O óleo de peixe corado foi vertido sobre a dispersão de goma arábica-FITC sob agitação por 10 minutos, seguido de 2 minutos em homogeneizador do tipo Turrax (13.500 rpm). Logo após, foi adicionada a dispersão de maltodextrina e a dispersão contendo os dois polímeros e o óleo de peixe foi agitada por mais 5 minutos sendo, em seguida atomizada em *spray-dryer* Buchi que operou nas condições descritas no item 3.5.

Para a preparação das microcápsulas do complexo caseína-pectina, a solução de FITC (1mg/ml em DMSO) foi adicionada à caseína e os cristais de vermelho nilo (0,05% p/p de óleo) ao óleo de peixe. O procedimento de preparo foi idêntico ao descrito no item 3.4. A atomização e secagem das microcápsulas foram feitas nas condições operacionais descritas no item 3.5.

Todo o processo de preparo de ambas as microcápsulas transcorreu na ausência de luz e o equipamento foi completamente recoberto com alumínio para o procedimento de secagem do material corado.

Amostras de microcápsulas (secas) coradas foram hidratadas com quantidade suficiente de água para o perfeito umedecimento do material e, em seguida, foram distribuídas entre uma lâmina e lamínula e analisadas em um dispositivo de varredura confocal a laser Fluoview V3.3 (Olympus, Japão) acoplado a um microscópio *up-right* BX51 (Olympus). As imagens foram adquiridas por excitação em laser de 488 nm, utilizando-se filtros de emissão em 510-530 nm para o FITC e excitação em laser 530 nm com filtros de emissão em 560-600 nm para o vermelho Nilo (LAMPRECHT; SCHÄFER; LEHR, 2000b).

3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos dados de índice de peróxido e determinação de TBARS foram realizadas usando ANOVA one way seguida do teste de Tukey. Foram considerados com significância estatística os valores de $P < 0,05$ (Anexo 3).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE PEIXE

A caracterização do óleo de peixe por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), seguida da análise qualitativa por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID) está apresentada na Tabela 4. O ácido eicosapentaenóico (EPA), um dos ácidos ômega-3, foi o componente de maior abundância (21,32%); e o ácido docosahexaenóico (DHA) estava presente em menor quantidade (9,4%).

Tabela 4 - Composição e percentual de ácidos graxos identificados na amostra de óleo de peixe.

*	Ácidos graxos		%
1	Ácido mirístico	C14:0	9,4
2	Ácido palmítico	C16:0	15,84
3	Ácido palmitoleico	C16:1	9,67
4	Ácido 7, 10 hexadecaenóico	C16:2	1,5
5	Ácido 4,7,10-hexadecatrienóico	C16:3	1,91
6	Ácido esteárico	C18:0	2,32
7	Ácido oléico	C18:1 (n-9)	11,31
8	Ácido linoleico	C18:2	1,84
9	Ácido linolênico	C18:3	1,06
10	Ácido eicosapentaenóico (EPA)	20:5	21,32
11	Ácido docosahexaenóico (DHA)	22:6	9,4
	Outros		14,44

* números de identificação no cromatograma - Figura 6

A Figura 6 apresenta o cromatograma do óleo de peixe com a identificação de cada componente, conforme a Tabela 4.

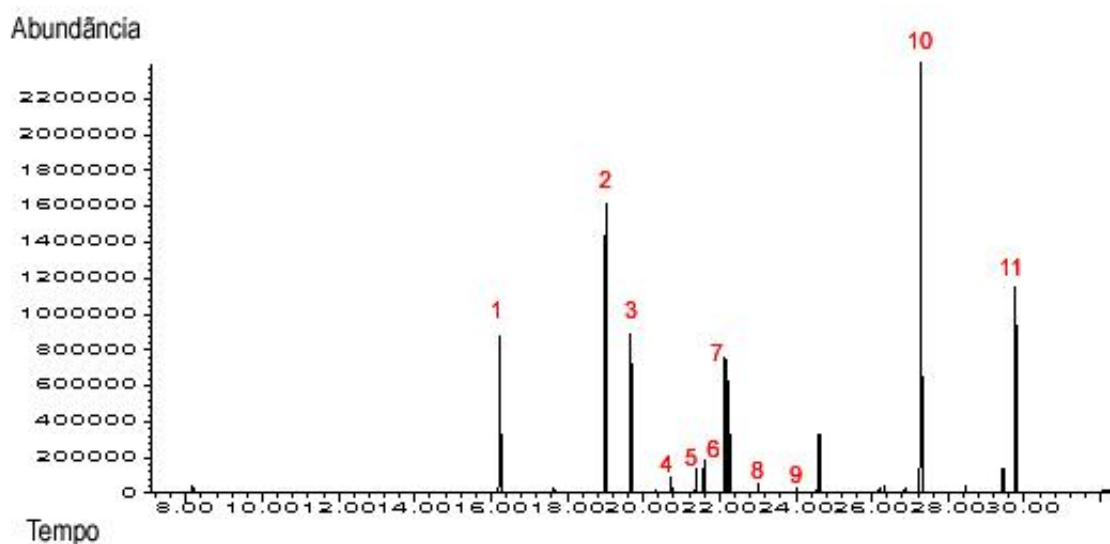


Figura 6 - Cromatograma de íons totais da amostra de óleo de peixe. Os números indicam os componentes identificados por CG-EM conforme a Tabela 4.

4.2 PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO: COMPLEXO CASEÍNA/PECTINA (COACERVAÇÃO COMPLEXA)

Todas as etapas de formação das microcápsulas do complexo caseína-pectina foram acompanhadas por microscopia ótica. Na primeira etapa foi observada a formação das microcápsulas em pH 8,0 (Figura 7A), com perfeita definição das micropartículas formadas. Na Figura 7B, pode-se observar a adição do óleo de peixe à mistura, sob agitação de 400 rpm (IKA, RW-20), enquanto que a Figura 7C apresenta a formação final das microcápsulas após a homogeneização com o auxílio do Turrax.

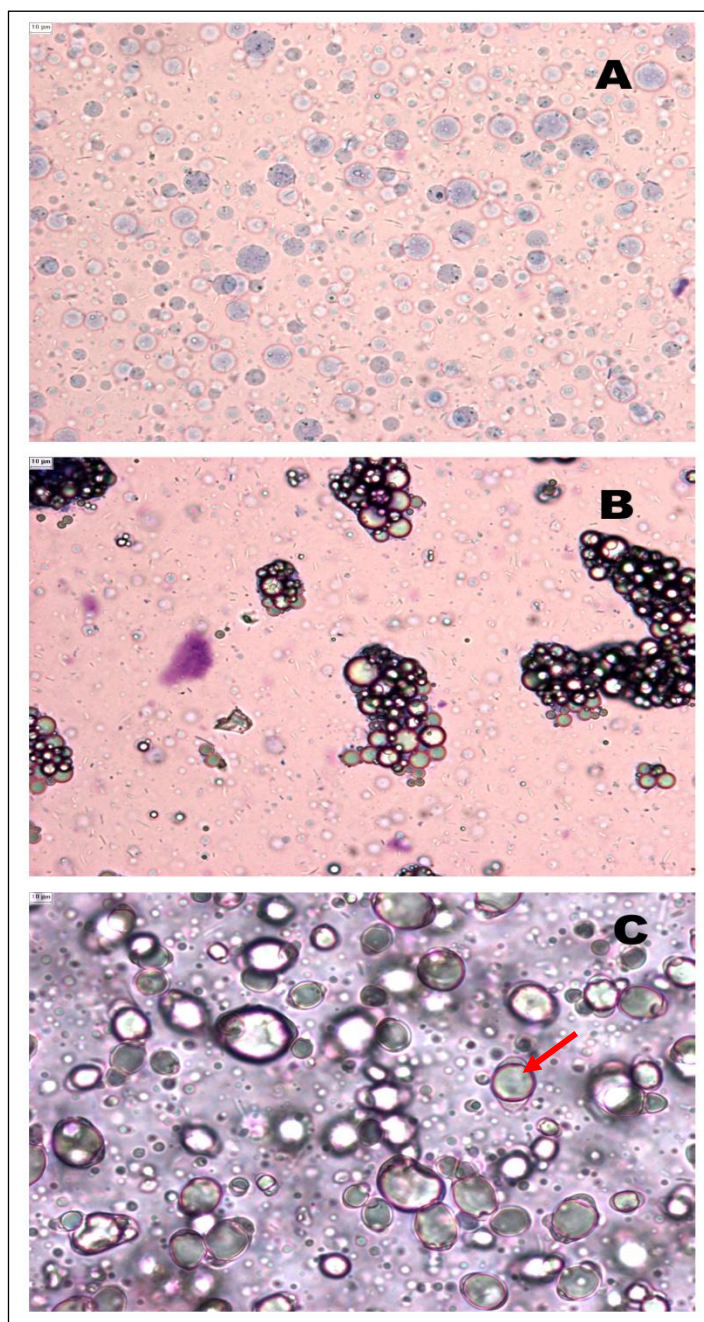


Figura 7 - Fotomicroscopia ótica das microcápsulas obtidas pelo processo de coacervação complexa em pH básico. **A.** Formação das microcápsulas do complexo caseína-pectina (20x); **B.** Após adição do óleo de peixe ao complexo (20x); **C.** Complexo caseína-pectina/óleo de peixe após homogeneização com Turrax (40x).

As Figuras 8A e 8B apresentam as micropartículas após o ajuste do pH da suspensão para 3,5 e a adição da maltodextrina, respectivamente.

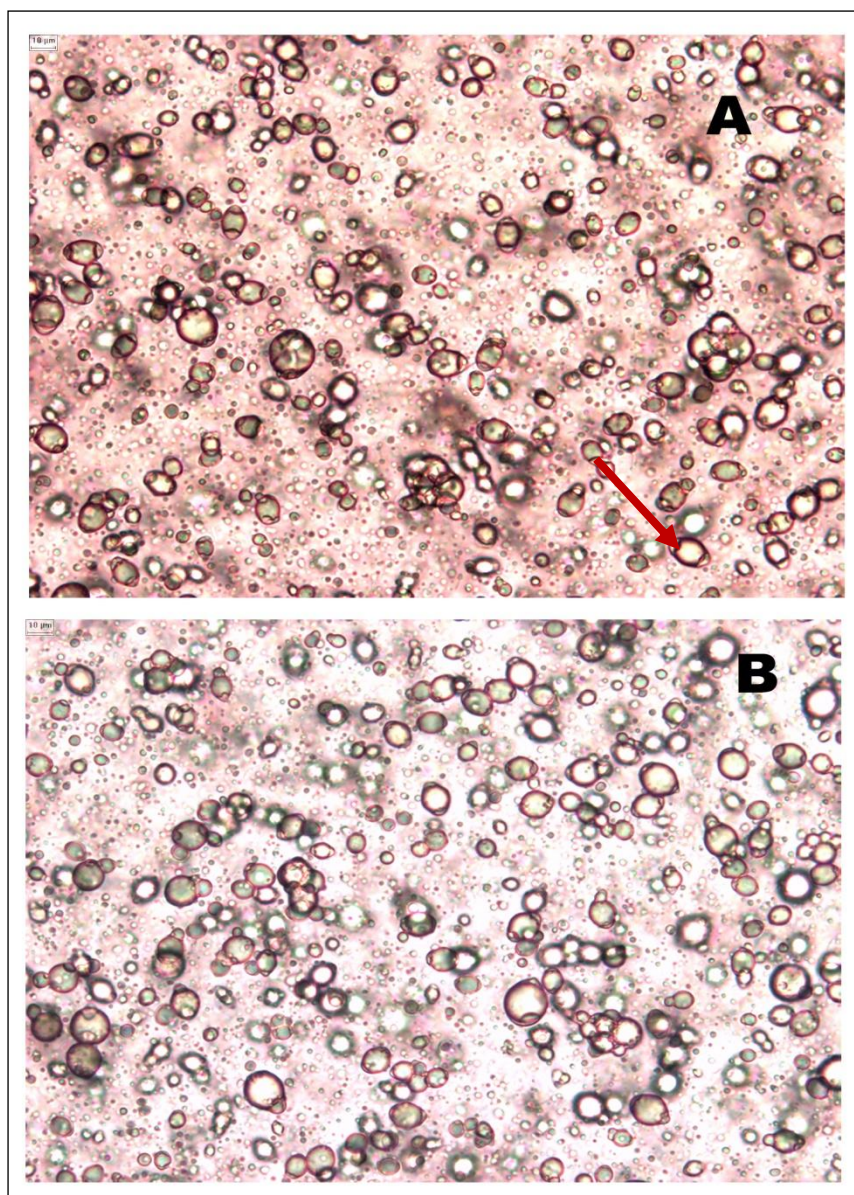


Figura 8 - Fotomicroscopia ótica das microcápsulas obtidas pelo processo de coacervação complexa em pH ácido (3,5). **A.** Microcápsulas do complexo caseína-pectina / óleo de peixe (20x); **B.** Após adição de maltodextrina à suspensão (20x).

4.3 RENDIMENTO

O rendimento médio das três preparações de microcápsulas de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe foi de 6,13%. Em termos de percentuais individuais, a preparação 3 foi a que apresentou melhor rendimento, 9,61%.

Já no processo de secagem do complexo caseína-pectina/óleo de peixe o rendimento médio foi de 16,33%. Em termos individuais, a preparação 5 foi a que apresentou melhor rendimento, 25,54%.

4.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE ÓLEO DE PEIXE

As microcápsulas de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe apresentaram eficiência de encapsulamento do processo de 51,20% para a preparação 1; 56,79% para a preparação 2 e 54,72% para a preparação 3 (Figura 9), e uma eficiência total de encapsulação de 99,61% para a preparação 1, 99,56% para a preparação 2, e 97,11% para a preparação 3.

As preparações do complexo caseína-pectina/maltodextrina/óleo de peixe apresentaram eficiência de encapsulamento de 67,89%, 65,33% e 64,74% para as preparações 4, 5 e 6, respectivamente (Figura 10), e eficiência total de encapsulação de 97,61%, 97,51% e 98,54%.

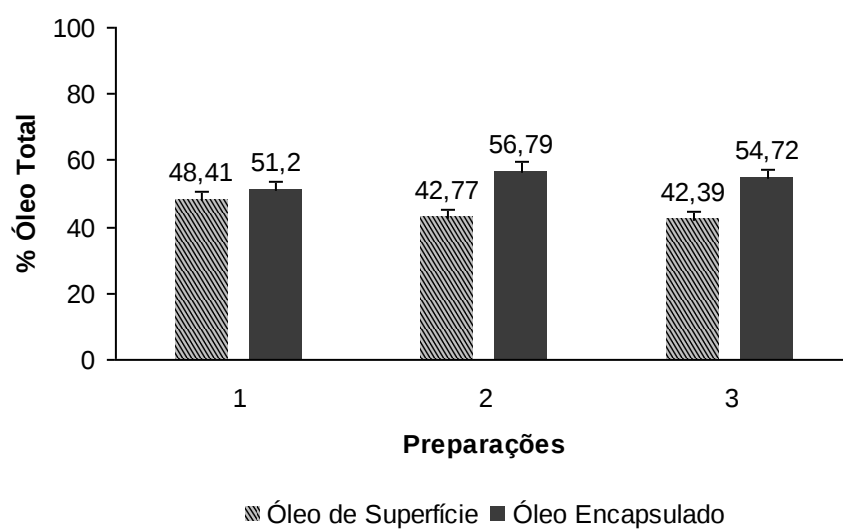


Figura 9 – Gráfico representativo da eficiência de encapsulação das preparações de microcápsulas goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe.

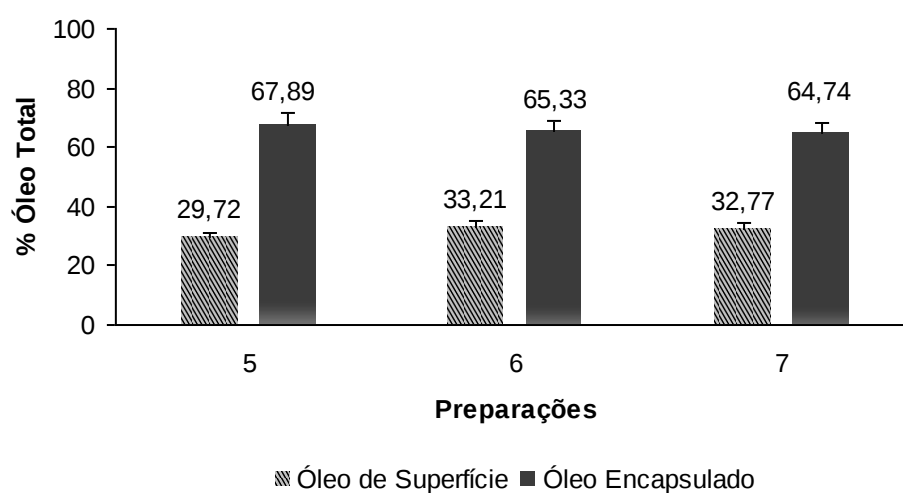


Figura 10 – Gráfico representativo da eficiência de encapsulação das preparações de microcápsulas do complexo caseína-pectina/óleo de peixe

4.5 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DAS MICROCÁPSULAS

O teor de umidade encontrado nas microcápsulas variou entre 5,25 e 6,03% nas seis preparações (Figura 11), apresentando uma variabilidade baixa entre as microcápsulas de mesma mistura de polímeros; 0,41% foi a maior diferença percentual observada, para as microcápsulas de goma arábica-maltodextrina. Nas microcápsulas do complexo caseína-pectina foi observada uma diferença um pouco maior (0,63%).

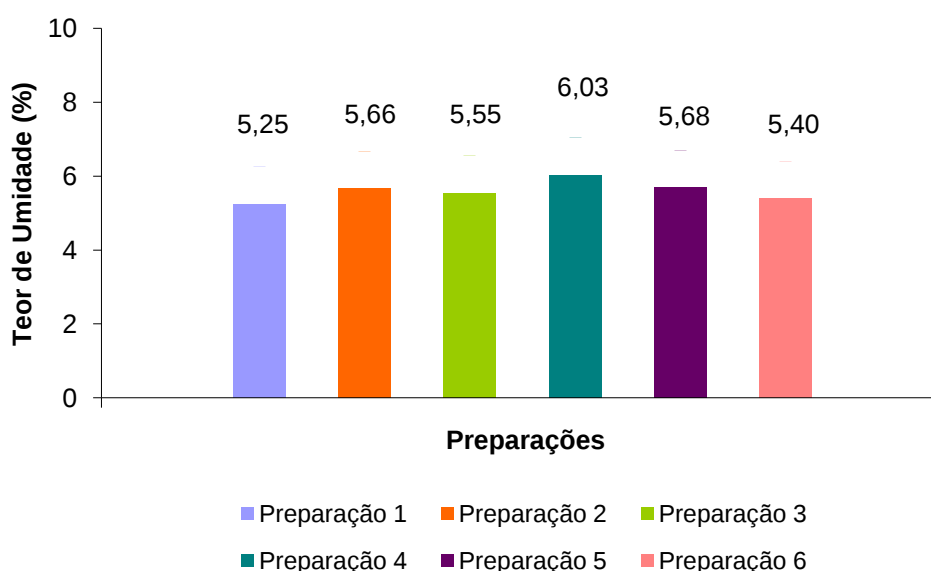


Figura 11 – Gráfico representativo do teor de umidade nas diferentes preparações de microcápsulas.

4.6 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS MICROCÁPSULAS

4.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura das microcápsulas

A avaliação de superfície tanto das microcápsulas de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe, como do complexo caseína-pectina foi realizada por microscopia eletrônica de varredura e pode ser observada na Figura 12.

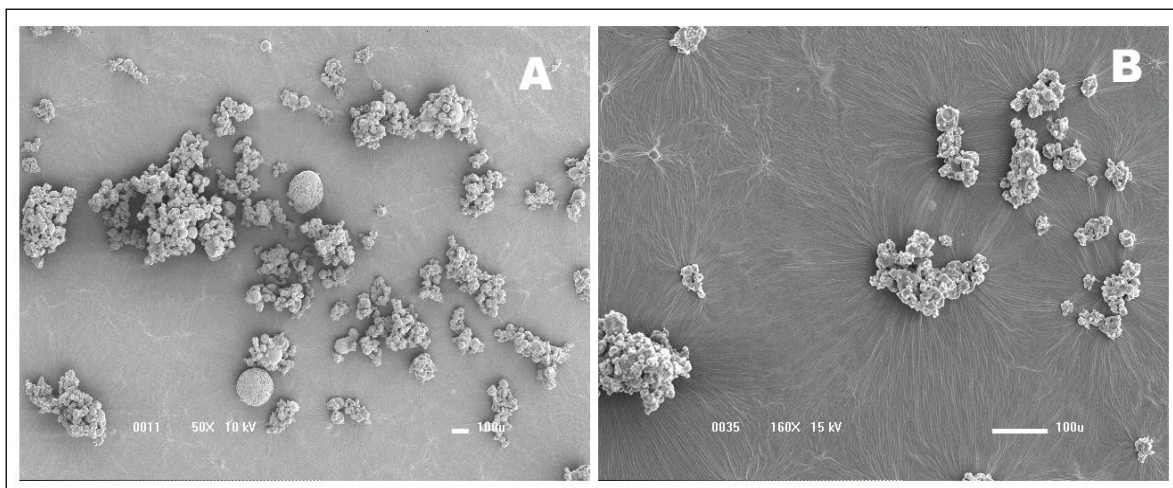


Figura 12 - Fotomicrografias eletrônicas das microcápsulas contendo óleo de peixe. A. Microcápsulas de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe (50x; 10 KV). B. Microcápsulas complexo caseína-pectina-maltodextrina/óleo de peixe (160x; 15 KV).

As microcápsulas de goma arábica-maltodextrina/ óleo de peixe apresentaram uma formato arredondado, com depressões ou deformações em sua superfície. Foi possível observar também, partículas de diferentes tamanhos, sem poros ou rachaduras e de paredes contínuas (Figura 13A e 13B). A Figura 13C ilustra nitidamente a formação da microcápsula, onde foi possível observar uma fina parede que reveste o óleo de peixe aprisionado na microcápsula, indicando a formação de um sistema mononucleado.

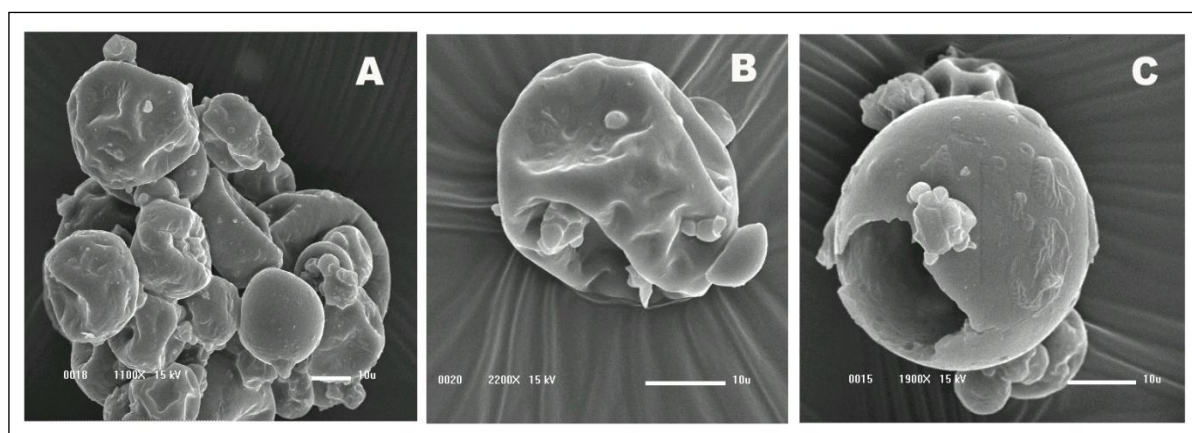


Figura 13 - Fotomicrografias eletrônicas das microcápsulas de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe. A. Aglomerado de microcápsulas (1100x; 15KV); B. Microcápsula em destaque (2200x, 15 KV); C. Microcápsula rompida (1900x, 15 KV).

A Figura 14 ilustra as fotomicrografias eletrônicas das microcápsulas do complexo caseína-pectina-maltodextrina/óleo de peixe, onde é possível observar que as partículas apresentam formato esférico e também depressões na superfície, igualmente às microcápsulas de goma-maltodextrina. As partículas apresentaram a superfície íntegra, sem poros ou rachaduras.

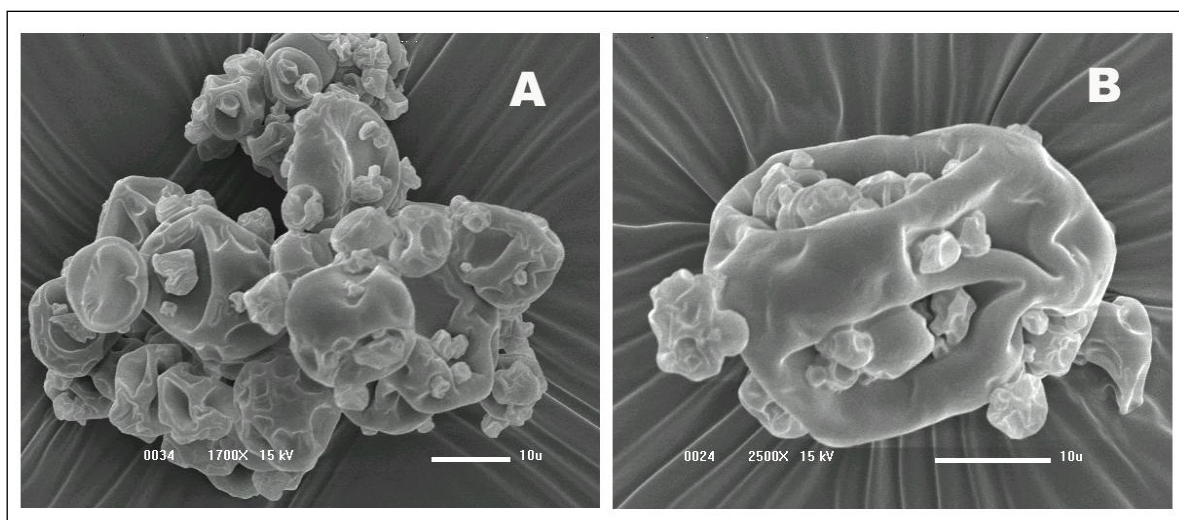


Figura 14 - Fotomicrografias eletrônicas das microcápsulas do complexo caseína-pectina-maltodextrina/óleo de peixe. **A.** Aglomerado de microcápsulas (1700x; 15KV); **B.** Microcápsula em destaque (2500x, 15 KV).

4.6.2 Microscopia confocal a laser das microcápsulas

Os resultados dos cortes seccionais das imagens obtidas a partir da microscopia confocal a laser, apresentados na Figura 15, mostram a mistura polimérica goma arábica-maltodextrina em coloração verde (Figura 15A), o óleo de peixe corado em vermelho (Figura 15B) e na Figura 15C, pode-se observar uma sobreposição de ambas as imagens. A Figura 15F, mostra a imagem de um outro corte onde foi possível visualizar melhor a grande concentração de óleo sobre a superfície da microcápsula (coloração vermelho intensa), que corrobora com os dados encontrados nas análises de óleo de superfície.

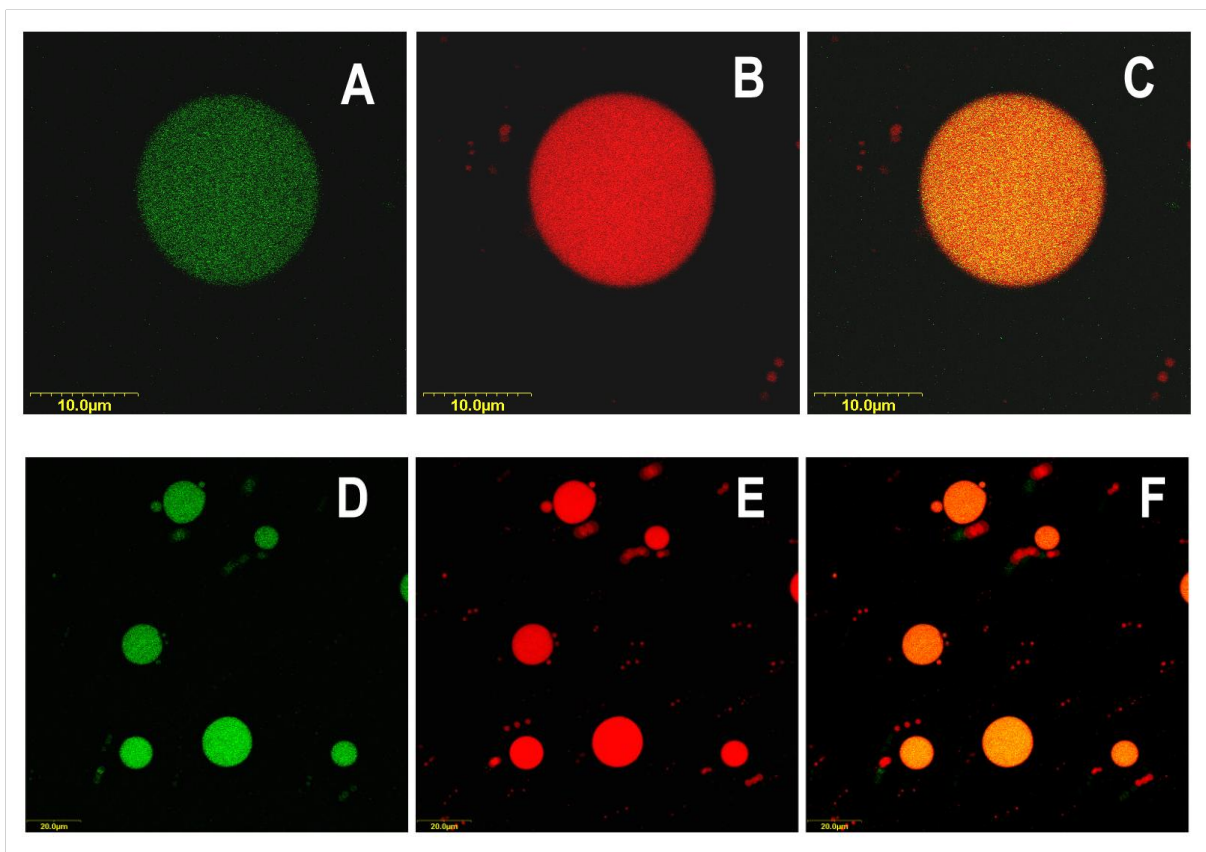


Figura 15 - Imagens obtidas por microscopia confocal a laser das microcápsulas de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe. **A** e **D** - Microcápsulas coradas com FITC (mistura polimérica). **B** - Microcápsulas coradas com vermelho do nilo (óleo de peixe). **C** e **F** - Imagens **A** e **B** e **D** e **E** sobrepostas.

Na Figura 16 pode-se observar as imagens obtidas dos cortes seccionais das microcápsulas com o complexo caseína-pectina-maltodextrina (Figura 16A), o óleo de peixe em cor vermelha (Figura 16B) e a sobreposição dessas imagens representadas na Figura 16C. Neste caso, como no anterior, as imagens sugerem que o óleo de peixe está completamente distribuído na estrutura polimérica, formando um sistema tipo microesfera.

A imagem também apresentou a mesma estrutura morfológica observada pela microscopia ótica (Figura 8, item 4.2), onde as gotículas de óleo envolvidas pelo sistema polimérico formaram uma pequena protuberância na partícula, que como observado na Figura 8A (seta) ocorreu somente para o complexo caseína-pectina.

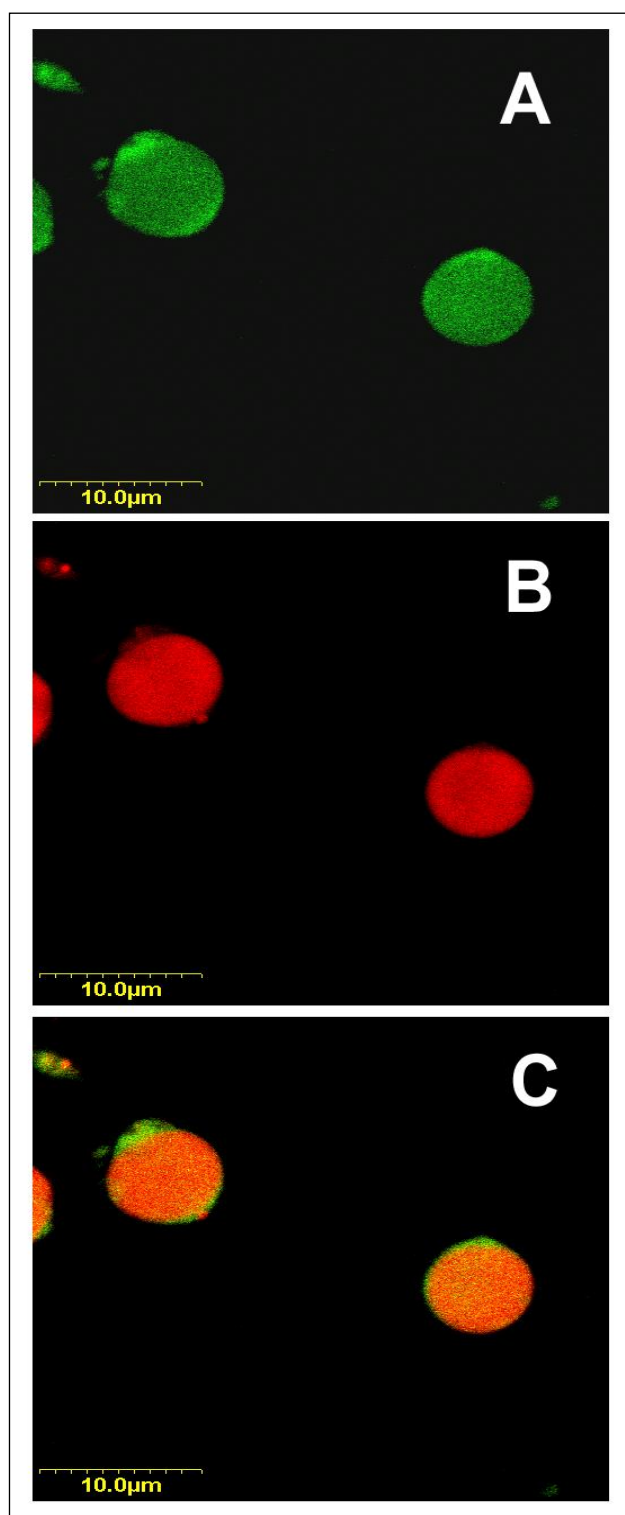


Figura 16 - Imagens obtidas por microscopia confocal a laser das microcápsulas do complexo caseína-pectina-maltodextrina/óleo de peixe **A** - Microcápsulas coradas com FITC (mistura polimérica) **B** - Microcápsulas coradas com vermelho do nilo (o óleo de peixe). **C**. Imagens **A** e **B** sobrepostas.

4.7 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DAS PARTÍCULAS

Na Tabela 5 estão descritos os valores de densidade obtidos para as seis amostras estudadas. As microcápsulas do complexo caseína-pectina-maltodextrina/óleo de peixe apresentaram densidade média de 1,3803 a 1,4418 g/cm³ e para as microcápsulas de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe foram encontrados valores um pouco menores, de 1,2945 a 1,4104 g/cm³.

Tabela 5 - Descrição dos valores médios de volume e densidade das preparações das microcápsulas desenvolvidas.

Preparação	Peso (g)	Volume real (cm ³)	Densidade (g/cm ³)
CP+MD+OP+ALT (1:1:1)	1,5020	1,0649	1,4105
CP+MD+OP sem ALT (1:1:1)	1,6538	1,1471	1,4418
CP+MD+OP+ALT (1:2:1)	1,7138	1,2417	1,3803
GA+MD+OP sem ALT (1:1:1)	1,5761	1,1949	1,3190
GA+MD+OP +ALT (1:1:1)	1,6677	1,2894	1,2945
GA+MD+OP +ALT (1:2:1)	1,3758	0,9755	1,4104

4.8 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS

A determinação da distribuição granulométrica das microcápsulas de óleo de peixe pode ser observada na Tabela 6 e nas Figuras 17 e 18.

As preparações utilizando como polímero a goma arábica e a maltodextrina (Figura 17) formaram microcápsulas com maior distribuição volumétrica. As preparações 1 e 2, apresentaram uma distribuição volumétrica próxima, já a preparação 3 apresentou uma redução significativa em sua distribuição, conforme

pode ser melhor evidenciado através dos valores de d10 e d90, representados na Tabela 6.

Para as preparações com o complexo caseína-pectina (Figura 18) pode-se dizer que a distribuição volumétrica foi menor, quando comparada com as preparações à base de goma arábica-maltodextrina, apesar da preparação 6 possuir uma distribuição um pouco maior, quando comparada à preparação 3, mas bem menor se comparada às preparações 1 e 2 (Tabela 6 e Figura 18).

Tabela 6 – Distribuição do tamanho de partícula entre as preparações de microcápsulas.

μm	Percentual		
	Preparação 1	Preparação 2	Preparação 3
d10	31,36	31,13	13,07
d90	95,73	104,92	58,56

μm	Percentual		
	Preparação 4	Preparação 5	Preparação 6
d10	11,52	2,44	18,60
d90	40,49	38,53	67,94

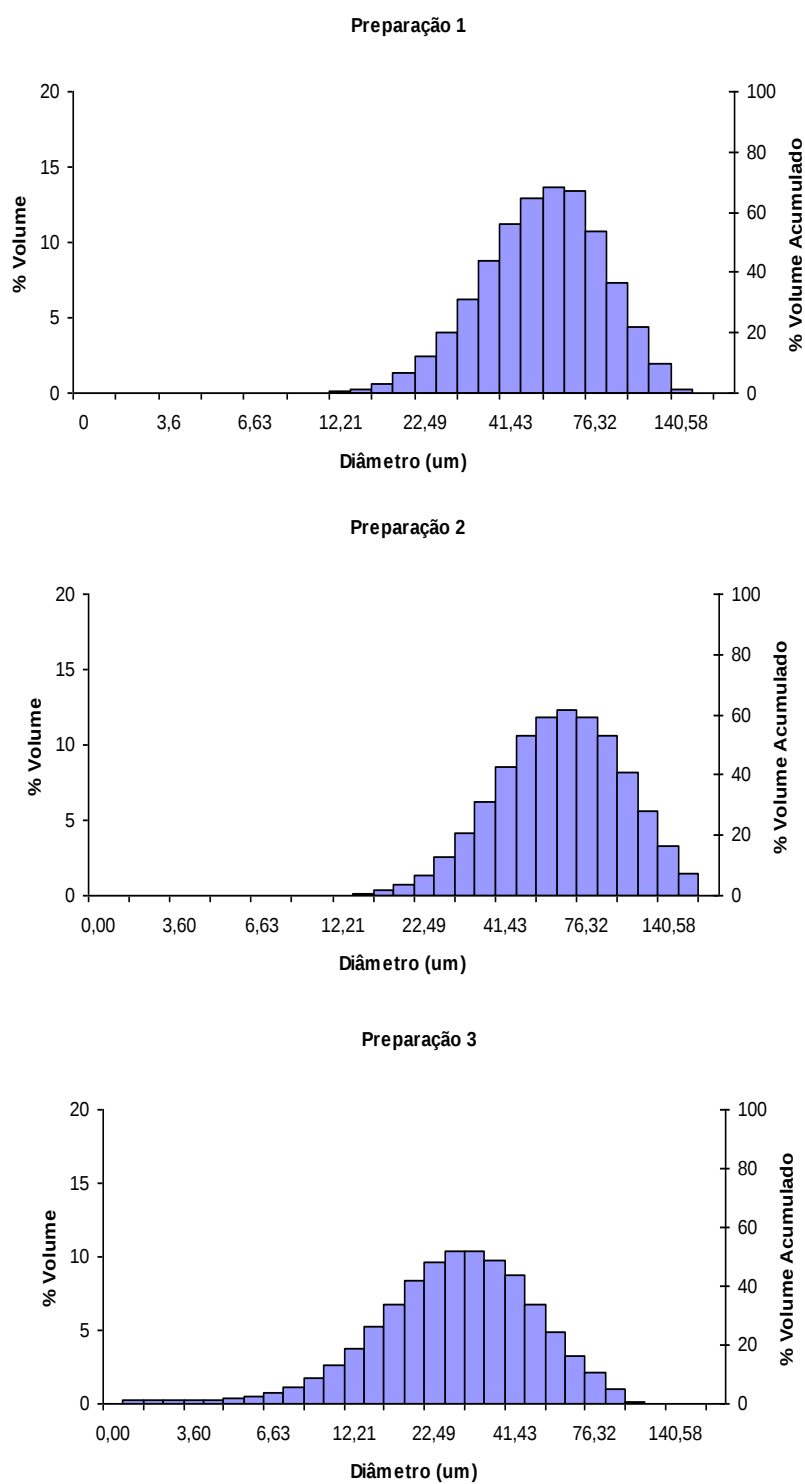


Figura 17 – Distribuição do tamanho de partículas para as preparações de goma arábica-maltodextrina

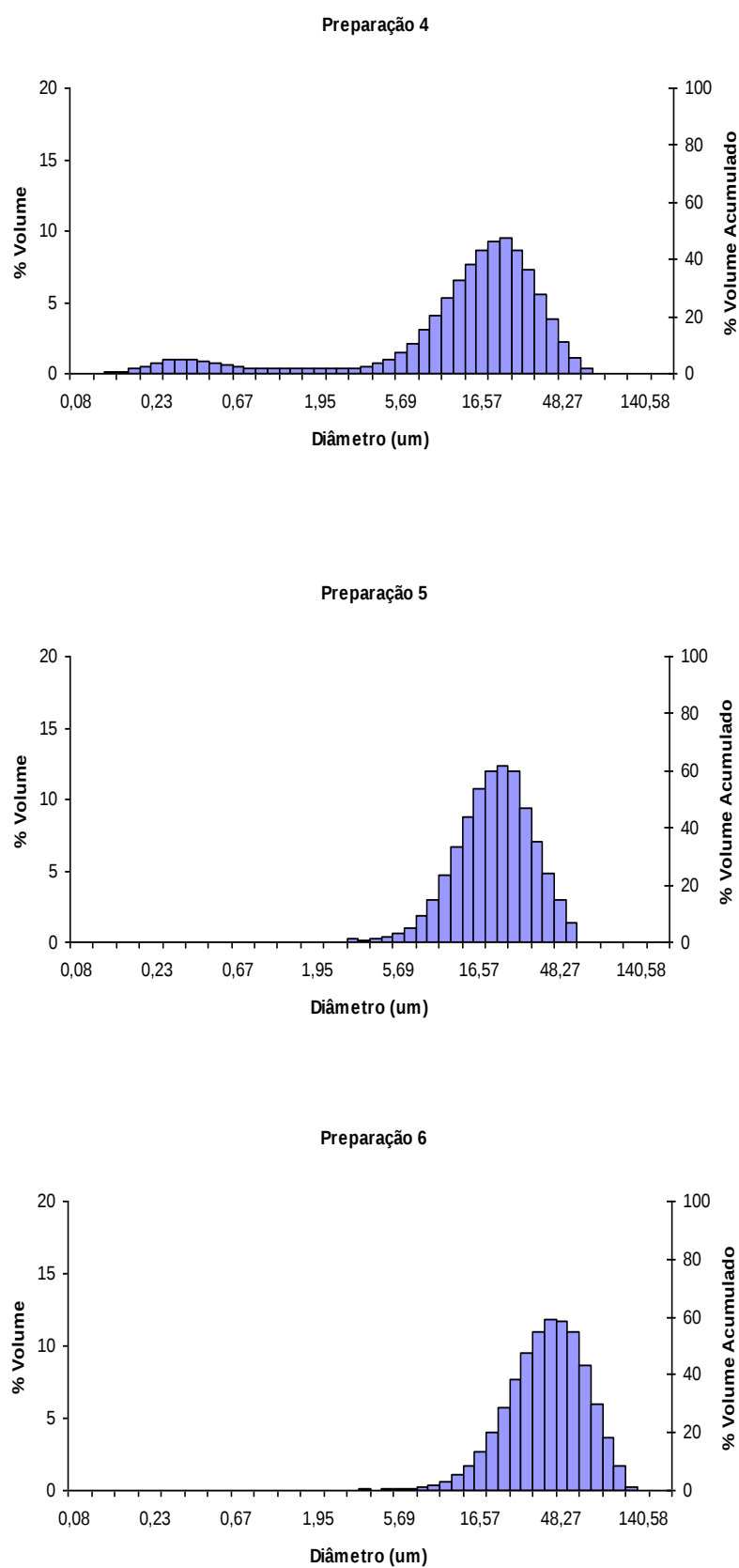


Figura 18 – Distribuição do tamanho de partículas para as preparações com o complexo caseína-pectina

4.9. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DAS MICROCÁPSULAS E DO ÓLEO DE PEIXE APÓS ESTRESSE OXIDATIVO.

4.9.1 Determinação da curva padrão do hidroperóxido de cumeno

A curva analítica média obtida para o hidroperóxido de cumeno está representada na Figura 19. A equação da reta pode ser observada na mesma figura. O valor do coeficiente de correlação linear foi $r = 0,9980$.

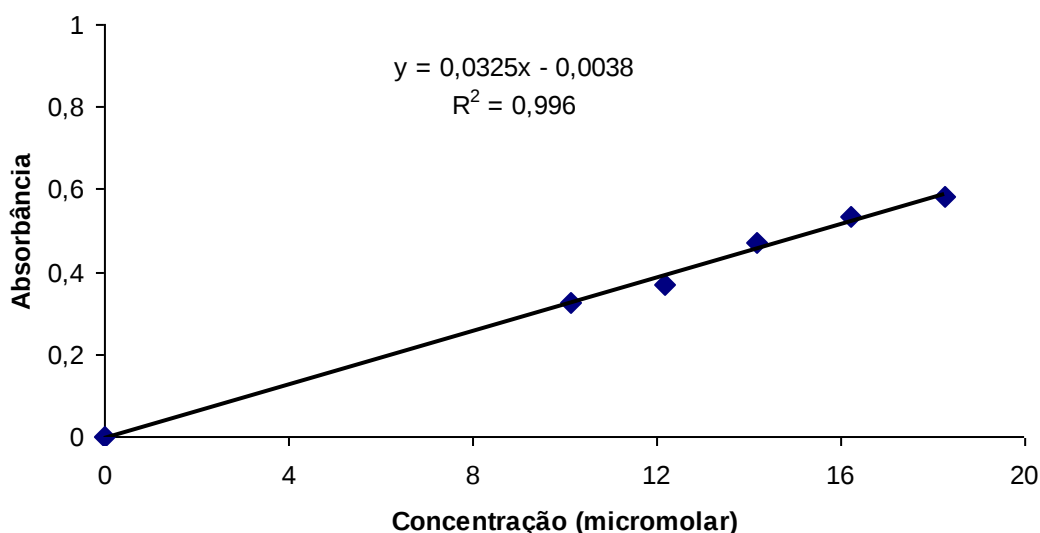


Figura 19 - Curva Padrão do Hidroperóxido de Cumeno.

4.9.2 Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo de peixe

Na Figura 20 estão representados os valores de índice de peróxido encontrados nas amostras de óleo de peixe no período de 28 dias. Foi possível observar um aumento progressivo desses valores durante o período analisado, sendo, no entanto, o período mais crítico entre o 7º e o 14º dia. A partir deste período continua-se observando um crescimento, porém sem significância estatística

($P>0,05$) (Tabela I – Anexo 3) entre as amostras. Perfil semelhante de oxidação foi observado para os valores de TBARS, apesar de no 21º dia ter ocorrido um decréscimo mínimo, em relação ao 14º dia (ver Tabela II – Anexo 1) para a amostra sem antioxidantes (Figura 21), esta diferença não foi estatisticamente significativa ($P>0,05$) (Tabela II – Anexo 3). Foi possível observar também, que não houve diferença estatística significativa entre as amostras de óleo com ou sem antioxidante ($P>0,05$) tanto para o IP quanto para as TBARS. Somente no 28º dia a amostra sem antioxidantes apresentou valores de TBARS maiores ($P<0,05$) frente à amostra com antioxidantes.

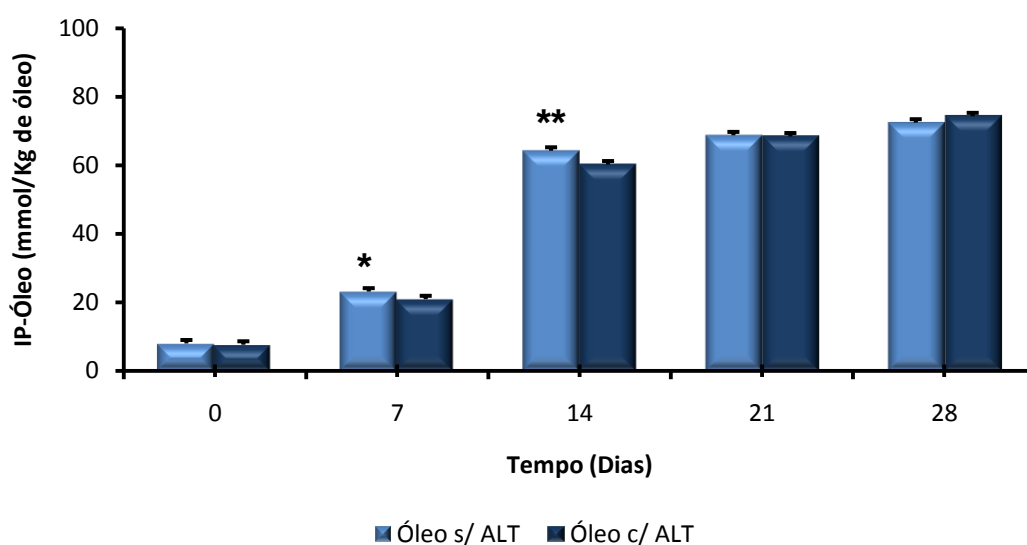


Figura 20 – Valores médios de índice de peróxido nas amostras de óleo de peixe com ou sem antioxidante (ALT), pelo período de 28 dias sob condições de estresse oxidativo. * e ** indicam $P<0,05$ entre os dias.

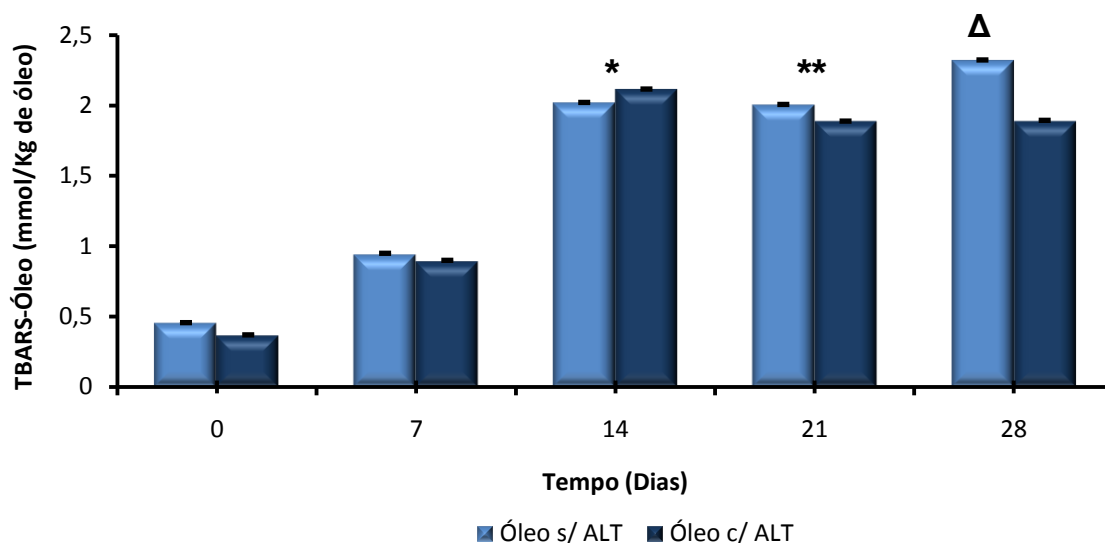


Figura 21 - Valores médios de TBARS nas amostras de óleo de peixe com ou sem antioxidante (ALT), pelo período de 28 dias sob condições de estresse oxidativo. *, **, Δ indicam $P < 0,05$ entre os dias.

4.9.3 Avaliação da estabilidade oxidativa das microcápsulas

No estudo da estabilidade oxidativa das microcápsulas de goma arábica/maltodextrina/óleo de peixe, as análises de índice de peróxido e TBARS foram realizadas tanto para o óleo de superfície quanto para o óleo encapsulado, o que pode ser observado nas Figuras 22, 23 e 24, respectivamente.

Os resultados dos valores de IP do óleo de superfície das três preparações de microcápsulas com goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe mostraram diferenças entre si, como pode ser observado na Figura 22. A preparação 1, sem antioxidantes, manteve inalterado seu perfil oxidativo até o 7º dia ($P > 0,05$) (Tabela III – Anexo 3), a partir daí houve um crescimento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) (Tabela III – Anexo 3) mantendo-se praticamente estável até o 28º dia ($P > 0,05$) (Tabela III – Anexo 3). Já a preparação 2, com antioxidantes, permaneceu até o 14º dia

relativamente estável ($P < 0,05$) (Tabela III – Anexo 3), tendo uma intensa formação de peróxidos a partir do 21º dia. Na preparação 3, com maior quantidade de maltodextrina, observou-se uma intensa formação de peróxidos entre o 7º e 14º dias ($P < 0,05$) (Tabela III – Anexo 3), que atinge um limiar e se mantém linear até o final do experimento ($P > 0,05$) (Tabela III – Anexo 3).

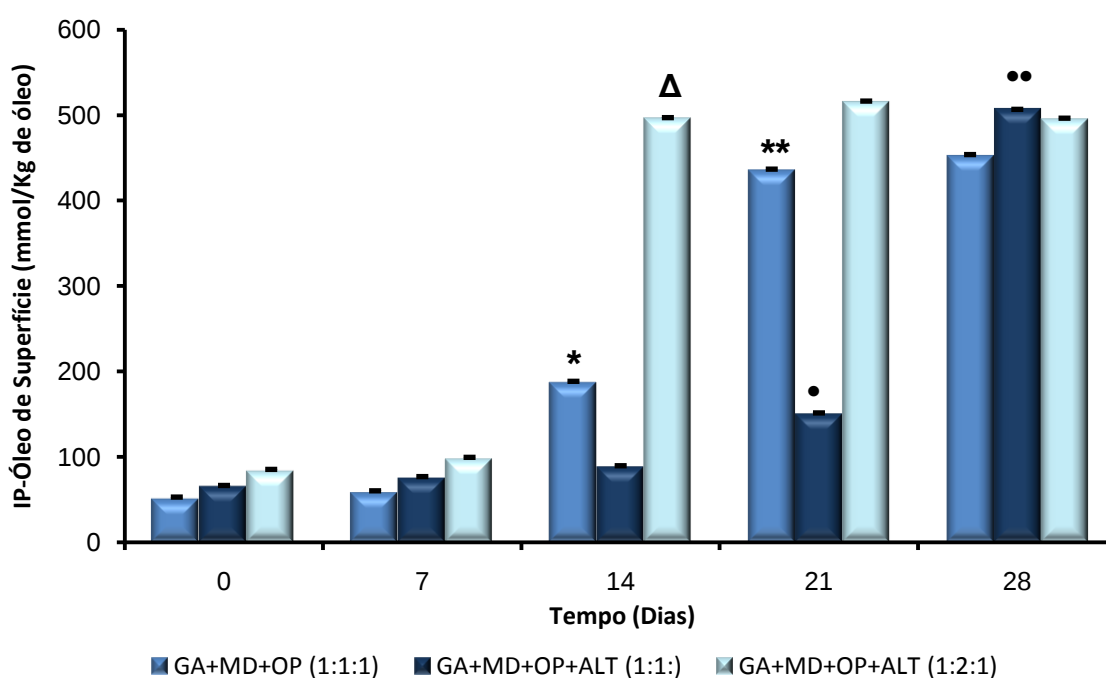


Figura 22 – Valores médios de IP determinados no óleo de superfície das três preparações de microcápsulas goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe, pelo período de 28 dias sob condições de estresse oxidativo. *, **, Δ, •, •• indicam $P < 0,05$ entre os dias.

Já os valores de IP do óleo de peixe encapsulado apresentaram um comportamento mais homogêneo entre si. Como pode ser observado na Figura 23, as preparações apresentaram valores de peróxidos reduzidos e muito próximos até o 14º dia ($P > 0,05$) (Tabela IV – Anexo 3). A partir daí, observou-se uma intensa formação de peróxidos ($P < 0,05$) (Tabela IV – Anexo 3) até o final da avaliação, para

as preparações 1 e 2. Neste período crítico de oxidação, as preparações (1:1:1) com e sem ALT apresentaram comportamentos semelhantes, enquanto a preparação de maior proporção polimérica, apesar de demonstrar o mesmo comportamento, apresentou menores valores de índice de peróxido (Tabela IV – Anexo 1).

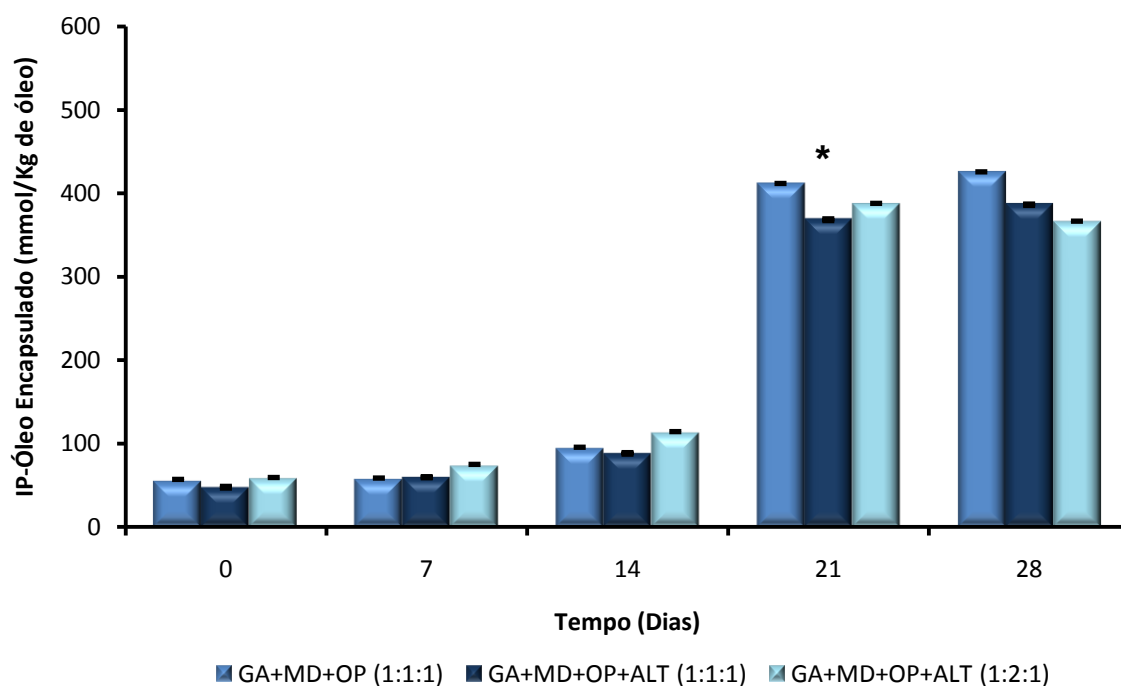


Figura 23 – Valores médios de IP determinados no óleo encapsulado das três preparações de microcápsulas goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe, pelo período de 28 dias sob condições de estresse oxidativo.* indica $P<0,05$ entre os dias.

Os valores de TBARS (Figura 24) para as três preparações apresentaram crescimentos diferentes entre si. As preparações 1 e 2 tiveram comportamento semelhantes entre si, com um ligeiro aumento ($P<0,05$) (Tabela V – Anexo 3) das TBARS na preparação 2 no 14º dia. A preparação 3 teve um aumento significativo a partir do 21º dia até o final do experimento ($P<0,05$) (Tabela V – Anexo 3).

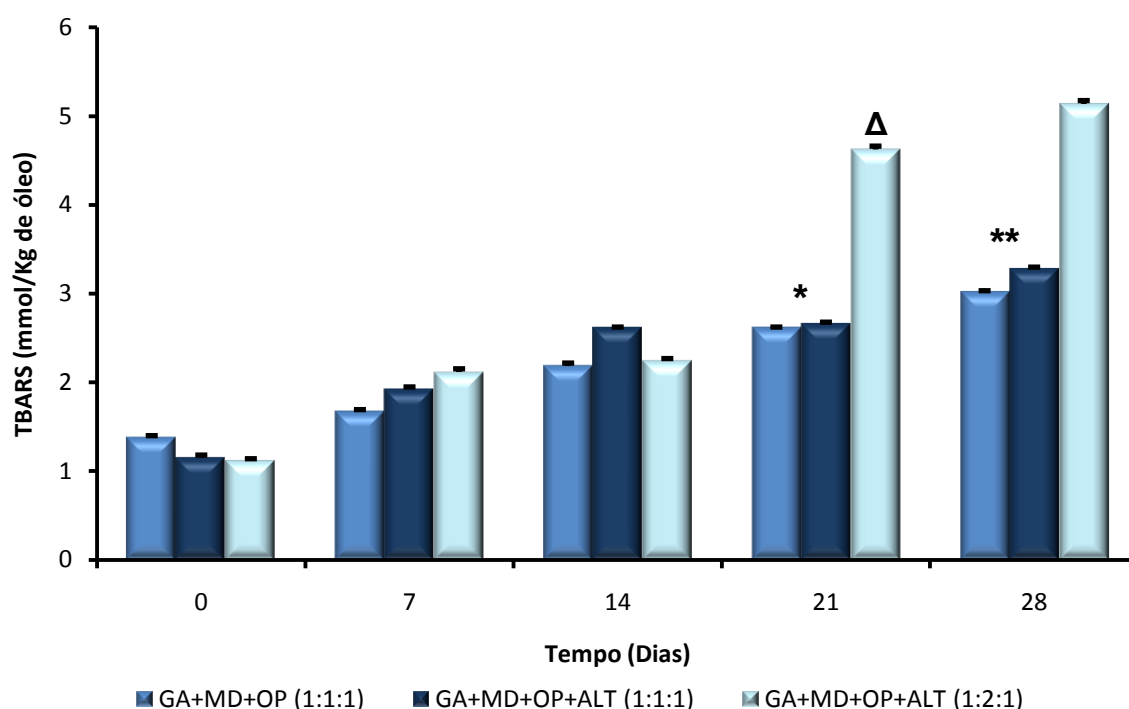


Figura 24 – Estudo da estabilidade das microcápsulas de goma arábica-matodextrina/óleo de peixe através da determinação dos valores médios das TBARS. *, **, Δ indicam $P < 0,05$ entre os dias.

Para as microcápsulas utilizando como polímero o conjugado caseína-pectina, as análises da estabilidade também foram realizadas tanto no óleo de superfície como no óleo encapsulado, o que pode ser observado através das Figuras 25, 26 e 27, respectivamente.

O comportamento do índice de peróxido nas três preparações foi muito parecido entre si para o óleo de superfície (Figura 25), apresentando um crescimento significativo do 14º dia em diante ($P < 0,05$) (Tabela VI – Anexo 3).

O índice de peróxido no óleo encapsulado (Figura 26) também foi muito próximo para as três preparações, mantendo-se bem abaixo dos índices do óleo de superfície e apresentando alguma formação significativa de peróxidos apenas a partir do 21º dia em diante ($P < 0,05$) (Tabela VII – Anexo 3). Já para as TBARS (Figura 27) houve um crescimento significativo ao longo do período, mantendo-se estável

apenas entre o 7º e o 14º dia e o 21º e 28º dias ($P>0,05$) (Tabela VIII – Anexo 3), para as preparações 2 e 3. A preparação 1, sem adição de antioxidantes, manteve-se estável até o 7º dia ($P>0,05$), teve um aumento das TBARS no 14º dia ($P<0,05$), mantendo-se novamente estável até o 21º ($P>0,05$), e apresentando um novo crescimento a partir do 21º até o 28º dia ($P<0,05$) (Tabela VIII – Anexo 3).

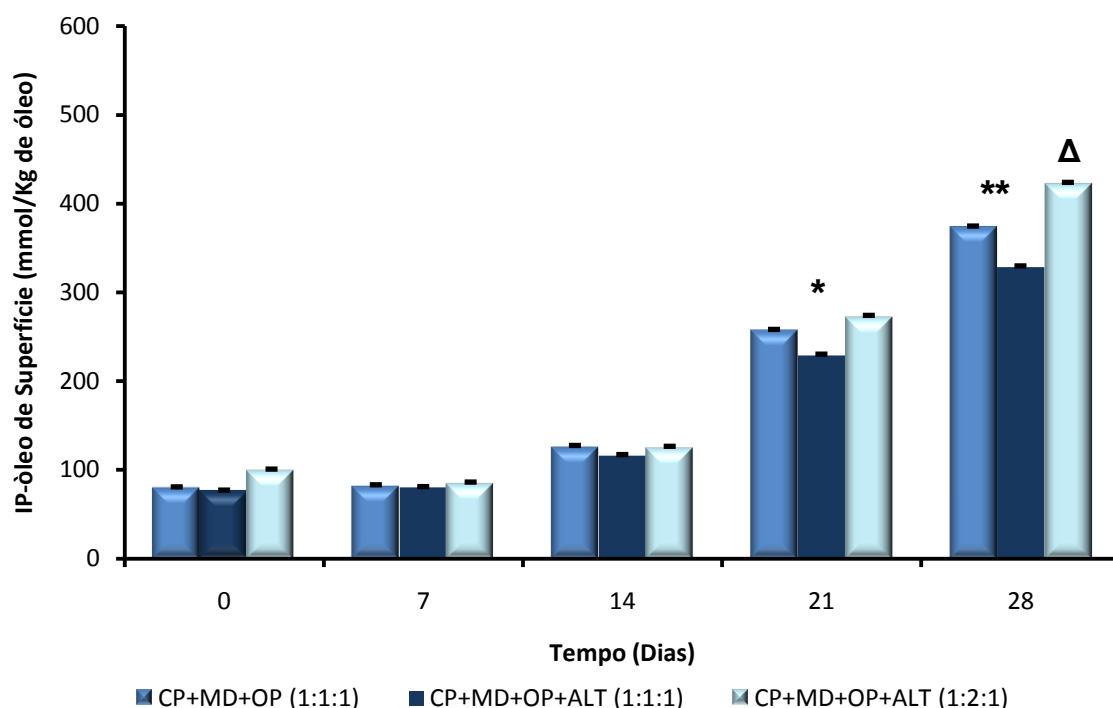


Figura 25 – Valores médios de IP determinados no óleo de superfície das três preparações de microcápsulas do complexo pectina-caseína/maltodextrina/óleo de peixe, pelo período de 28 dias sob condições de estresse oxidativo. *, **, Δ indicam $P<0,05$ entre os dias.

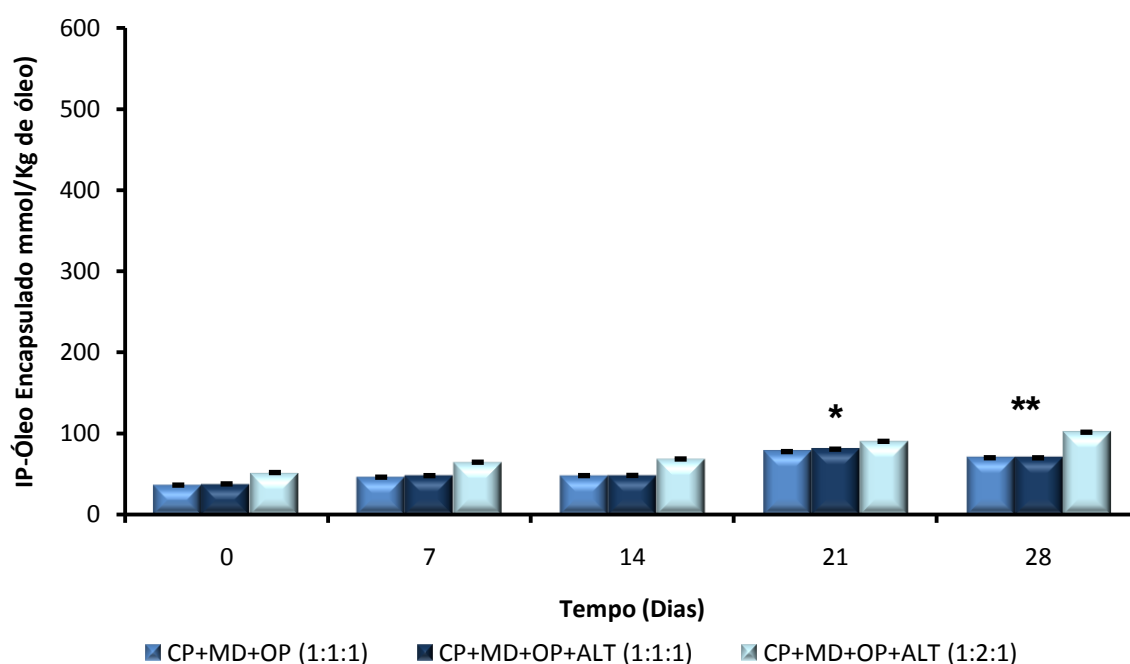


Figura 26 – Valores médios de IP determinados no óleo encapsulado das três preparações de microcápsulas do complexo pectina-caseína/maltodextrina/óleo de peixe, pelo período de 28 dias sob condições de estresse oxidativo. *, **, indicam $P < 0,05$ entre os dias.

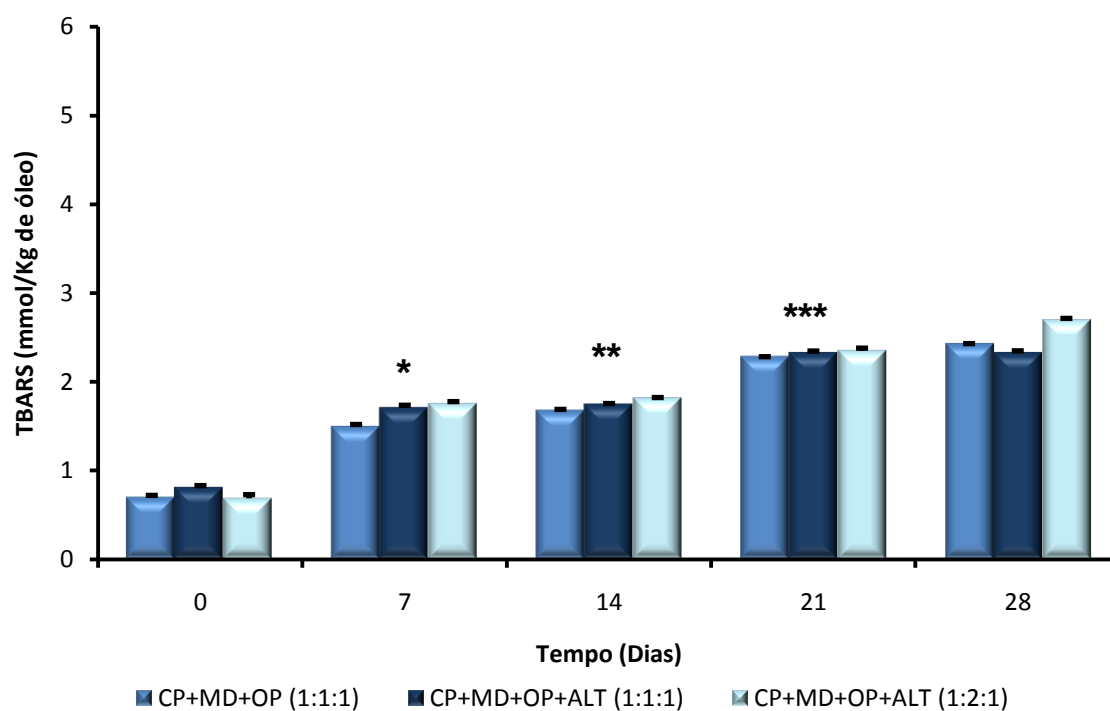


Figura 27 – Estudo da estabilidade das microcápsulas do complexo caseína-pectina/maltodextrina/óleo de peixe através da determinação dos valores médios das TBARS. *, **, *** indicam $P < 0,05$ entre os dias.

5 DISCUSSÃO

Os estudos relacionados aos ácidos graxos poliinsaturados vêm aumentando significativamente, ao longo dos anos em função da importância dessas substâncias para o desenvolvimento celular e de sua importância nutricional e terapêutica (ANAMNART *et al.* 1998). Estes estudos, relacionados principalmente aos ácidos graxos ω -3 e ω -6, demonstram efeitos importantes na prevenção de doenças cardiovasculares (INDARTI *et al.* 2005).

A caracterização química desses compostos é uma etapa fundamental na identificação da presença dos ácidos graxos ácido linoléico, α -linolênico, e, principalmente, EPA e DHA no concentrado de óleo de peixe (INDARTI *et al.* 2005).

Um dos procedimentos mais comuns para a análise da composição dos ácidos graxos é a preparação de metil ésteres, através de uma reação de derivatização, e posterior identificação através de CG-EM. A análise quantitativa é realizada pela avaliação das áreas dos picos obtidos por cromatografia em fase gasosa (CG-FID) (HARTMAN & LAGO, 1973). O emprego desta metodologia permitiu a identificação quantitativa dos principais ácidos graxos presentes na amostra de óleo de peixe, como apresentado na Tabela 4 e na Figura 6. O EPA e o DHA, os principais ácidos graxos ω -3, foram encontrados nas proporções de 21,32% e 9,4%, respectivamente, totalizando mais de 30% de ácidos graxos ω -3 presentes na amostra do concentrado de óleo de peixe. A concentração de ácidos graxos, especialmente do tipo ω -3 e ω -6, pode variar muito dependendo do tipo de peixe de onde o óleo é extraído. O EPA pode variar de 7 a 25% e o DHA de 3 a 26%, como mostra o trabalho de Kamal-Eldin e Yanishlieva (2002). Na literatura, a concentração destes ácidos nas amostras de óleo utilizadas em diferentes estudos também varia

muito, os valores encontrados estão próximos das concentrações descritas por Drusch e colaboradores (2006 e 2009).

Apesar da importância nutricional e na saúde humana, a principal desvantagem dos ácidos graxos poliinsaturados é o processo de deterioração oxidativa, o qual resulta na perda dos valores nutricionais dessas substâncias e na formação de odores e sabores altamente desagradáveis para o consumo (VELASCO; DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUIZ, 2000).

Dentre as alternativas mais utilizadas na tentativa de minimizar o processo oxidativo, estão a adição de agentes antioxidantes, podendo-se destacar dentre estes o α -tocoferol, o δ -tocoferol, o ácido ascórbico e o palmitato de ascorbila (JACOBSEN *et al.*, 2008; BARTEE; KIM; MIN, 2007; HAMILTON *et al.*, 1998) e a microencapsulação (DAVIDOV-PARDO *et al.*, 2008; DRUSCH & SCHWARZ, 2006; KOLANOWSKI, LAUFENBER; KUNZ, 2004; JÓNSDÓTTIR; BRAGADÓTTIR, ARNARSON, 2005). A utilização conjunta destes dois recursos também pode ser empregada, como no trabalho de Baik e colaboradores (2004) que analisaram os efeitos antioxidantes do palmitato de ascorbila e do tocoferol na estabilidade oxidativa de óleo de peixe microencapsulado.

Dentre os diversos métodos de preparação das microcápsulas, a atomização por *spray-drying* tem sido o mais utilizado, em função de sua eficiência e rendimento, da boa qualidade do pó obtido (WATANABEA *et al.*, 2004) e da mais fácil transposição para escala industrial. A técnica de *spray drying* pode ser empregada tanto para a formação de micropartículas, no caso das preparações de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe, como para a secagem de micropartículas obtidas por outra técnica, como nas preparações do complexo caseína-pectina-maltodextrina/óleo de peixe (coacervação complexa).

As três preparações de micropartículas de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe foram obtidas pelo processo de atomização por *spray-drying* e o rendimento médio das preparações foi de 6,13%. Este percentual foi baixo em relação ao teor de sólidos totais presentes nas amostras, mesmo tratando-se de escala laboratorial. Muitos são os fatores que podem ter contribuído para este baixo rendimento como, por exemplo, os parâmetros operacionais de atomização/secagem e a relação entre as concentrações do material de parede e do material nuclear. Das três preparações obtidas, a preparação 3 (GA/MD/OP + ALT (1:2:1)) foi a que apresentou melhor rendimento, assim seria possível considerar que a redução de óleo em relação ao material de revestimento possa melhorar o rendimento.

As micropartículas com o complexo caseína-pectina-maltodextrina/óleo de peixe foram obtidas pelo processo de coacervação complexa, seguido de secagem através da atomização por *spray-drying*,

O processo de formação das micropartículas iniciou-se em pH alcalino (pH 8,0), onde foi observado que o sistema apresenta um processo dinâmico de formação de gotículas esféricas e paredes bem definidas (Figura 7A). Com a adição do óleo de peixe, mantendo a agitação de 400 rpm, as gotículas formaram aglomerados (Figura 7B), e após a homogeneização com auxílio de um agitador do tipo Turrax, os aglomerados foram desfeitos e assim foi possível observar a formação das micropartículas. Para uma melhor visualização microscópica, evidenciando as gotículas de óleo de peixe envolvidas pelo complexo caseína-pectina (seta Figura 7C), utilizou-se o corante de contraste (panótico rápido nº 2). Após a redução do pH da dispersão para 3,5, visualizou-se uma redução do tamanho das micropartículas sem alteração da forma e, neste caso, com auxílio do

corante de contraste, foi possível observar claramente a gotícula de óleo aprisionada pelo complexo que forma pequenas protuberâncias nas laterais como observado pela indicação da seta na Figura 8A. Segundo Redigueri (2008) durante a formação do complexo caseína-pectina ocorre que, em pH 8, a pectina (pK_a dos grupos carboxílicos em torno de 3) e a caseína ($pI \sim 4,6$), estão negativamente carregadas e desta forma a incompatibilidade termodinâmica ocorre devido a presença de zonas de depleção formadas. À medida que o pH é reduzido, a caseína se torna menos negativa, e a presença de regiões positivas nas moléculas de proteínas é capaz de atrair a pectina negativamente carregada. Esta atração se torna mais forte com a redução do pH abaixo do ponto isoelétrico, quando a caseína (anfótera) se torna positiva.

Com a adição de maltodextrina não se observou microscopicamente qualquer alteração na estrutura das micropartículas, uma vez que esta deveria estar completamente solúvel no meio aquoso (Figura 8B) e, após o processo de secagem, se depositaria sobre a parede das micropartículas formadas.

No processo de secagem do complexo caseína-pectina-maltodextrina/óleo de peixe o rendimento médio foi de 16,33%. Em termos individuais, a preparação 5 (CP/MD/OP + ALT (1:1:1)) foi a que apresentou melhor rendimento, 25,54%, que é um bom rendimento para uma escala laboratorial, considerando o teor de sólidos totais presentes na preparação. Mais uma vez os parâmetros relacionados às condições de secagem podem ter interferido no rendimento final das preparações.

Com relação à eficiência do processo de microencapsulação os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre as preparações de mesma mistura de polímeros, porém houve diferença entre as diferentes misturas poliméricas. Ainda assim, esses valores foram mais baixos em comparação aos

dados de literatura. Hardas e colaboradores, em diferentes estudos de microencapsulação da gordura do leite, utilizando uma mistura de lecitina, caseinato de sódio e xarope de milho (DE 36), apresentaram resultados de eficiência de encapsulação semelhantes: 95-98% (HARDAS *et al.*, 2000) e de 96,5% (HARDAS *et al.*, 2002). Baik e colaboradores, em 2004, no entanto, encontraram resultados um pouco mais baixos para microencapsulação de óleo de peixe, utilizando uma composição polimérica semelhante à anterior, adicionada de sílica (CAB-O-SIL), em torno de 88%.

No entanto, as análises dos resultados de óleo de superfície demonstraram que as micropartículas do complexo caseína-pectina foram mais eficientes, pois o percentual de óleo de peixe na superfície foi menor (variando entre o mínimo de 29,72% e o máximo de 33,21% (Figura 10) que os valores obtidos nas micropartículas de goma arábica que chegaram próximo a 50% (Figura 9). Todas as preparações, porém, apresentaram valores superiores ao descrito por Heinzelmann e colaboradores (2000), cujos valores percentuais variaram de 5,7 a 18,9% em emulsões de lactose ou maltodextrina contendo óleo de peixe, secas por liofilização.

Na tentativa de visualizar melhor a eficiência do processo de microencapsulação do óleo de peixe e o tipo de microcápsulas obtidas, foi realizada a análise morfológica das mesmas. Esta análise foi realizada por duas técnicas distintas: a microscopia eletrônica por varredura (MEV) e a microscopia confocal a laser que atuam de forma complementar. A MEV permite a visualização externa da superfície das microcápsulas, e a microscopia confocal a laser permite avaliar, com auxílio dos corantes, se o material lipídico está no interior da partícula ou distribuído na mesma.

Na técnica de microscopia eletrônica por varredura as amostras precisam ser preparadas adequadamente antes das análises microscópicas. Assim, as micropartículas foram previamente revestidas com ouro em um sistema à vácuo, e depois as imagens eletrônicas (fotomicrografias) capturadas através do microscópio eletrônico.

A avaliação de superfície tanto das micropartículas de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe, como do complexo caseína-pectina/maltodextrina/óleo de peixe mostrou que ambos os sistemas apresentaram um pó coeso, formando grandes aglomerados de partículas (Figura 12). Este fenômeno ocorre possivelmente porque ambos os sistemas de micropartículas apresentaram um grande conteúdo de óleo na superfície, o que pode ser um fator determinante para a aglomeração observada.

De maneira geral os trabalhos da literatura utilizando polímeros naturais como a goma arábica, maltodextrina, gelatina ou pectina, para revestimento de material de caráter hidrofóbico (óleos graxos ou essências) não descrevem a formação de aglomerados (KRISHNAN; BHOSALE; SINGHAL, 2005; RAMOS, 2006; DRUSCH, 2007). Para o complexo caseína-pectina, no entanto, há uma tendência maior de coesão entre as partículas, que pode aumentar quanto maior for o caráter hidrofóbico da substância a ser encapsulada (MARRETO, 2006). Os dados de literatura, portanto, fortalecem a hipótese de que a aglomeração observada em ambos os tipos de sistema de microencapsulação pode ser devido ao elevado teor de óleo na superfície das micropartículas.

De acordo com as imagens obtidas nas Figuras 12A e 12B foi possível observar as micropartículas de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe com um formato ligeiramente arredondado e com depressões ou deformações em sua

superfície, devido, provavelmente, à rápida saída do solvente durante o processo de secagem. Foi possível observar também, partículas de diferentes tamanhos, de paredes contínuas e sem poros ou rachaduras. Estruturas morfológicas semelhantes já foram descritas na literatura para a goma arábica (DRUSCH *et al.*, 2006; KANAKDANDE; BHOSALE; SINGHAL, 2007). Pela análise morfológica não foi possível notar diferença na superfície das micropartículas pela presença da maltodextrina. O que foi observado é que algumas partículas apresentaram-se com a parede mais lisa (Figura 13A) semelhantes às descritas na literatura para micropartículas de maltodextrina.

A Figura 13C apresenta a fotomicrografia de uma partícula “quebrada”, mostrando um sistema mononucleado (microcápsula). Vale ressaltar, que esta imagem foi obtida pelo esmagamento de uma amostra de microcápsulas antes do preparo das amostras para a microscopia, com o objetivo de visualizar o sistema formado.

As imagens obtidas do complexo caseína-pectina/maltodextrina/óleo de peixe, mostraram partículas de formato esférico com depressões na superfície, da mesma forma que para as microcápsulas de goma arábica/maltodextrina, pode ter ocorrido, devido à rápida saída do solvente durante o processo de secagem. Não foi possível, neste caso, a obtenção de imagens de partículas “quebradas” ainda que algumas amostras de microcápsulas tenham sido submetidas à pulverização em almofariz e ao corte com auxílio de um estilete. Uma possibilidade a ser averiguada futuramente seria emblocar as microcápsulas em resinas e realizar cortes em micrótomo. Não foi observada nenhuma alteração morfológica com a adição da maltodextrina ao complexo, uma vez que as características morfológicas observadas são semelhantes às descritas para microcápsulas do complexo caseína-pectina-

maltodextrina (BARACAT, 2004; MARRETO, 2006; OLIVEIRA, 2006; CAMILO, 2007).

As imagens obtidas através da microscopia confocal a laser para as microcápsulas goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe sugerem que o óleo de peixe está completamente distribuído na estrutura polimérica, formando um sistema tipo microesfera, o que difere do resultado observado na microscopia eletrônica. Além disso, a formação de sistema do tipo microcápsula é esperada quando se utiliza a técnica de atomização de dispersões de polímeros e estes resultados estão bem evidenciados na literatura. Ramos (2006) observou a formação do sistema tipo microcápsulas utilizando a goma arábica na encapsulação de óleo volátil; Kolanowski e colaboradores (2004) empregando celulose modificada; e Drusch e Schwartz (2006) observaram o mesmo sistema utilizando derivados do amido. Acredita-se que, neste caso, o grande volume de óleo na superfície da microcápsula dificultou a visualização do sistema mononuclear na microscopia confocal. Isto fica melhor evidenciado na Figura 15F, onde pode-se verificar a grande concentração de óleo na superfície da microcápsula.

No caso do complexo caseína-pectina, assim como no caso anterior, as imagens sugerem que o óleo de peixe está completamente distribuído na estrutura polimérica, formando um sistema tipo microesfera, que foi sugerido por Baracat (2004) e Marreto (2006) em seus estudos com o mesmo complexo. A impossibilidade, até o momento, de visualização morfológica da partícula rompida, somada ao grande volume de óleo na superfície da microcápsula, não permitiram confirmar se o sistema obtido foi realmente do tipo matricial.

A avaliação da distribuição do tamanho de partículas demonstrou que as três preparações de microcápsulas de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe

apresentaram um perfil de distribuição simétrico. O Anexo 2 apresenta os valores tabelados para todos os tamanhos de partículas encontrados. Na preparação 1 o tamanho de partículas variou de 12 a 140 μm , com um maior percentual de volume entre 40 e 90 micrômetros. A preparação 2 apresentou um perfil de distribuição semelhante, porém a distribuição de tamanho de partículas mostrou valores um pouco maiores, variando de 14 até cerca de 160 μm . A distribuição de tamanho de partículas na preparação 3 apresentou os menores valores, de 2 até cerca de 100 μm , com maior percentual de volume entre 25 e 50 micrômetros. Como todas as preparações apresentam o mesmo percentual de polímero e somente a preparação 3 apresenta uma menor concentração de óleo de peixe, pode-se inferir que a concentração de óleo influenciou na redução do tamanho da gotícula durante a homogeneização. Isto é reforçado pelos valores de distribuição de d_{10} e d_{90} (ver Tabela 6) encontrados para as outras duas preparações, que foram muito próximos enquanto os da preparação 3 foram bem menores. Como em todas as preparações a velocidade e o tempo de agitação e homogeneização foram os mesmos, estes resultados sugerem, para a menor concentração de óleo que o cisalhamento promovido pela homogeneização no Turrax, favoreceria a redução do tamanho das partículas.

As preparações do complexo caseína-pectina/maltodextrina/óleo de peixe também apresentaram um perfil de distribuição simétrico. As preparações 4 e 5 apresentaram os menores valores de distribuição de tamanho de partículas, variando de 2 a 65 μm e 3 a 56 μm , respectivamente. Na preparação 4 foi observada a presença de partículas de tamanho entre 0,8 e 2 μm , que não foi observada nas outras duas preparações do mesmo polímero. A preparação 6 foi a que apresentou os maiores valores de tamanho de partículas, variando entre 6,6 até cerca de 120

µm, com maior percentual entre 30 e 65 µm. Estes resultados estão em consonância com o percentual de polímeros das preparações, pois a preparação 3 continha o dobro de maltodextrina que as outras duas preparações. Como foi demonstrado, as micropartículas do complexo foram inicialmente formadas e a maltodextrina adicionada à dispersão se depositou, após a secagem, sobre a superfície das partículas. Desta maneira, o maior percentual de maltodextrina levou a um aumento do tamanho de partículas.

Estes resultados demonstraram também que o processo de obtenção das micropartículas interfere diretamente na distribuição de tamanho de partículas (REDIGUIERI, 2008; MASTERS, 1985).

O estudo de estabilidade das micropartículas foi realizado a fim de avaliar a capacidade de proteção do óleo de peixe encapsulado frente ao processo oxidativo. Os principais fatores que podem interferir acelerando o processo de deterioração oxidativa são, principalmente: luz, temperatura e umidade.

As preparações estudadas apresentaram teor médio de umidade de 5,25 e 6,03%, para as micropartículas de goma arábica-maltodextrina e caseína-pectina/maltodextrina, respectivamente. Estes valores estão um pouco abaixo dos encontrados por Marreto (2006), que foram de aproximadamente 9% para as micropartículas de caseína-pectina, e muito próximos dos encontrados por Ramos (2006) para as microcápsulas de goma arábica. Isto demonstra que os processos de encapsulação e secagem podem ser considerados adequados em relação aos valores de teor de umidade. Vale ressaltar, que a umidade é um dos fatores que podem acelerar o processo oxidativo de produtos lipídicos, pois favorece a autooxidação.

O Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2005) preconiza no estudo de estabilidade acelerada para formas farmacêuticas sólidas as temperaturas de 25⁰C e 40⁰C e umidade relativa (UR) do ar de 75%. Neste estudo foi realizada somente a avaliação da estabilidade na condição mais drástica, ou seja, 40⁰C e 75% de UR por um período de aproximadamente 30 dias.

Os produtos primários resultantes do processo de peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados são os peróxidos e hidroperóxidos formados, por isso este é um importante parâmetro a ser acompanhado nas amostras lipídicas. O método oficial de determinação de peróxidos em amostras lipídicas baseia-se na oxidação do Iodo (II) em Iodo (III), utilizando-se amostras de cerca de pelo menos 5 g (AOAC, 2000). Em função da necessidade de uma grande quantidade de amostras para a realização do método oficial, utilizou-se a metodologia descrita por Baik e colaboradores (2004), e que tem princípio semelhante ao método oficial, porém através de espectrofotometria, com resultados reprodutíveis.

Outro parâmetro de acompanhamento da estabilidade oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados é através da determinação do malonaldeído (MDA). O MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica, o qual reage com o ácido tiobarbitúrico formando produtos que podem ser determinados espectrofotometricamente na faixa de comprimento de onda de 532 nm (Figura 28).

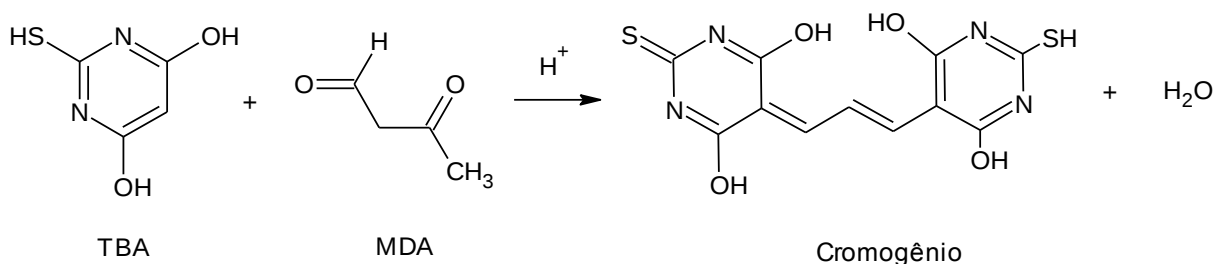


Figura 28 – Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido medido espectrofotometricamente a 532 nm (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005).

Para a quantificação do índice de peróxidos foi realizada a curva de calibração do hidropéroxido de cumeno, a qual apresentou linearidade, com valor de coeficiente de correlação linear de 0,998, estando dentro do padrão aceitável da ANVISA. A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada (RIBANI *et al.*, 2004).

As análises do IP nas amostras do óleo de peixe apresentaram um aumento progressivo durante o período analisado. Neste período como observado no gráfico da Figura 20, observou-se um processo oxidativo intenso até o 14º dia ($P < 0,05$) (Tabela I – Anexo 3), com valores de 64,23 e 60,22 mmol/Kg para as amostras de óleo de peixe com e sem ALT, respectivamente (ver Tabela I, no Anexo 1). A partir deste ponto a oxidação contínua, porém menos intensa, atingindo valores de 72,44 e 74,31 mmol/Kg para as amostras de óleo de peixe com e sem ALT, respectivamente, ao final dos 28 dias de análise ($P > 0,05$) (Tabela I – Anexo 3). Os resultados para as análises de TBARS apresentaram também uma oxidação crescente até o 14º dia de análise atingindo ($P < 0,05$) (Tabela II – Anexo 3), neste ponto, valores de 2,11 (amostra com ALT) e 2,01 mmol/Kg (amostra sem ALT). Deste ponto em diante se observou uma diminuição destes valores (1,88 mmol/Kg),

seguida de uma estabilização até o 28º dia para a amostra com ALT ($P>0,05$) (Tabela II – Anexo 3). Na amostra de óleo de peixe sem ALT também foi observada uma ligeira redução ($P>0,05$) dos valores de TBARS no 21º dia (1,99 mmol/Kg), seguida de um aumento deste valor (2,31 mmol/Kg) no 28º dia de análise ($P<0,05$) (Tabela II – Anexo 3).

As diferenças observadas entre a amostra com e sem ALT podem estar relacionadas à perda de substâncias voláteis que ocorrem durante o processo. Os resultados de ambas as análises realizadas demonstraram que não houve diferença significativa ($P>0,05$) (Tabela I – Anexo 3) entre os valores encontrados para as amostras de óleo de peixe com ou sem antioxidante, evidenciando que a mistura de antioxidante utilizada não influenciou na oxidação do óleo de peixe.

A ação dos antioxidantes no óleo de peixe varia muito e depende principalmente do sistema escolhido e do quantitativo utilizado (JACOBSEN *et al.*, 2008). A mistura ALT utilizada neste estudo foi baseada em um pedido de patente europeu e contém os principais agentes antioxidantes utilizados (apud HIGGINS *et al.*, 1999). O tocoferol tem sido um dos antioxidantes mais utilizados, no entanto, segundo Kamal-Eldin e Yanishlieva (2002), a inibição do processo oxidativo oferecida por estas substâncias é considerada branda e depende da concentração de ácidos graxos e compostos minoritários presentes no óleo. O ácido ascórbico, o palmitato de ascorbila, o propil galato e o ácido gálico também têm sido utilizados para prevenção da oxidação de óleo de peixe e óleos comestíveis em geral. Além destes, extratos de plantas também têm sido investigados, como a fração etérea do extrato etanólico de *Carum copticum* que demonstrou uma efetiva ação de prevenção oxidativa em amostra de óleo de peixe comparada a outros antioxidantes (BERA; LAHIRI, NAG, 2006). Sanders (apud KOLANOWSKI; LAUFENBERG; KUNZ,

2004) recomendou para um melhor efeito de prevenção a utilização de 4-5 mg de antioxidantes por grama de ácidos graxos insaturados do tipo ômega-3. Por outro lado, Barlow (apud BERA; LAHIRI, NAG, 2006) questiona a segurança de muitos agentes antioxidantes.

No estudo de estabilidade das amostras de peixe microencapsuladas foi observada uma diferença significativa entre os resultados de óleo de superfície e de óleo encapsulado.

Os valores de peróxido encontrado nas microcápsulas de óleo de peixe foram maiores que os valores encontrados de IP para o óleo de peixe já no T_0 . Isto sugere que a temperatura utilizada durante o processo de microencapsulação é um fator a ser considerado na formação das micropartículas.

As três amostras de microcápsulas de goma arábica/maltodextrina não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$) (Tabela III – Anexo 3), nos valores de IP do óleo de superfície até o sétimo dia (Figura 22). A partir deste momento, o processo oxidativo foi diferenciado para cada uma delas. A preparação 1 apresentou um processo contínuo de oxidação atingindo o valor máximo de oxidação (435 mmol/Kg) no 21º dia, o qual se manteve estável até o 28º dia de análise ($P>0,05$) (Tabela III – Anexo 3). Para a preparação 2 o processo começou mais tardiamente, no 14º dia do ensaio, atingindo 150,30 mmol/Kg no 21º dia e, a partir deste ponto, continua gradativamente até atingir 506,31 mmol/Kg. Na preparação 3 o processo oxidativo ocorreu do sétimo ao 14º dia, mantendo-se sem variação até o final do estudo ($P>0,05$) (Tabela III – Anexo 3). Estes resultados demonstram que diferentemente do que foi observado na amostra de óleo de peixe, a mistura antioxidante conferiu uma maior proteção ao óleo de peixe da superfície das microcápsulas até um período do estudo (21º dia). Por outro lado, a presença de

maior concentração de maltodextrina não impediu ou mesmo reduziu o processo oxidativo.

As três preparações apresentaram valores de IP para o óleo encapsulado semelhantes entre o primeiro e o 14º dia. A partir deste ponto as três preparações mostraram um vertiginoso aumento do processo oxidativo, atingindo valores acima de 400 mmol/Kg (ver Tabela III - Anexo 1). Deste ponto até o final do estudo foi observado um acréscimo não significativo ($P>0,05$) (Tabela IV – Anexo 3) nas amostras, indicando que o máximo do processo oxidativo havia sido atingido.

Os valores médios das TBARS encontrados nas três preparações variaram de 1,38 mmol/Kg a 3,02 mmol/Kg para a preparação 1; de 1,15 mmol/Kg (T_0) a 3,28 mmol/Kg (T_{28}) para a preparação 2 e de 1,12 mmol/Kg a 5,14 mmol/Kg para a preparação 3, e o tratamento estatístico não demonstrou diferença significativa ($P>0,05$) (Tabela V – Anexo 3) entre as três preparações até o 14º dia, a partir daí a preparação 3 apresentou valores maiores das TBARS em relação às demais preparações.

Estes resultados evidenciam que, para o óleo encapsulado, a presença de antioxidantes na preparação não alterou o processo de oxidação das amostras. Além disso, como observado para o óleo de superfície, a adição de uma maior quantidade de maltodextrina, mais uma vez, não impediu ou minimizou o processo oxidativo da preparação (Figura 22).

Nas três preparações do complexo caseína-pectina/maltodextrina/óleo de peixe não se observou diferença significativa entre os valores de IP do óleo de superfície das amostras até o 14º dia ($P>0,05$) (Tabela VI – Anexo 3). A partir daí houve um crescimento intenso nos valores de peróxido ($P<0,05$) (Tabela VI – Anexo 3), até o 28º dia.

Os valores de IP para o óleo encapsulado foram bem mais baixos, em comparação com o óleo de superfície, havendo ligeira variação somente após o 14 dia ($P>0,05$) (Tabela VII – Anexo 3). A adição de antioxidantes às preparações não interferiu no processo oxidativo e nem um aumento na quantidade de maltodextrina favoreceu a proteção frente à oxidação.

Os valores médios de TBARS encontrados nas três preparações variaram de 0,70 (T_0) mmol/Kg a 2,42 mmol/Kg (T_{28}) para a preparação 4; de 0,81 a 2,32 mmol/Kg para a preparação 5 e de 0,64 mmol/Kg a 2,69 mmol/Kg para a preparação 3 (Figura 27) (Tabela VIII – Anexo 1). O tratamento estatístico demonstrou que esta variação foi estatisticamente significativa a partir do 14º dia para todas as preparações ($P>0,05$) (Tabela VIII – Anexo 3).

Valores de IP próximos aos encontrados para as microesferas do complexo caseína-pectina/maltodextrina foram descritos por Kolanowski; Laufenberg; Kunz (2004) para microcápsulas de metilcelulose 200 estocadas à baixa temperatura e livres acesso do ar e, também, estocadas a vácuo à temperatura ambiente.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o complexo caseína-pectina/maltodextrina foi mais eficiente que a mistura polimérica goma arábica/maltodextrina. Entretanto, é importante frisar que as amostras do estudo submetidas à condições drásticas de temperatura e umidade relativa e os valores tanto de IP quanto de TBARS para ambos os tipos de preparação foram bastante aumentados quando comparados aos citados na literatura. Além disso, todas as preparações apresentaram diferenças entre si nos valores médios de IP durante o processo de atomização e secagem quando comparadas ao óleo de peixe não encapsulado: $7,94 \pm 0,12$ mmol/Kg (T_0 óleo); $53,66 \pm 5,55$ mmol/Kg (T_0 Médio-GA-MD); $41,10 \pm 8,37$ mmol/Kg (T_0 Médio-CP-MD), demonstrando que o processo por *spray-drying* pode

ter interferido nas preparações. Estes resultados são diferentes daqueles de Baik e colaboradores (2004) que encontraram valores de IP inferiores nas amostras processadas por *spray-drying*. Isto sugere que alguns fatores devam ser posteriormente revistos: as condições operacionais de secagem e a relação entre a quantidade de óleo de peixe e polímeros.

Assim, os resultados globais do estudo mostraram que a microencapsulação é um processo eficiente na prevenção da oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados e que frente as condições drásticas de estresse oxidativo a que foram submetidas as preparações, ambos os tipos de misturas poliméricas apresentaram potencial ação protetora sobre a estabilidade oxidativa do óleo de peixe. No entanto, o complexo caseína-pectina mostrou resultados mais promissores indicando ser uma alternativa eficiente para a microencapsulação de óleo de peixe empregando constituintes de baixo custo e larga utilização na indústria alimentícia.

6. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que:

- As amostras do concentrado de óleo de peixe apresentaram concentrações adequadas de ácidos graxos poliinsaturados do tipo ômega-3.
- O processo de obtenção das microcápsulas de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe, apesar de apresentar um rendimento abaixo do esperado, demonstrou ser eficiente na formação de sistema do tipo microcápsulas de óleo de peixe.
- Tanto as preparações de goma arábica-maltodextrina/óleo de peixe, como as preparações do complexo caseína-pectina/maltodextrina/óleo de peixe apresentaram um elevado conteúdo de óleo na superfície das micropartículas, no entanto estes valores foram maiores nas preparações de goma arábica/maltodextrina.
- O complexo caseína pectina/maltodextrina/óleo de peixe demonstrou ser mais adequado para a microencapsulação do óleo de peixe, uma vez que apresentou melhor rendimento e melhor eficiência de encapsulação, quando comparado à mistura goma-arábica/maltodextrina.
- As preparações de goma arábica/maltodextrina apresentaram partículas de maior tamanho que as do complexo caseína-pectina/maltodextrina.
- A análise morfológica por MEV de ambos os tipos de preparações apresentou micropartículas íntegras, com depressões na superfície e bastante coesas. Além disso, a análise permitiu confirmar a formação do sistema microcápsula para a mistura polimérica goma arábica/maltodextrina.

- A confirmação do sistema goma arábica/maltodextrina por microscopia confocal a laser foi prejudicada em função da grande quantidade de óleo presente na superfície das microcápsulas.
- Nas micropartículas do complexo caseína-pectina/maltodextrina não foi possível determinar com a MEV o tipo de sistema formado. No entanto, a análise por confocal sugere que o sistema seja uma microesfera.
- A adição de antioxidantes ao óleo de peixe não preveniu o processo oxidativo.
- Nas preparações de goma arábica/maltodextrina a presença de antioxidantes não impediu, mas reduziu o processo de oxidação. No entanto, nas preparações com o complexo caseína-pectina/maltodextrina a adição de antioxidantes não alterou significativamente os valores de IP e TBARS.
- A adição de maltodextrina tanto nas microcápsulas de goma arábica como nas do complexo caseína-pectina não reduziu ou preveniu o processo oxidativo.
- O complexo caseína-pectina foi mais eficiente na prevenção do processo oxidativo do que a goma arábica/maltodextrina e mostrou ser uma alternativa promissora para microencapsulação de óleo de peixe, além de ser uma matéria-prima de baixo custo e de fácil obtenção.

REFERÊNCIAS

- AL-KHATIB, G.R.; DUGGAL, M.S.; TOUMGA, K.J. An evaluation of the acidogenic potential of maltodextrin in vivo. **Journal of Dentistry**. v. 29, p. 409-414, 2001.
- ANAL, A.K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 240-251, 2007.
- ANAMNART, S.; TOLSTORUKOV, I.; KANEKO, Y.; HARASHIMA, S. Fatty Acid Desaturation in Methylophilic Yeast *Hansenula polymorpha* Strain CBS 1976 and Unsaturated Fatty Acid Auxotrophic Mutants. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 85, n. 5, p. 476-482, 1998.
- ANTI, M.; AEMELAO, F.; MARRA, G.; PERCESEPE, A.; BARTOLI, G.M.; PALOZZA, P.; PARRELA, P.; CANETTA, C.; GENTILONI, G.M.; DE VIOTIS, I.; GASBARRINI, G. Effect of different doses of fish oil on rectal cell proliferation in patients with sporadic colonic adenomas. **Gastroenterology**. v. 104, n. 6, p. 1709-1718, 1994.
- AOAC - Official Methods of Analysis**. Oils and Fat. Chapter 41, p. 12, 2000.
- ARONSON, W.J. ; GLASPY, J.A. ; REDDY, S.T.; REESE, D.; HEBER, D.; BAGGA, D. Modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oils in men with prostate cancer. **Urology**. v. 58, n. 2, p. 283-288, 2001.
- BAIK, M.Y.; SUHENDO, W.W.; NAWAR, D.J.; MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A.; CHINACHOTI, P. Effects of antioxidants and humidity on the oxidative stability of microencapsulated fish oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**. v. 81, n. 4, p. 355-360, 2004.
- BAKAN, J.A. Microencapsulação. In: Lackman, L.; Lieberman, H.A.; Kaning, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. II, p. 707-735.
- BALK, E.M.; LICHTENSTEIN, A.H.; CHUNG, M.; KUPELNICK, B.; CHEWA, P.; LAU, J. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: A systematic review. **Atherosclerosis**. V. 189, n.1, p.19-30, 2006.
- BARACAT, M.M. **Preparação e avaliação de microcápsulas à base de pectina**. 2004. 134f. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, 2004.
- BARTEE, S.D.; KIM, H.J.; MIN, D.B. Effects of antioxidants on the oxidative stability of oils containing arachidonic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids. **Journal of American Oil Chemistry Society**. v. 84, p. 363-368, 2007.
- BAYOMI, M.A.; AL-SUWAYEH, S.A.; EL-HELW, A.M.; MESNAD, A.F. Preparation of casein-chitosan microspheres containing diltiazem hydrochloride by an aqueous coacervation technique. **Pharmaceutica Acta Helveticae**. v. 73, p. 187-192, 1998.

- BERA, D.; LAHIRI, D.; NAG, A. Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants. **Journal Food Engineering**. v. 74, p. 542-545, 2006.
- BOH, B.; KOSIHI, I.; KNEZ, E.; KUKOVIC, M.; SKERLAVA, V.; SKVARC, A. Microencapsulation and testing of the agricultural animal repellent, Daphne. **Journal of Microencapsulation**. v. 16, n. 2, p. 69-180, 1999.
- BRASIL, Resolução 01/2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre **Guia para a Realização de Estudo de Estabilidade**. Brasília, DF. D.O.U. 01 de agosto de 2005.
- BUFFO, R.; REINECCIUS, G.A. Optimization of gum acacia/modified starch/maltodextrin blends for the spray drying of flavors. **Perfumer & Flavorist**. v. 23, p. 37-51, 2000.
- BULGARELI, E.; FORNI, F.; BERNABEI, M.T. Effect of matrix composition and process conditions on casein-gelatin beads floating properties. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 198: 157-165, 2000.
- CAMILO, K.F.B. **Complexo pectina/caseína: aspectos básicos e aplicados**. 2007. 147f. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, 2007.
- CARRERO, J.J.; MARTÍN-BAUTISTA, E.; BARÓ, L.; FONOLLÁ, J.; JIMÉNEZ, J.; BOZA, J.J.; LÓPEZ-HUERTAS, E. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. **Nutricion Hospitalaria**. v. 20, n. 1, p. 63-69, 2005.
- CHAMPAGNE, C.P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 18, n. 2, p. 184-190, 2007.
- DAVIDOV-PARDO, G. ROCCIA, P.; SALGADO, D.; LEON, A.E.; PEDROZA-ISLAS, R. Utilization of different wall materials to microencapsulate fish oil evaluation of its behavior in bread products. **American Journal of Food Technology**. v. 3, n. 6, p. 384-393, 2008.
- DONG, W.; BODMEIER, R. Encapsulation of lipophilic drugs within enteric microparticles by a novel coacervation method. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 326, p. 128-138, 2006.
- DRUSCH, S.; SCHWARZ, K. Microencapsulation properties of two different types of n-octenylsuccinate-derivatised starch. **European Food Research Technology** v. 222, p. 155-164, 2006.
- DRUSCH, S.; SERFERT, Y.; VAN DEN HEUVEL, A.; SCHWARZ, K. Physicochemical characterization and oxidative stability of Wsh oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose. **Food Research International**. v. 39, p. 807-815, 2006.

DRUSCH., S. Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. **Food Hydrocolloids**. v. 21, p. 1223–1228, 2007.

DRUSCH; S.; BERG, S.; SCAMPICCHIO, M.; SERFERT, Y.; SOMOZA, V.; MANNINO, S.; SCHWARZ, K. Role of glycated caseinate in stabilisation of microencapsulated lipophilic functional ingredients. **Food Hydrocolloids**. v. 23, p. 942–948, 2009.

DUGGAN C.; GANNON, J.; WALKER, W.A. Protective nutrients and functional foods for gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 75, n. 5, p. 789-808, 2002.

DOUBLIER, J. L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 5, n.3, p. 202-214, 2000.

ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota* L.) by spray dryer. **Journal of Food Engineering**. v. 80, p. 805–812, 2007.

FIAT, A.M.; JOLÈS, P. Casein of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 87, p. 5-30, 1989.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT,G.; CHAMBIN,O.; VOILLEY,A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**. v. 40, p. 1107–1112, 2007.

HAMILTON, R.J.; KALU, C.; MCNEIL, G.P.; PADLEY, F.B.; PIERCE, J.H. Effects of tocopherols, ascorbyl palmitate and lecithin on autooxidation of oil fish. **Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)**. v. 75, n. 7, p. 814-821, 1998.

HARDAS, N.; DANVIRIYAKUL, S.; FOLEY, J.L.; NAWAR, W.W.; CHINACHOT, P. Accelerated Stability Studies of Microencapsulated Anhydrous Milk Fat. **Food Science and Technology**. v. 33, p. 506-513, 2000.

HARDAS, N.; DANVIRIYAKUL, S.; FOLEY, J.L.; NAWAR, W.W.; CHINACHOTI, P. Effect of Relative Humidity on the Oxidative and Physical Stability of Encapsulated Milk Fat. **Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)**. v. 79, n. 2, p. 151-158, 2002.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**. v. 22, p.475-477.1973.

HAWKINS, S.; BLEDSOE, H.; DUNCAN, M. Encapsulation technologies for fragrance and cosmetic industries. **Cosmetic Toiletries Manufacture Worldwide**. p. 99 -105, 2000.

HEINZELMANN, K.; FRANKE, K. Using freezing and drying techniques of emulsions for the microencapsulation of fish oil to improve oxidation stability. **Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces**. v. 12, p. 223–229, 1999.

HEINZELMANN, K.; FRANKE, K. VELASCO, J.; MARQUÉZ-RUIZ, G. Microencapsulation of fish oil by freeze-drying techniques and influence of process parameters on oxidative stability during storage. **European Food Research & Technology**. v. 211, n. 4, p. 234-239, 2000.

HERNANDES, J.M.M.; FREITAS, O.; PEREIRA, N.L. The potential use of casein and modified casein as matrix delivery systems. **Bollettino Chimico Farmaceutico**. v. 137, p. 362-366, 1998.

HERRERO, E.P.; MARTÍN DEL VALLE, E.M.; GALÁN, M.A. Development of a new technology for the production of microcapsules based in atomization processes. **Chemical Engineering Journal**. v. 117, p. 137–142, 2006.

HIGGINS, S.; CARROLL, Y. L.; O'BRIEN, N. M.; MORRISSEY P. A. Use of microencapsulated fish oil as a means of increasing n-3 polyunsaturated fatty acid intake. **Journal of Human Nutrition and Dietetics** v. 12, p. 265–271, 1999.

HODGE, W.G.; SCHACHTER, H.M.; BARNES, D.; PAN, Y.; LOWCOCK, E.C.; ZHANG L.; SAMPSON, M.; MORRISON, A.; TRAN, K.; MIGUELEZ, M.; LEWIN, G.; Efficacy of ω -3 Fatty Acids in Preventing Age-Related Macular Degeneration – A Systematic Review. **Ophthalmology**. v. 113, n. 7, July, p. 2006.

HUBBARD, N.E.; LIM, D.; REICKSON, K.L. Alteration of murine mammary tumorigenesis by dietary enrichment with n-3 fatty acid in fish oil. **Cancer Letters**. v. 124, n. 1, p. 1-7, 1998.

IGNARRO, J.L.; BALESTRIERI, M.L.; NAPOLI, C. Nutrition, physical activity and cardiovascular disease: An update. **Cardiovascular Research**. v. 73, p. 326-340, 2007.

INDARTI, E.; MAJIDB, M.I.A.; HASHIMA, R.; CHONG, A. Direct FAME synthesis for rapid total lipid analysis from fish oil and cod liver oil. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 18, p. 161–170, 2005.

JACOBSEN, C.; LET, M.B.; NIELSEN, N.S.; MEYER, A.S. Antioxidant strategies for preventing oxidative flavour deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: a comparative evaluation. **Trends in Food Science & Technology** v. 19, p. 76-93, 2008.

JÓNSDÓTTIR, R.; BRAGADÓTTIR, M.; ARNARSON, G.O. Oxidatively derived volatile compounds in microencapsulated fish oil monitored by solid-phase microextraction (SPME). **Journal of Food Science**. v. 70, n. 7, p. C433-C440, 2005.

JUMP, D.B. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, n. 11, p. 8755-8758, 2002.

- KAMAL-ELDIN, A.; YANISHLIEVA, N.V. *N-3 fatty acids for human nutrition: stability considerations*. **European Journal of Lipids Science and Technology** v. 104, p. 825-836, 2002.
- KANAKDANDE, D.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R.S. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. **Carbohydrate Polymers**. v. 67, p. 536–541, 2007.
- KOLANOWSKI, W.; LAUFENBERG, G.; KUNZ, B. Fish oil stabilisation by microencapsulation with modified cellulose. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. v. 55, n. 4, p. 333-343, 2004.
- KOLETZKO, B.; AGGETT, P.J.; BINDELS J.G.; BUNG, P.; FERRE, P.; GIL, A.; LENTZE, M.J.; ROBERFROID, M.; STROBEL, S. Growth, development and differentiation a functional food science approach. **British Journal of Nutrition**. v. 80 Suppl 1, p. S5-S45, 1998.
- KRISHNAN, S.; BHOSALE, R., A.C.; SINGHAL, R.S. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 309–315, 2005.
- KRISHNAN, S.; KSHIRSAGAR, A.C.; SINGHAL, R.S. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. **Carbohydrate Polymers**, v.62, p. 309–315, 2005.
- LAMPRECHT, A.; SCHÄEFER, 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, 2000a.
- LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.F.; LEHR, C.M. Visualization and quantification of polymer distribution in microcapsules by confocal scanning microscopy (CLSM). **International Journal of Pharmaceutics**. v. 196, p. 223-226, 2000b.
- LOKSUWAN, J. Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. **Food Hydrocolloids**. v. 21, p. 928–935, 2007.
- MARANGELLA, L.B.; SUPPESCI, T.; KETTERD, T.A.; DENNEHYE, E.B.; ZBOYANA, H.; KERTZA, B.; NIERENBERGF, A.; CALABRESEG, J.; WISNIEWSKI, S.R.; SACHSI, G. Omega-3 fatty acids in bipolar disorder: Clinical and research considerations. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 75, p. 315–321, 2006.
- MARGIORIS, A. N. Fatty acids and postprandial inflammation. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**. v.12, p.129–137,2009.
- MAROON, J.C.; BOST, J.W. ω -3 Fatty acids (fish oil) as an anti-inflammatory: an alternative to nonsteroidal anti-inflammatory drugs for discogenic pain. **Surgical Neurology**. v. 65, p. 326–331, 2006.

MAROZIENE, A.; DE KRUIF, C.G. Interaction of pectin and casein micelles. **Food Hydrocolloids**. v. 14, p. 391–394, 2000.

MARRETO, R. N. **Estudo da técnica de leite de jorro convencional para secagem de microcápsulas de caseína e pectina**. 2006, 198f. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, São Paulo, 2006.

MASTERS, K.. **Spray drying handbook**. 4º Edição. London: George Godwin, 1985. 696 p.

METCALFE, L.D.; SCHMITZ, A.A.; PELKA, J.R. Rapid Preparation of Fatty Acid Esters from Lipids for Gas Chromatographic Analysis. **Analytical Chemistry**. v. 38, n.3, p. 514-515, 1966.

MIHALJEVIC, B.; KATUSIN-RAZEM, B.; RAZEM, D. The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. **Free Radical Biology & Medicine**. vl. 21, n. 1, p. 53-63, 1996

MINEMOTO, Y., HAKAMATA, K., ADACHI, S., MATSUNO, R. Oxidation of linolenic acid encapsulated with gum Arabic or maltodextrin by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n.2, p. 181-189, 2002.

MOLLERUP, H.; HAUGEN, A. Differential effect of polyunsaturated fatty acids in cell proliferation during human epithelial in vitro carcinogenesis: involvement of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. **British Journal of Cancer**. v. 74, n. 4, p. 613-618, 1996.

MONTES-PÉREZ, M.J.; CONTRERAS-FERNÁNDEZ, M.J. Composición de ácidos grasos de menus escolares. **Alimentaria**. v. 4, p. 103-110, 1995.

MORESCHI, P.E.; BARACAT, M.M.; CONCEIÇÃO, E.C.; MESTRINER JUNIOR, W.; FREITAS, O. Processo de obtenção de complexos biodegradáveis, complexos biodegradáveis assim obtidos e método para avaliação da eficiência mastigatória. PI 005127, 2007.

MUHIDDINOVY, Z.; KHALIKOVY, D.; SPEAKERZ, T.; FASSIHIZ, R. Development and characterization of different low methoxy pectin microcapsules by an emulsion–interface reaction technique. **Journal of Microencapsulation**. v. 21, n. 7, p. 729–741, November, 2004

NETTLEON, J.A. Omega-3 fatty acids and health. **New York: Chapman & Hall**, p.1-63, 1995.

NEWTON, I.S. Long-chain fatty acids in health and nutrition. In: SHAHIDI, Fereidoon, FINLEY, John W. **Omega-3 Fatty Acids: Chemistry, nutrition and health effects**. Washington: American Chemical Society, p.14-27, 2001.

NURJAYA, S.; WONG, T.W. Effects of microwave on drug release properties of matrices of pectin. **Carbohydrate Polymers**. v. 62, p. 245–257, 2005.

NUSSINOVITCH, A. Hydrocolloid Applications: Gum technology in the food and other industries. London: Blackie Academic & Professional. p.125-139, 1997.

OLIVEIRA, A.C. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por spray drying e leito de jorro. 2006. 77f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, 2006.

OSAWA, C.C., FELÍCIO, P.E., GONCALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. *Química Nova*, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

PALMIERI, G.F.; BONACUCINA, G.; DI MARTINO, P.; MARTELLI, S. Microencapsulation of semisolid ketoprofen/polymer microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 242, p. 175–178, 2002.

PATCH, C.S.; TAPSELL L.C.; WILLIAMS, P.G. Overweight Consumers' Salient Beliefs on Omega-3–Enriched Functional Foods in Australia's Illawarra Region. **Journal of nutrition education and behavior**. v. 37, p. 83-89, 2005.

PATCH, C.S.; TAPSELL L.C.; WILLIAMS, P.G.; CARVALHO, I.S.; MIRANDA, I.; PEREIRA, H. Evaluation of oil composition of some crops suitable for human nutrition. **Industrial Crops and Products**. v. 24, p. 75-78, 2006.

PENNIGTON, J.A.T. Food Composition Databases for Bioactive Food Components. **Journal Of Food Composition And Analysis**. v. 15, p. 419–434, 2002.

QUENELLE, D. C.; STAAS, J.K.; WINCHESTER, G.A.; BARROW, E.L.W.; BARROW, W. W. Efficacy of microencapsulated rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. **Antimicrobial Agents and Chemotheraphy**. v. 43, n. 5, p. 1144-1151, 1999.

RAMOS, M.F.S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica**. 2006, 135f. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, São Paulo, 2006.

RATTES, A.L.R.; OLIVEIRA, W. P. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. **Powder Technology**. v. 171, p. 7–14, 2007.

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

REDIGUIERI, C.F. **Misturas aquosas de pectina/caseína: estudo físico-químico e potencial de uso no tratamento da doença periodontal.** Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, 2008.

REIFFEL, J.A.; MCDONALD, A. Antiarrhythmic Effects of Omega-3 Fatty Acids. **The American Journal of Cardiology**. v. 98, n. 4, Suppl. 1, p. 50-60, august, 2006.

REINECCIUS, G. A. Carbohydrates for flavor encapsulation. **Food Technology** p.144-149, 1991.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química. Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIDLEY, B.L.; O'NEILL, M.A.; MOHNEM, D. Pectins: Structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**. v. 57, p. 929-967, 2001.

ROYNETTE, C. E.; CALDER, P.C.; DUPERTUIS, Y. M.; PICHARD, C. n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutrition**. v. 23, p. 139-151, 2004.

RUBINSTEIN, A. Microbially controlled drug delivery to the colon. **Biopharmaceutics & drug disposition**. v. 11, p. 465-475, 1990.

RUXTON, C.H.S.; REED, S.C.; SIMPSON, M.J.A.; MILLINGTON, K.J. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**. v. 17, p. 449-459, 2004.

SAHENA, F.; ZAIDUL, I.S.M.; JINAP, S.; SAARI, N.; JAHURUL, H.A.; ABBAS, K.A.; NORULAINI, N.A. PUFAs in fish: Extraction, fractionation, importance in health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 8, p. 59-74, 2009.

SAMPATH, H.; NTAMBI, J. M. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. **Nutrition Reviews**. v. 62, n. 9, p. 333-339, 2004.

SCHMIDT, E.B.; RASMUSSEN, L.H.; RASMUSSEN, J.G.; JOENSEN, A.M.; MADSEN, M.B.; CHRISTENSEN, J.H. Fish, marine n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease: A minireview with focus on clinical trial data. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 75, n. 3, p. 191-195, 2006.

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, n. 8, p. 689-753, 1998.

SEKI, H.; TANI, Y.; ARITA, M. Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvins E1. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**. *In Press, Corrected Proof, Available online 25 March 2009.*

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

SHAHIDI, F. Function foods: their role in health promotion and disease prevention. **Journal of Food Science**. v. 69, n. 5, p. R146-R149, 2004.

SILVA, S.V.; MALCATA, F.X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**. v. 15, p. 1–15, 2005.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-6/Omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. **Food Review International**. v. 20, n. 1, p. 77-90, 2004.

SINHÁ, V.R., KUMRIA, R. Microbially triggered drug delivery to the colon. **European Journal Pharmaceutical Sciences**., v. 18, p. 3–18, 2003.

SOOTTITANTAWAT, A.; TAKAYAMA, K.; OKAMURA, K.; MURANAKA, D.; YOSHII, H.; FURUTA, T.; OHKAWARA, M.; LINKO, P. Microencapsulation of L-menthol by spray drying and its release characteristics. **Innovative Food Science Emerging Technologies**. v. 6, p. 163-170, 2005.

SRINIVASAN, S.; XIONG, Y.L. Sodium Chloride-mediated lipid oxidation in beef heart surimi-like material. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 44, p. 16976-1703, 1996.

STEHR, S.N.; HELLER, A.R. Omega-3 fatty acid effects on biochemical indices following cancer surgery. **Clinica Chimica Acta**. v. 373, n. 1-2, p. 1-8, November, 2006.

STULNIG, T.M. Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects. **International archives of allergy and immunology**. v. 132, p. 310-321, 2003.

SUH, MUN-HEE.; YOO, SANG-HO.; LEE, H.G. Antioxidative activity and structural stability of microencapsulated c-oryzanol in heat-treated lards. **Food Chemistry**. v. 100, p. 1065–1070, 2007.

THEVENET, F. Acacia Gums: Stabilizers for flavor encapsulation. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. Flavour encapsulation. Washington DC: American Chemical Society, p. 37-44, 1988.

TUINIER, R.; ROLIN, C.; DE KRUIF, C.G. Eletroabsorption of pectin in to casein micelles. **Biomacromolecules**., v. 3, p. 632-638, 2002.

TROMP, R.H.; DE KRUIF, C.G.; VAN EIJK, M.; ROLIN, C. On the mechanism of stabilization of acidified milk drinks by pectin. **Food Hydrocolloids**, v.18, n. 4, p. 565-572, 2004.

TURGEON, S.L.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein–polysaccharide complexes and coacervates. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 12, n. 4-5, p. 166-178, 2007.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 30. The National Formulary 25. The U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, USA. 2007.

VELASCO, J.; DOBARGANES, M.C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. Oxidación de fracciones de aceite libres y encapsulados en aceites de pescado encapsulados. **Grasas Aceites**. v. 51, p. 439-446, 2000.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **Dairy Foods**. v. 73, n. 8, p. 1965-1979, 1990.

WATANABEA, Y.; FANGB, X.; ADACHIB, S.; FUKAMIC, H.; MATSUNOB, R. Oxidation of 6- O-arachidonoyl l-ascorbate microencapsulated with a polysaccharide by spray-drying. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** v. 37, p. 395–400, 2004.

WENDEL, S.; ÇELIK, M. An overview of spray-drying applications. **Pharmaceutical Technology**. v. 10, p. 127-156, out, 1997.

WEINBRECK, F. **Whey protein/polysaccharide coacervates: structure and dynamics**. 2004. 198 f. Tese de Doutorado – University of Utrecht, Utrecht, 2004.

WIJENDRAN V. HAYES KC. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. **Annual Review of Nutrition**. v. 24, p. 597-615, 2004.

YOUNG, C.; MARTIN, A. Omega-3 fatty acids in mood disorders: an overview. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v. 25, n. 3, p. 184-7, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)