



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS
ALIMENTOS**

**CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
MICROPARTÍCULAS CARREGADAS DE ÁCIDOS GRAXOS
DE CADEIA CURTA OBTIDAS POR SPRAY DRYING**

Orientadora: Prof^a. Dra. Jane Mara Block

Rafael Luchtenberg
Florianópolis – SC – março 2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

**CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
MICROPARTÍCULAS CARREGADAS DE ÁCIDOS GRAXOS
DE CADEIA CURTA OBTIDAS POR SPRAY DRYING**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do título de mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Jane Mara Block

Rafael Luchtenberg
Florianópolis – SC – março/2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da
UFSC.

Luchtenberg, Rafael

Caracterização e Atividade Antimicrobiana de Micropartículas Carregadas de Ácidos Graxos de Cadeia Curta Obtidas por Spray Drying / Rafael Luchtenberg / orientadora, Jane Mara Block – Florianópolis, SC, 2014.

95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. ácidos graxos de cadeia curta. 3. micropartículas. 4. atomização por spray drier. 5. atividade antimicrobiana. Block, Jane Mara. I. Universidade Federal de Santa Catarina. II. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

**CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
MICROPARTÍCULAS CARREGADAS DE ÁCIDOS GRAXOS
DE CADEIA CURTA OBTIDAS POR ATOMIZAÇÃO EM *SPRAY*
*DRIER***

Por

RAFAEL LUCHTENBERG

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 25 de março de 2014.

Prof. (a). Dr. (a). Roseane Fett
Coordenador

Banca Examinadora:

Prof.(a). Dr.(a). Jane Mara Block, Presidente.
Orientador (UFSC)

Prof.(a). Dr.(a). Débora de Oliveira
Membro (UFSC)

Prof.(a). Dr.(a). Juliano de Dea Lindener
Membro (UFSC)

Prof.(a). Dr.(a). Pedro Luiz Manique Barreto
Membro (UFSC)

A minha esposa Aline, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

A professora Jane Mara Block pela sabedoria e paciência na orientação deste projeto.

Aos professores Pedro Luiz Manique Barreto, Roseane Fett e Débora de Oliveira pelas valiosas sugestões na banca de qualificação.

Aos colegas Ana Cristina Pinheiro do Prado, Gislaine Kuminek, Itamara Kureck, Lindomar Lerin, Manoela Klüppel Riekes, Priscila Policarpi, e Sheila Silveira pela valiosa ajuda na realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação, por serem parte fundamental na aquisição de conhecimentos indispensáveis a minha formação.

Aos colegas da pós-graduação, pela troca de conhecimento e amizade.

As colegas Karina Koerich e Janaína Nones pelas conversas e desabafos.

A minha esposa Aline, pela paciência e apoio fundamentais para a realização deste sonho.

A minha colega e amiga Marcelina Bottoni Horn, pelo incentivo durante as incontáveis viagens à Florianópolis.

Aos meus colegas da Nutrifarma, especialmente ao Neventon Santi Vieira pelo apoio e ajuda para disponibilização dos materiais utilizados para esta pesquisa.

A todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste sonho, os meus sinceros agradecimentos.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein).

RESUMO

No presente trabalho micropartículas contendo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foram obtidas por atomização em Spray Dryer. Dez formulações contendo diferentes proporções de amido modificado Capsul®, maltodextrina, goma arábica, L-fosfatidilcolina e Tween foram caracterizadas através de análises físico-químicas (eficiência da microencapsulação, teor de umidade, densidade, Espectroscopia de infravermelho - FTIR (*Fourier transform infrared spectroscopy*), microscopia eletrônica de varredura - MEV, calorimetria exploratória diferencial – DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) e análise termogravimétrica – TGA (*Thermogravimetric analysis*). Os AGCC foram submetidos às análises de concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) a fim de avaliar o potencial antimicrobiano, antes e após o processo de atomização. De acordo com os resultados obtidos, as micropartículas com surfactantes na composição (fosfatidilcolina e Tween 80) apresentaram melhor eficiência de microencapsulação (80%; 77,3% e 76,5% respectivamente), menor teor de umidade e menor densidade aparente. Para estas amostras também foram observadas estruturas na forma de esferas com menor tendência a agregação. Através dos espectros de FTIR foi possível observar que as partículas obtidas apresentaram diferenças na concentração de AGCC retido. Os termogramas de DSC e TGA revelaram a presença de um evento endotérmico, com temperatura *onset* de fusão de 137,17°C e com perda de massa (Δm) de 54,92% entre 304,79°C e 413,87°C. A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) indicaram atividade antimicrobiana para todas as cepas testadas (*Escherichia coli* - ATCC 25922; *Salmonella enteritidis* - ATCC 13076; *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923; *Staphylococcus aureus* - ATCC 29213; *Listeria monocytogenes* - ATCC 19117 e, *Listeria monocytogenes* sorotipo 2 - ATCC 19112), antes e após a obtenção das micropartículas carregadas de AGCC. A técnica de *spray drying* se mostrou um método eficaz para a obtenção de um produto com maior estabilidade e pode tornar mais fácil e eficiente a utilização dos AGCC com atividade antimicrobiana na indústria.

Palavras-chave: ácidos graxos de cadeia curta, micropartículas, atomização por spray drier, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Microcapsules containing short-chain fatty acids (SCFA) were obtained by atomization Spray dryer. Ten formulations containing different proportions of Capsul[®] (modified starch), maltodextrin, gum arabic, L-phosphatidylcholine and Tween were characterized by physico-chemical analysis (efficiency of microencapsulation, moisture content, density, infrared spectroscopy - FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy), scanning electron microscopy - SEM, differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis). The SCFA were analyzed for determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) to evaluate the antimicrobial activity before and after the atomization process. According to the results, it was observed that formulations containing surfactants in the composition (L-phosphatidylcholine and Tween 80) showed better efficiency microencapsulação (80%; 77,3% and 76,5% respectively), less moisture content and less bulk density. For these samples also were observed structures in the form of spheres with fewer tendencies to aggregation. Through the FTIR spectra was observed that the particles obtained showed differences in the concentration of AGCC retained. The DSC and TGA thermograms revealed the presence of an endothermic event with onset melting temperature of 137.17 °C and weight loss (Δm) 54.92 % from 304.79 °C and 413.87 °C. The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration showed antimicrobial activity against all tested strains (*Escherichia coli* - ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* - ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* - ATCC 29213, *Listeria monocytogenes* - ATCC 19117 and *Listeria monocytogenes* serotype 2 - ATCC 19112) before and after the atomization process of SCFA. The Spray Drying technique proved to be an effective method for obtaining a product with greater stability and can make use of ACGC with antimicrobial activity in the industry easier and more efficient.

Keywords: Short-chain fatty acids, microcapsules, atomization, antimicrobial activity, spray drier.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estruturas Químicas dos Ácidos: Caprótico (A), Caprílico (B), Cáprico (C) e Láurico (D) (SILVA RAMOS, 2006; BELIN et al, 2007; DEW, BRAMER, EDSMAN, 2008).....	37
Figura 2 Série histórica de surtos e casos no Brasil, 20000-2011. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2013.....	40
Figura 3 Classe de alimentos envolvidos nos surtos. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2013.....	41
Figura 4 Agentes etiológicos identificados por surto. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2013.....	41
Figura 5 Representação esquemática do funcionamento de um atomizador. PRADO 2013.....	44
Figura 6 Representação esquemática do processo de encapsulação por "spray Drying". SUAVE et al., 2006.....	46
Figura 7 Morfologia dos diferentes tipos de micropartículas. GIBBS et al. 1999.....	48
Figura 8 Estrutura da cadeia principal da goma arábica. ROBINSON, 1991.....	50
Figura 9 Estrutura Química da Maltodextrina. ROBINSON, 1991.51	
Figura 10 Representação esquemática da extração das frações microencapsuladas e superficial VELASCO, J.; DOBARGANES et al., 2003.....	53
Figura 11 - Espectro FTIR. F3 = 35g de AM + 10g de GA + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g de Tween 80 +15,75g de AGCC; F5 = 31g de AM + 14g de MD + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g Tween 80 + 6,75g de AGCC; F6 = 35g de AM + 10g de GA + 0,45g de Tween 80 + 6,75g de AGCC; F7 = 35g de AM + 10g de GA + 0,45g de Tween 80 + 15,75g de AGCC; F8 = 35g de AM + 10g de GA + 15,75g de AGCC.....	80
Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV). F3 = 35g de AM + 10g de GA +0 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g de Tween 80 +15,75g de AGCC; F5 = 31g de AM + 14g de MD + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g Tween 80 + 6,75g de AGCC; F6 = 35g de AM + 10g de GA + 0,45g de Tween 80 + 6,75g de AGCC; F7 = 35g de AM + 10g de GA + 0,45g de Tween 80 + 15,75g de AGCC; F8 = 35g de AM + 10g de GA + 15,75g de AGCC.....	82

Figura 13 - Distribuição do tamanho das micropartículas. F3 = 35g de AM + 10g de GA + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g de Tween 80 +15,75g de AGCC; F5 = 31g de AM + 14g de MD + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g Tween 80 + 6,75g de AGCC; F6 = 35g de AM + 10g de GA + 0,45g de Tween 80 + 6,75g de AGCC; F7 = 35g de AM + 10g de GA + 0,45g de Tween 80 + 15,75g de AGCC; F8 = 35g de AM + 10g de GA + 15,75g de AGCC.....85

Figura 14 - Análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para a formulação F5 (31g de AM + 14g de MD + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g Tween 80 + 6,75g de AGCC).....86

Figura 15 Análise Termogravimétrica (TGA) da formulação F5 (31g de AM + 14g de MD + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g Tween 80 + 6,75g de AGCC).87.....87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ácidos graxos de ocorrência mais comum em óleos e gorduras.....	34
Tabela 02 – Formulações testes para obtenção de micropartículas de AGCC por Spray Drying.....	72
Tabela 03 – Eficiência da microencapsulação determinada nas partículas obtidas a partir de diferentes formulações.....	77
Tabela 04- Teor de umidade e densidade para as diferentes formulações de micropartículas de AGCC obtidas no Spray Drying.....	78
Tabela 5 - Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) do material avaliado (mg/mL) ^a	89

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGCC:** Ácido Graxo de Cadeia Curta
AGCM: Ácido Graxo de Cadeia Média
AGES: Ácidos Graxos essenciais
AM: Amido Modificado
CMB: Concentração Mínima Inibitória
CMI: Concentração Mínima Bactericida
DE: Dextrose Equivalente
DMSO: Dimetilsulfóxido
DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos
F1: Formulação 1
F2: Formulação 2
F3: Formulação 3
F4: Formulação 4
F5: Formulação 5
F6: Formulação 6
F7: Formulação 7
F8: Formulação 8
F9: Formulação 9
F10: Formulação 10
FDA: Administração de alimentos e remédios (*Food and Drug Administration*)
FTIR: Análise Espectrofotométrica no Infravermelho (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)
GA: Goma Arábica
MD: Maltodextrina
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
QSP: Quantidade Suficiente Para
TGA: Análise Termogravimétrica (*Thermogravimetric Analysis*)
TSA: Agar Soja Tripticaseína (*Trypticase Soy Agar*)
TSB: Caldo Soja Tripticaseína (*Trypticase Soy Broth*)
TTC: Trifeniltetrazólio
ΔM: Variação de Massa

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	25
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
1.3 ÁCIDOS GRAXOS	33
1.4 ANTIMICROBIANOS	35
1.4.1 Classificação quanto à origem	36
1.5 ÁCIDOS GRAXOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	36
1.6 DOENÇAS CAUSADAS POR ALIMENTOS - DTA	39
1.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	42
1.8 MICROENCAPSULAÇÃO EM ALIMENTOS.....	42
1.8.1 Microencapsulação por atomização	44
1.8.2 Matrizes Encapsulantes	48
1.9 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO FINAL	53
1.9.1 Retenção superficial e interna do óleo	53
1.9.2 Estrutura das micropartículas	54
1.9.3 Propriedades Térmicas	54
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
CAPÍTULO 2	63
RESUMO	65
1 INTRODUÇÃO	68
2 MATERIAIS E MÉTODOS	71
2.1 MATÉRIA PRIMA.....	71
2.1.1 Ácidos Graxos	71
2.1.2 Material encapsulante	71
2.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	71
2.2.1 Formulação para obtenção das micropartículas	71
2.2.2 Preparo das suspensões	72
2.2.3 Atomização das suspensões	72
2.2.4 Caracterização físico-química das micropartículas	73

2.2.5	Atividade Antimicrobiana dos AGCC: determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB).....	74
2.2.6	Análise Estatística.....	76
3	<i>RESULTADOS E DISCUSSÕES</i>	77
3.1	CARACTERIZAÇÃO	77
4	<i>CONCLUSÕES</i>	91
5	<i>REFERENCIAS</i>	93

INTRODUÇÃO

Os lipídios correspondem a um amplo grupo de compostos quimicamente diversos, que apresentam como característica em comum a solubilidade em solventes orgânicos. Nesta classe estão incluídos os óleos, gorduras, ceras, hormônios esteroidais, colesterol, fosfolipídios, carotenoides e tocoferóis, entre outros. Também, são classificados como polares e apolares, o que indica diferenças em sua solubilidade e propriedades funcionais (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

Os mais amplamente distribuídos na natureza (99%) são os acilgliceróis, compostos constituídos de ácidos graxos esterificados a uma molécula de glicerol, podendo apresentar-se como mono, di, e triésteres ou mais comumente chamados de monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis. Em alimentos os lipídios mais encontrados são os triacilgliceróis, ou óleos e gorduras, que são compostos de 3 ácidos graxos esterificados a uma molécula de glicerol. Os ácidos graxos livres não são comuns em tecidos vivos, pois apresentam citotoxicidade devido à capacidade de romper as membranas celulares. A maioria dos ácidos graxos de ocorrência natural possui número par de átomos carbono, sendo que a grande maioria possui entre 14 e 24. Ácidos graxos de cadeia curta (com menos de 14 átomos de carbono na molécula) são encontrados em algumas gorduras vegetais (coco, babaçu e palmiste) e na gordura do leite (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

Os ácidos graxos que compõem os triglicerídios apresentam funções metabólicas e fisiológicas importantes para o organismo humano. Os ácidos graxos poli-insaturados linolênico (omega-3) e linoléico (omega-6) encontrados em óleos vegetais e em óleos de peixe são conhecidos como ácidos graxos essenciais (AGEs) uma vez que o corpo humano necessita dos mesmos mas não é capaz de sintetizá-los. Conforme Damoran, Parkin e Fennema (2010), os ácidos graxos essenciais desempenham papel vital na fluidez de membranas, na sinalização celular, na expressão de genes e no metabolismo de eicosanóides. Os ácidos graxos de cadeia curta e média têm sido estudados por suas propriedades antimicrobianas (KABARA, 2008).

A introdução de antimicrobianos no uso terapêutico foi revolucionária no combate às doenças causadas por bactérias no meio do século passado. O seu uso na alimentação animal a partir de 1950 aumentou consideravelmente a produção de carnes no cenário mundial (SEMJÉN, 2000). Porém, esta prática tem sido associada ao

aparecimento de bactérias resistentes. Este aumento da resistência trouxe sérias preocupações em especial após o surgimento de bactérias super-resistentes em hospitais. As bactérias resistentes aos antibióticos podem ser transmitidas ao ser humano a partir do consumo de produtos de origem animal, entretanto, não se podem determinar ainda os riscos dessa transmissão para a saúde pública. Entre os microrganismos potencialmente letais que podem ser transmitidos ao homem estão a *Salmonella* e a *Escherichia coli*. (Consejo Nacional de Investigación, 1999).

Diante disso, atualmente há uma pressão para a redução na utilização desses produtos na alimentação animal, tornando necessário o estudo de alternativas (SCHWARZ, KEHREBERG, WALSH, 2001; SCHWARTZ, CHASLUS-DANCLA, 2001).

A Portaria número 159 de 13/06/92 do Ministério da Agricultura proíbe o uso de determinadas drogas como aditivos alimentares nas rações animais. Dentre estes, estão as tetraciclina, terramicina, clortetraciclina e penicilina. Na União Européia, os antimicrobianos são proibidos para uso como aditivo alimentar (RAMOS, 2009).

A necessidade por substâncias alternativas aos antibióticos sintéticos na alimentação animal levou ao desenvolvimento de pesquisas utilizando compostos com atividade antimicrobiana como os ácidos graxos de cadeia curta, ácidos orgânicos, prebióticos (carboidratos, peptídeos, lipídeos, fibras, alcoóis e oligossacarídeos de cadeia curta), probióticos (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e leveduras) e, extratos naturais contendo óleos essenciais (carvacrol, eugenol, timol, entre outros). Os (ROSTAGNO et al., 2000; ANADÓN, MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, ARANZAZU MARTÍNEZ, 2006; MOUNTZOURIS et al., 2006; BRENESA, ROURAB, 2010; MARTÍN-PELÁEZ, et al., 2010; ROSSI et al., 2010).

Neste cenário os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como os ácidos capríco (hexanóico 6:0), caprílico (octanóico 8:0), cáprico (decanóico 10:0) e láurico (dodecanóico 12:0), vêm sendo alvo de pesquisas. Os ácidos graxos de cadeia curta são geralmente tóxicos às bactérias em concentrações relativamente elevadas e, apresentam efeitos adversos no metabolismo de uma ampla variedade de micro-organismos (KABARA, 2008).

A forma não dissociada dos ácidos graxos é a responsável pela atividade antimicrobiana, portanto o pH determina a extensão da dissociação (KABARA, 2008; HINTON, 2011).

Porém, a alta capacidade de volatilização e o estado físico líquido dificultam a utilização nas fórmulas alimentares.

Nos últimos anos, com o desenvolvimento tecnológico, vários sistemas veiculadores de compostos ativos têm sido estudados, entre eles a microencapsulação por atomização em spray Drying. Trata-se de uma técnica que teve início na década de 50 e apresenta um grande potencial em diferentes áreas, como por exemplo, as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Neste processo, gotículas de líquido, partículas sólidas, ou compostos gasosos são aprisionados em filmes de um agente encapsulante (GHARSALLAOUI et al., 2007).

A seleção do material de parede ou encapsulante compreende uma das etapas mais importantes neste processo. O tipo de material irá influenciar na estabilidade da suspensão antes da secagem e na capacidade de proteção do produto obtido. Dentre as propriedades necessárias para um agente encapsulante estão as propriedades emulsificantes; ser bom formador de filme na interface; ter baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos; exibir baixa higroscopicidade, disponibilidade e baixo custo. Na prática, se utiliza uma associação de materiais que apresentam as características acima (CARNEIRO, 2011).

A volatilização dos ácidos graxos, a adição em matrizes alimentícias complexas e as reações com outros componentes das fórmulas alimentícias para animais, estão entre os principais problemas enfrentados pela indústria tornando necessárias as pesquisas que visem facilitar o uso destes compostos.

OBJETIVO GERAL

Obter, caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana de micropartículas carregadas de uma mistura de AGCC composta pelos ácidos caprótico, caprílico, cáprico e láurico, utilizando a tecnologia “*spray drying*”,

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Testar diferentes formulações de material encapsulante, utilizando amido modificado, maltodextrina, goma arábica, L-fosfatidilcolina e Tween para obtenção das micropartículas por “*spray drying*”,

Caracterizar as micropartículas obtidas através da determinação da densidade, umidade, retenção de óleo e óleo superficial, análise por calorimetria exploratória diferencial - DSC, análise termogravimétrica - TGA e espectroscopia em infravermelho - FTIR;

Determinar a microestrutura e o tamanho das micropartículas obtidas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Avaliar a atividade antimicrobiana da mistura dos ácidos graxos de cadeia curta, através da técnica de concentração mínima inibitória - CMI e concentração mínima bactericida - CMB.

Avaliar a influência do processo de microencapsulação sobre a atividade antimicrobiana da mistura de ácidos graxos em estudo.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3 ÁCIDOS GRAXOS

Os lipídios desempenham um importante papel na qualidade de produtos alimentares, tanto em relação às propriedades organolépticas (flavor, cor e textura), como nutricionais, uma vez que são fontes de energia, de ácidos graxos essenciais e de vitaminas lipossolúveis. Na fração lipídica de um alimento e nos óleos e gorduras os triacilgliceróis são os compostos predominantes, seguidos pelos di e monoacilgliceróis, fosfolipídios, ceras, ácidos graxos, e uma gama de substâncias que não apresentam ácidos graxos em sua composição, mas que se enquadram na classe dos lipídios (como os esteróis, alcoóis graxos, terpenos, hidrocarbonetos, pigmentos carotenóides entre outros) (FAHY et al., 2005; OETTERER et al., 2006; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

Os ácidos graxos são formados por uma cadeia carbônica alifática com ácido carboxílico terminal. A maioria dos ácidos graxos na natureza possui de 4 a 22 átomos de carbono, predominando ácidos graxos com 18 átomos de carbono. Os ácidos graxos presentes nos triglicerídeos podem ser saturados (sem a presença de duplas ligações) ou insaturados (com uma ou mais insaturações na molécula) (SCRIMGEOUR, 2005). A Tabela 1 apresenta os ácidos graxos que são de ocorrência mais comum em óleos e gorduras comestíveis.

Tabela 1 - Ácidos graxos de ocorrência mais comum em óleos e gorduras.

Símbolo numérico	Fórmula	Nome sistemático	Nome trivial	Ponto de Fusão °C
C 4:0	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COOH	butanóico	Buúrico	-5,3
C 6:0	CH ₃ -(CH ₂) ₄ -COOH	hexanóico	capróico	-3,2
C 8:0	CH ₃ -(CH ₂) ₆ -COOH	octanóico	caprílico	16,5
C 10:0	CH ₃ -(CH ₂) ₈ -COOH	decanóico	capríco	31,6
C 12:0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₀ -COOH	dodecanóico	láurico	44,8
C 14:0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₂ -COOH	tetradecanóico	mirístico	54,4
C 16:0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₄ -COOH	hexadecanóico	palmítico	62,9
C 18:0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₆ -COOH	octadecanóico	estearíco	70,1
C 20:0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₈ -COOH	eicoisanóico	araquídico	76,1
C 22:0	CH ₃ -(CH ₂) ₂₀ -COOH	docosanóico	behênico	80,0
C 24:0	CH ₃ -(CH ₂) ₂₂ -COOH	tetracosanóico	lignocérico	84,2
Ácidos Graxos Insaturados				
C16:1(9)	-	9- hexadecenoico	palmitoléico	0,0
C 18:1(9)	-	9 - octadecenoico	oléico	16,3
C 18:1 (11)	-	11 - octadecenoico	vacênico	39,5
C 18:2 (9,12)	-	9,12 - octadecadienoico	linoléico	5,0
C 18:3 (9,12,15)	-	9,12,15 - octadecatrienoico	linolênico	11,0
C 20:4 (5,8,11,14)	-	5,8,11,14 - eicosatetraenoico	araquidônico	49,5

FONTE: (DAMODARAN; PARKIN, FENNEMA, 2010).

Teores elevados de ácidos graxos de cadeia curta (menos de 14 átomos de carbono) são encontrados somente em algumas gorduras vegetais (coco, babaçu, palmiste e óleos de amêndoas) e na gordura do leite (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

1.4 ANTIMICROBIANOS

Agentes antimicrobianos são substâncias químicas com ação bactericida e/ou bacteriostática, ou ainda fungicidas e/ou fungistáticos que atuam no crescimento de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos sem causar danos aos seus hospedeiros. Essas substâncias podem diferir em suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, espectro antimicrobiano e mecanismo de ação. Muitos foram identificados quimicamente e obtidos de substâncias naturais, enquanto outros foram obtidos por síntese química (BLACK, 2002; GILMAN, GOODMAN e GILMAN, 1983, apud PRADO 2013).

O número de compostos químicos utilizados como conservadores de alimentos é relativamente pequeno, pois, como serão ingeridos com o alimento, medidas de segurança visando impedir riscos à saúde pública são necessárias. A eficiência de um agente antimicrobiano está relacionada a três fatores: efeito do pH, efeito do grau de dissociação do ácido (pKa) e ação específica do agente antimicrobiano (FRANCO E LANDGRAF, 2005).

Na ciência de alimentos, agente antimicrobiano é qualquer substância capaz de prevenir ou retardar a deterioração causada por microrganismos, podendo possuir a propriedade de agir no controle de microrganismos patogênicos, quando utilizados num produto alimentar. Conforme Prado, (2013), Este tipo de aditivo tem caracterizado a indústria de alimentos moderna e são utilizados para o controle natural de deterioração e para controle do crescimento de microrganismos.

Nos últimos anos, apesar da necessidade da aplicação desses aditivos na produção de alimentos, questões relacionadas à segurança dos consumidores têm colocado vários aditivos sob suspeita. Além disso, deve-se considerar a preferência por alimentos livres de aditivos químicos em geral, realidade que vem estimulando a realização de estudos em busca de alternativas para atender o cenário atual no que diz respeito às restrições alimentares (PRADO, 2013).

1.4.1 Classificação quanto à origem

De acordo com a origem, agentes antimicrobianos podem ser classificados em sintéticos ou de ocorrência natural. Conforme Franco e Landgraf (2008), um agente antimicrobiano de origem sintética em alimentos é qualquer substância adicionada a um alimento para prevenir ou retardar a deterioração causada por microrganismos, excluindo sais comuns, açúcares, vinagres, condimentos ou óleos extraídos de condimentos, ou mesmo substâncias provenientes de defumação.

Entre os compostos permitidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em alimentos, são exemplos o metilparabeno (p-hidroxibenzoato de metila), propilparabeno (p-hidroxibenzoato de propila) e heptilparabeno (p-hidroxibenzoato de heptila) (JAY, 2008).

O modo de ação de agentes antimicrobianos naturais de origem vegetal é estabelecido considerando-se um entre os três a seguir (1) reação com a membrana celular causando aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares; (2) inativação de sistemas enzimáticos ou enzimas essenciais, incluindo as envolvidas no processo de produção de energia e síntese de componentes estruturais; ou (3) destruição ou inativação funcional do material genético (KIM et al, 1995 apud PRADO, 2013). A membrana citoplasmática da bactéria e a membrana mitocondrial das leveduras constituem uma barreira permeável à passagem de pequenos íons como H⁺, K⁺, Na⁺ e Ca⁺⁺, além de serem responsáveis pela entrada e saída de diferentes compostos.

1.5 ÁCIDOS GRAXOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ácidos graxos livres (não esterificados ao glicerol) têm uma longa história de utilização como agentes antimicrobianos. Assim, ácidos graxos de sais de sódio ou potássio têm sido utilizados como agentes de limpeza e desinfecção durante séculos. Antes de 1930, todas as pesquisas com agentes antimicrobianos ativos eram com ácidos graxos, no entanto, duas descobertas importantes mudaram o curso do pensamento sobre o assunto. A primeira foi a penicilina pelo pesquisador britânico Alexander Fleming e a segunda foi grupo de antimicrobianos sintéticos chamado de sulfonamidas no laboratório Fourneau's no Instituto Pasteur na França em 1935. No entanto, complicações como toxicidade, reações alérgicas, irritações e o possível desenvolvimento de resistência bacteriana, acompanharam o uso desses fármacos (KABARA, 2008).

Uma das maneiras mais fáceis de controlar o desenvolvimento de microrganismos é pelo controle do pH. Microrganismos requerem valores específicos de pH para crescerem. Como agentes antimicrobianos, os ácidos graxos têm ação otimizada em valores baixos de pH. Em valores de pH neutro e alcalino, são menos efetivos. Pequenas concentrações de certos ácidos graxos podem inibir várias atividades enzimáticas das bactérias, por dois possíveis mecanismos. O primeiro por inibição indireta pela mudança estrutural da membrana celular. O segundo envolve reação direta com as enzimas (KABARA, 2008; DESCHEPPER, BRUGGEMAN, 2010).

Ácidos graxos saturados de cadeia curta como o ácido caprótico (C6), caprílico (C8), cáprilco (C10) e láurico (C12), exercem efeito contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e fungos (KABARA, 2008). As estruturas químicas destes ácidos graxos pode ser observada na Figura 1.

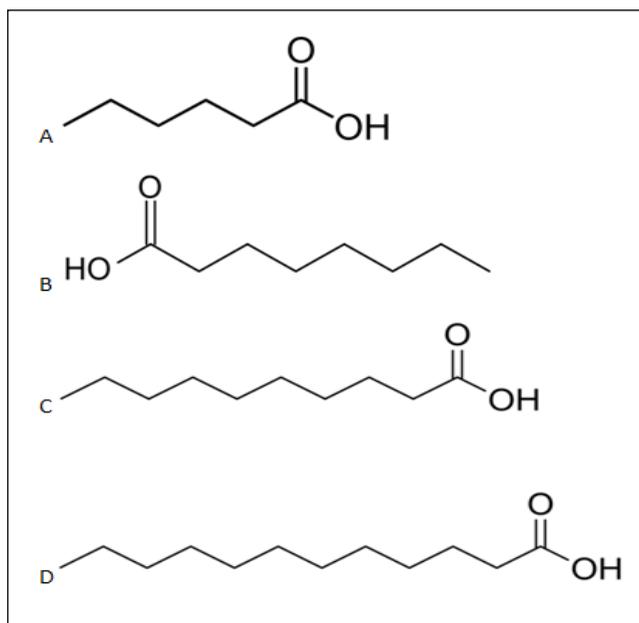


Figura 1 Estruturas Químicas dos Ácidos: Caprótico (A), Caprílico (B), Cáprilco (C) e Láurico (D) (SILVA RAMOS, 2006).

O comprimento da cadeia carbônica, o tipo de estrutura geométrica e o grau de insaturação são importantes para a atividade

antimicrobiana dos ácidos graxos. Em relação à configuração da cadeia carbônica, certas generalizações podem ser feitas sobre o efeito desses ácidos graxos em qualquer microrganismo. Enquanto a configuração “cis” exerce atividade biocida, a forma “trans” do mesmo ácido graxo é inativa.

Boyen et al., (2008), estudaram a utilização de ácidos graxos de cadeia curta e média na alteração das propriedades de virulência da *Salmonella typhimurium* e a diminuição da colonização intestinal em suínos. Segundo o estudo, quando utilizado como suplemento alimentar em suínos infectados, o ácido butírico revestido diminuiu os níveis fecais e a colonização intestinal. A expressão da virulência do gene bacteriano foi significativamente mais baixa quando a bactéria se desenvolveu em caldo Mueller-Hinton suplementado com a concentração mínima inibitória de ácido caprílico e ácido capróico. Os ácidos butírico e capróico foram rapidamente absorvidos pelas células do epitélio ao longo do trato gastrointestinal, influenciando a excreção de Salmonella.

Messens et al. (2010) relataram o efeito do ácido caprílico contra a Salmonella em um estudo “*in vitro*”, sendo o mais eficaz entre 15 ácidos graxos testados. Em testes “*in vivo*”, o ácido caprílico impediu a colonização de enterobactérias como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.) e estimulou o desenvolvimento de bactérias benéficas tais como *Lactobacillus*.

Bergsson et al. (2002), apud Rossi et al. (2009), sugeriram que em pH baixo, a membrana exterior de lipopolissacarídeos das bactérias Gram negativas torna-se menos densa, permitindo a entrada de AGCC, uma vez que se dissociam em anions no pH neutro do citoplasma, provocam depleção da energia celular.

Em uma revisão sobre o tema, Rossi et al. (2010) discute sobre a importância da suplementação com AGCC de leitões na fase de pós-desmame, visto tratar-se de um evento estressante para os animais, que contribui para a incidência elevada de problemas entéricos. No desmame, a alimentação muda de forma abrupta, passando do leite materno para ração peletizada, porém, a capacidade de digestão do intestino delgado ainda é limitada, ocorrendo redução acentuada na ingestão de alimentos nos primeiros dias. Esta redução provoca uma diminuição da massa do intestino, com redução das vilosidades intestinais, que contribui para um aumento na taxa de mortalidade.

Tawan et al., (2009), avaliaram com sucesso o efeito da suplementação de rações para frangos com uma mistura de ácidos graxos de cadeia curta (C8-C12) na susceptibilidade de colonização por

Campylobacter jejuni. No estudo, os autores observaram que a quantidade de *C. Jejuni* necessária para colonizar 50% das aves inoculadas foi 200 vezes maior para o grupo que consumiu ração suplementada com AGCC, além de influenciar no ganho de peso em 49 gramas por ave.

O uso do suplemento alimentar contendo AGCC é proposto como uma alternativa viável para a alimentação livre de antibióticos e podem ser utilizados para promover o crescimento, bem como, servir como um tratamento preventivo e curativo para problemas gastrointestinais (Decuypere e Dierick, 2000; Mroz, 2005, apud Rossi et al., 2010).

1.6 DOENÇAS CAUSADAS POR ALIMENTOS - DTA

Todos os anos, milhões de pessoas sofrem de alguma doença de origem alimentar causada pelos mais diversos agentes. A contaminação do alimento pode causar desde uma leve indisposição até uma doença crônica e a morte. Os microrganismos patogênicos causam enfermidades a partir de 3 tipos de mecanismos: infecção, toxinose e toxinfecção. A infecção ocorre quando há ingestão de células viáveis seguida de colonização e multiplicação dentro do trato gastrointestinal, como por exemplo a salmonelose e a listeriose. A toxinose decorre da ingestão de toxinas pré formadas nos alimentos, não havendo a necessidade de ingestão de células viáveis. A toxinfecção ocorre quando há colonização dos microrganismos patogênicos e a formação das toxinas dentro do trato gastrointestinal, como nas doenças causadas por *Clostridium perfringens* (KRASZCUZUK, 2010).

Em 2007, a salmonelose foi a segunda doença zoonótica mais comum na União Europeia (EFSA, 2009). A avaliação quantitativa de risco microbiano a partir do produtor ao consumidor, que foi desenvolvida para avaliar o risco de salmonelose humana através do consumo de produtos frescos de carne suína na Bélgica, estimou que o número médio de casos anuais foi de 20.513 (BOLLAERTS et al. 2009, apud MESSENS, 2010) Na Bélgica, *Salmonella typhimurium* foi responsável por 56,2% dos casos de salmonelose humana em 2007 e foi o sorotipo predominante (63%) isolado de carcaças de abate de suínos

No Brasil, em 2011, forma registro mais de 700 surtos envolvendo alimentos contaminados, com aproximadamente 12.000 casos registrados conforme a Figura 2.

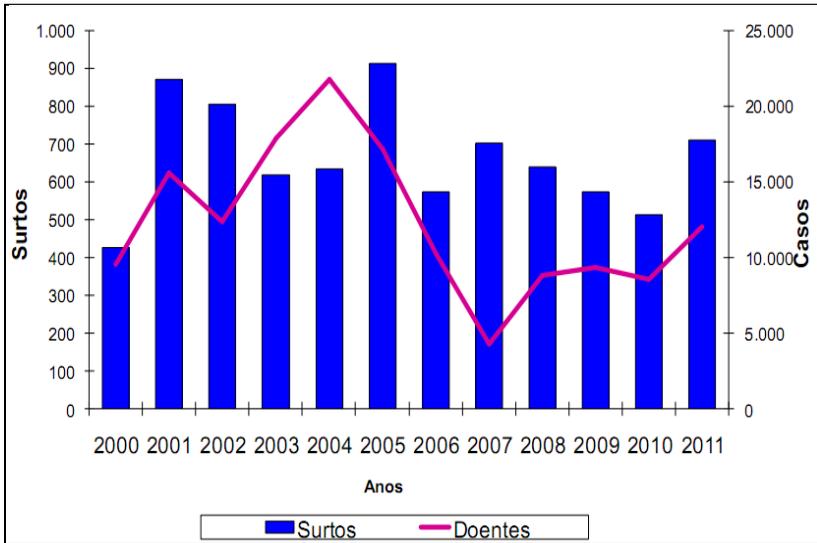


Figura 2 Série histórica de surtos e casos no Brasil, 2000-2011. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2013.

Dos 3.487 alimentos envolvidos em surtos entre o período de 2.000 e 2.011, 358 foram referentes a carne bovina in natura, processados e miúdos, 225 carne de frango e miúdos e 189 carne suína, processados e miúdos, totalizando mais 20% do total dos alimentos conforme a Figura 3 (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2013).

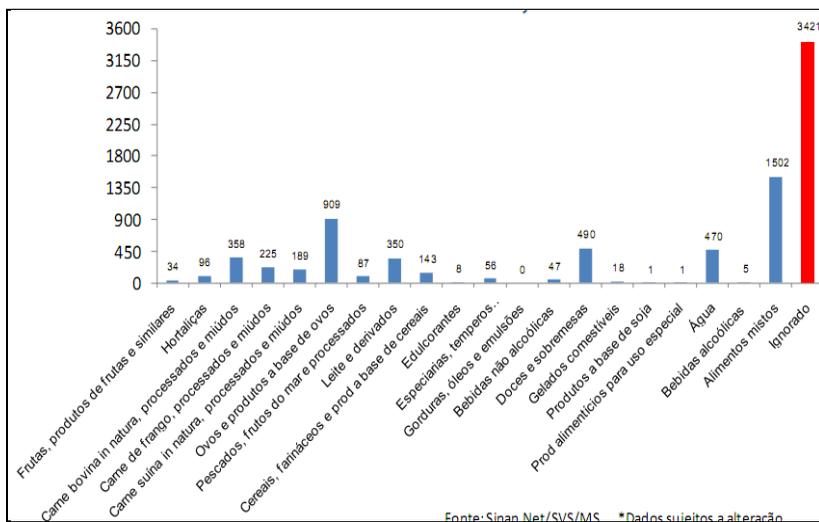


Figura 3 Classe de alimentos envolvidos nos surtos. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2013.

Os agentes frequentemente envolvidos nos surtos identificados entre 2.000 e 2.011 foram *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Echerichia coli*, *Clostridium perfringens*, Rotavirus e Hepatite A, conforme a Figura 4.

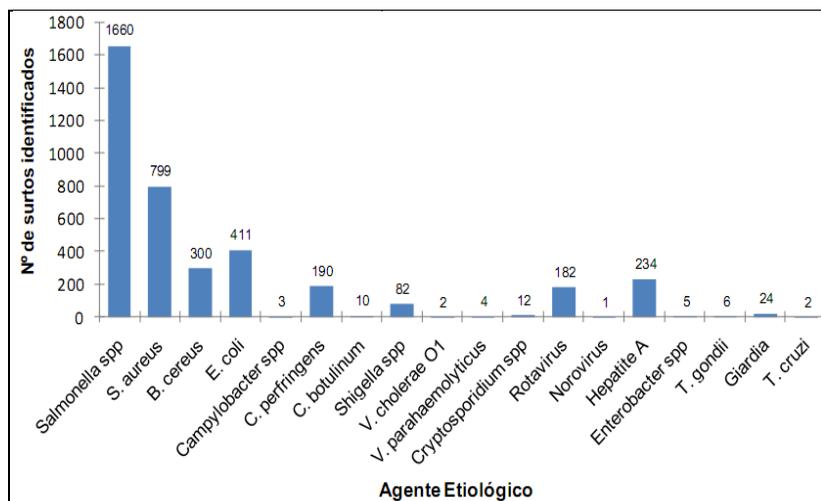


Figura 4 Agentes etiológicos identificados por surto. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2013.

1.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Uma grande variedade de metodologias utilizadas em laboratório pode ser empregada para mensurar a susceptibilidade *in vitro* de bactérias a agentes com atividade antimicrobiana. Os principais métodos microbiológicos utilizados na detecção de atividade antimicrobiana podem ser classificados em ensaio bioautográficos, ensaio de difusão e ensaios de diluição (NCCLS, 2003ab).

Os ensaios bioautográficos são métodos em que os compostos a serem pesquisados são separados por cromatografia de camada delgada e colocados por contato ou imersão em ágar previamente inoculados com o microrganismo “teste”, sendo que zonas de inibição de crescimento indicam a presença de atividade antimicrobiana (PRADO, 2013).

Os ensaios por difusão fundamentam-se na difusão da substância a ser testada em um meio de cultura sólido e inoculado com um micro-organismo. A partir da difusão ocorre o aparecimento de um halo, onde não há crescimento do microrganismo. Podem ser empregados diferentes tipos de reservatórios, incluindo disco de papel, cilindros de porcelana ou aço inox e orifícios feitos no meio de cultura. A substância “teste” é colocada em contato com o meio de cultura inoculado e a maneira como se processa esse contato define os diferentes métodos de difusão. Após a incubação, os diâmetros dos halos de inibição são medidos com régua, paquímetro ou leitor de halos (VANDEN BERGHE e VLIETINCK, 1991 apud PRADO, 2013).

Os métodos de diluição, por sua vez, são aqueles nos quais os extratos ou substâncias a serem testados são adicionados a meios de culturas líquidos ou sólidos adequados, previamente inoculados com o microrganismo “teste”. Pode ser realizado de várias formas, dentre elas, a diluição em placa de microtítulo. O método de diluição em líquido é o que apresenta a metodologia mais complexa, entretanto, alguns pesquisadores o consideram como o mais preciso. É recomendado para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI), que constitui a menor concentração do agente microbiano capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo num determinado tempo (NCCLS, 2003).

1.8 MICROENCAPSULAÇÃO EM ALIMENTOS

A tendência mundial aponta para que os alimentos não sejam mais somente vistos como uma fonte de nutrientes com apelo sensorial,

mas também como fonte de bem-estar e saúde para os indivíduos (GOMES, 2011). Desta forma, a inovação na indústria necessita de mudança no foco para observações e controle das estruturas hierárquicas no alimento e sua funcionalidade. A liberação controlada de certos ingredientes de alimentos no lugar certo e na hora certa é uma funcionalidade-chave que pode ser alcançada pela microencapsulação (GOUIN, 2004).

Na indústria de alimentos a microencapsulação têm sido muito utilizada para o recobrimento de aromas e corantes, visando principalmente à retenção dos componentes voláteis (CHUMPITAZ, 1995).

Trata-se de uma técnica pela qual gotículas de líquido, partículas sólidas, ou compostos gasosos são aprisionados em filmes de um agente de grau alimentício microencapsulante. O núcleo pode ser composto de um ou vários ingredientes e a parede pode ser única ou ter duas camadas. A retenção desses núcleos é controlada por sua funcionalidade química, solubilidade, polaridade e volatilidade (GHARSALLAOUI et al., 2007). Graças aos ingredientes microencapsulados, muitos produtos que foram considerados tecnicamente inviáveis tornaram-se agora possíveis de serem utilizados. Os ingredientes que compõe o núcleo são totalmente envoltos em uma matriz encapsulante, conferindo assim estabilidade e diminuição de propriedades originais que dificultam a utilização.

Shahidi e Han (1993) propuseram seis razões para aplicação de microencapsulação na indústria de alimentos: reduzir a reatividade do núcleo com fatores ambientais; diminuir a taxa de transferência do material do núcleo para o exterior; promover um manuseio mais fácil; controlar a liberação do material do núcleo; mascarar o sabor; diluir o material do núcleo, quando este deve ser utilizado em apenas pequenas quantidades.

São mais de 200 métodos para microencapsulação patenteados. Entre os métodos químicos, estão: coacervação complexa, polimerização interfacial, gelificação iônica, incompatibilidade polimérica e formação de lipossomas (GIBBS et al., 1999) e entre os métodos físicos destacam-se: secagem por atomização ou “*Spray Drying*”, liofilização, extrusão e encapsulação por leiteo fluidificado. Os processos mais utilizados pela indústria de alimentos podem ser divididos em métodos físicos (extrusão, atomização, “*pan coating*”, liofilização, “*spray cooling*” e “*spray chilling*”, por exemplo), métodos químicos (polimerização interfacial, inclusão molecular, por exemplo) e

métodos físico-químicos (coacervação simples, coacervação complexa, lipossomas, partículas lipídicas sólidas, por exemplo) (GOMES, 2011). As micropartículas podem possuir diferentes formas que variam desde um recobrimento de membrana simples, uma parede ou membrana, uma forma esférica ou irregular, uma estrutura de multiparedes de mesma composição, ou ainda diversos núcleos com uma mesma estrutura de parede (GIBBS et al., 1999). Gomes (2011) classifica as partículas formadas através da encapsulação em três classes: macro ($>5.000 \mu\text{m}$); micro ($1,0\text{-}5.000 \mu\text{m}$); e nanopartículas ($<1,0 \mu\text{m}$), sendo que as mesmas podem apresentar diferentes formas, dependendo do processo utilizado.

1.8.1 Microencapsulação por atomização

A tecnologia “*spray Drying*” é uma operação unitária em que um produto líquido é atomizado em uma corrente de gás quente instantaneamente a fim de obter um pó. O gás usado geralmente é o ar ou mais raramente um gás inerte como o nitrogênio. A alimentação líquida inicial do pulverizador pode ser uma solução, uma emulsão ou suspensão (GHARSALLAOUI et al., 2007). Pode-se observar na Figura 7 a representação esquemática do atomizador. Durante o processo, a rápida evaporação da água permite manter uma baixa temperatura das partículas. Desta forma, esta técnica permite a secagem sem afetar demasiadamente a qualidade do material encapsulado (RÉ, 1998).

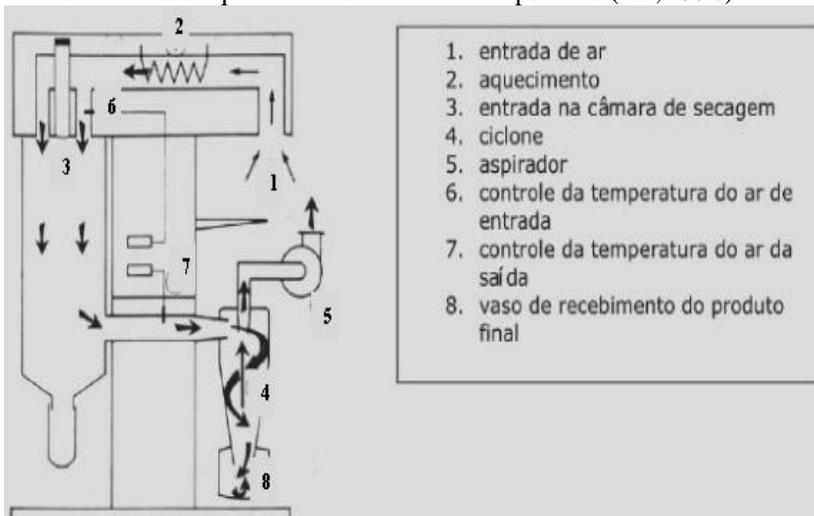


Figura 5 Representação esquemática do funcionamento de um atomizador. PRADO 2013.

A atomização do líquido em pequenas gotículas pode ser realizada por pressão ou energia centrífuga. Os atomizadores utilizados incluem: atomizador pneumático, bico de pressão, configurações de disco giratório, bico do fluido e bocal sônico. O objetivo é criar a máxima superfície de transferência de calor entre o ar e o líquido. A escolha da configuração do atomizador depende da natureza e viscosidade da matéria-prima e das características desejadas para o produto final. Quanto maior a energia fornecida, mais finas são as gotículas formadas, sendo que o tamanho das mesmas aumenta com a taxa de alimentação do atomizador e com o aumento da viscosidade e tensão superficial inicial da suspensão (GHARSALLAOUI et al., 2007).

O processo de secagem inicia com o contato das gotículas suspensas com o ar aquecido. De acordo com o tipo de atomizador, o processo de secagem pode ocorrer de duas maneiras distintas. O processo “em corrente” ocorre quando a suspensão é pulverizada na mesma direção do fluxo de ar de entrada (150-220°C) e a evaporação ocorre instantaneamente, na qual o produto seco sai com temperaturas entre 50-80°C, limitando a degradação térmica, e o processo “contracorrente” a suspensão é pulverizada frente ao fluxo de ar e o produto é exposto a temperaturas mais elevadas, limitando a aplicação deste processo em produtos que não são degradados termicamente (GHARSALLAOUI et al., 2007).

Com base na teoria fundamental de secagem, três passos sucessivos podem ser distinguidos: logo após as gotículas entrarem em contato com o ar aquecido, a transferência de calor causa a elevação da temperatura até a um valor constante. Após, a evaporação de água das gotículas é feita em temperatura e pressão constantes. Finalmente, quando o teor de água da gotícula atinge um limite crítico, uma crosta é formada na superfície da gotícula e a taxa de secagem diminui rapidamente. A secagem teoricamente terminou quando a temperatura da partícula se iguala com a do ar. Usualmente, o tempo de secagem pode ser na ordem de 5-100s. No entanto, em um sistema bem projetado, 15-30s são suficientes para a secagem (GHARSALLAOUI et al., 2007).

A temperatura do ar de entrada é diretamente proporcional à taxa de secagem das micropartículas e ao conteúdo final de água. Quando a temperatura de entrada do ar é baixa, a baixa taxa de evaporação causa a formação de micropartículas com membranas de alta densidade, alto teor de umidade, baixa fluidez, o que pode facilitar a aglomeração. Contudo, uma alta temperatura do ar de entrada causa uma evaporação excessiva e resulta em fissuras na membrana, induzindo a

liberação prematura, degradação do ingrediente microencapsulado e também perdas de voláteis. A temperatura do ar de entrada é normalmente condicionada por dois fatores: custo e faixa de temperatura que pode ser seguramente empregada, sem causar danos ao produto ou perigos operacionais (GHARSALLAOUI et al., 2007).

A primeira aplicação da secagem por Spray Dryer foi relatada para a fabricação de leite em pó em 1950 (CARNEIRO, 2011). A técnica tem sido utilizada por décadas para encapsular ingredientes alimentícios como: aromatizantes, lipídios e carotenóides (GHARSALLAOUI et al., 2007).

É o processo mais econômico e flexível e, portanto, o mais utilizado. Consiste na preparação de uma suspensão. Sua escolha depende de uma série de fatores, dentre eles o tamanho de partícula requerido, as propriedades físicas e químicas do material encapsulante e do bioativo, mecanismos desejados de liberação, escala de produção e custo (GOMES, 2011).

A técnica envolve três passos básicos: preparação da dispersão; homogeneização e atomização. Na última etapa, ocorre a desidratação das partículas atomizadas. Pode-se observar na Figura 8 a representação esquemática do processo de microencapsulação em "*Spray-Drying*".

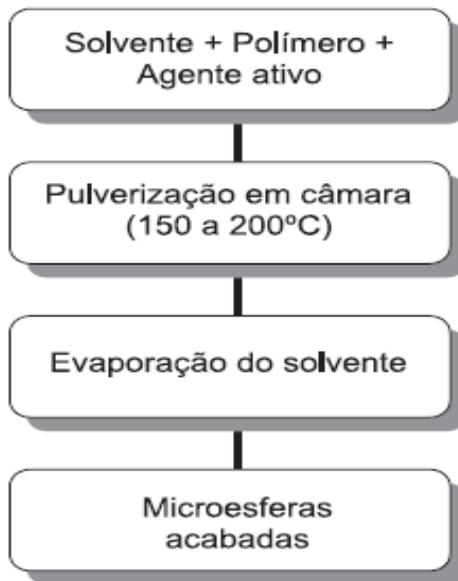


Figura 6 Representação esquemática do processo de encapsulação por "spray Drying". SUAVE et al., 2006.

De acordo com Jafari et al., (2008) a eficiência da microencapsulação de óleos é influenciada pela estabilidade inicial da suspensão. Uma suspensão estável é aquela que não tem mudanças perceptíveis na distribuição do tamanho das gotas, em seu estado de agregação ou em seu arranjo espacial em uma escala de tempo de observação. Para a obtenção de uma suspensão cineticamente estável, deve-se prevenir a coalescência das gotas após sua formação. Isso é normalmente conseguido fazendo uso de surfactantes durante o processo de homogeneização

Conforme Dias, (2009), 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.

Uma observação de grande importância é a relação entre a massa do núcleo e a massa do material de suporte. Na maioria dos estudos publicados, uma relação típica é de 1:4 (20% de núcleo no pó encapsulado), sendo adotado e reportado para vários materiais, incluindo a goma arábica e amidos modificados (JAFARI et al., 2008).

Ahn et al. (2008) em um estudo de otimização da microencapsulação de óleo de girassol, constatou que em relação à eficiência de microencapsulação, as condições otimizadas foram: 23,6% de óleo de girassol, 19% de proteína isolada de leite, 2,5% de lecitina de soja e 54,8% de dextrina, sendo que, nessas condições, a eficiência de encapsulação foi 96,6%. Além disso, concluiu que o efeito da pressão de homogeneização não foi significativo.

Diversos estudos verificaram o efeito da temperatura de entrada e saída na eficiência de microencapsulação de óleos e “*flavors*”. Sabe-se que temperaturas de entrada do ar suficientemente altas (160-220°C) permitem a formação rápida de uma membrana semipermeável na superfície da partícula, resultando em uma retenção ótima de “*flavor*” (JAFARI et al., 2008).

Rodrigues (2004) estudou a produção de micropartículas de extrato de café por atomização, usando como agente encapsulante a maltodextrina, a goma arábica e a goma de cajueiro. Para a determinação das melhores condições de temperatura de secagem e da relação núcleo/concentração de material de parede, foram avaliadas as temperaturas 150, 180 e 200°C e a relação núcleo/material de parede de 10%, 20 % e 30%, usando maltodextrina. Os melhores resultados foram obtidos para a temperatura de 180° C com 20% de material de núcleo em relação à concentração de material de parede.

Dependendo das propriedades físico-químicas do núcleo, a composição da parede, e a técnica de microencapsulação usada, diferentes tipos de partículas podem ser obtidos. Entre as estruturas que são frequentemente reportadas estão esferas simples cercadas por uma camada de espessura uniforme; partículas contendo um núcleo de forma irregular; partículas de vários núcleos numa matriz contínua; vários núcleos distintos dentro da mesma cápsula e multi-micropartículas multicamadas, conforme podem ser observadas na Figura 9 (GHARSALLAOUI et al., 2007).

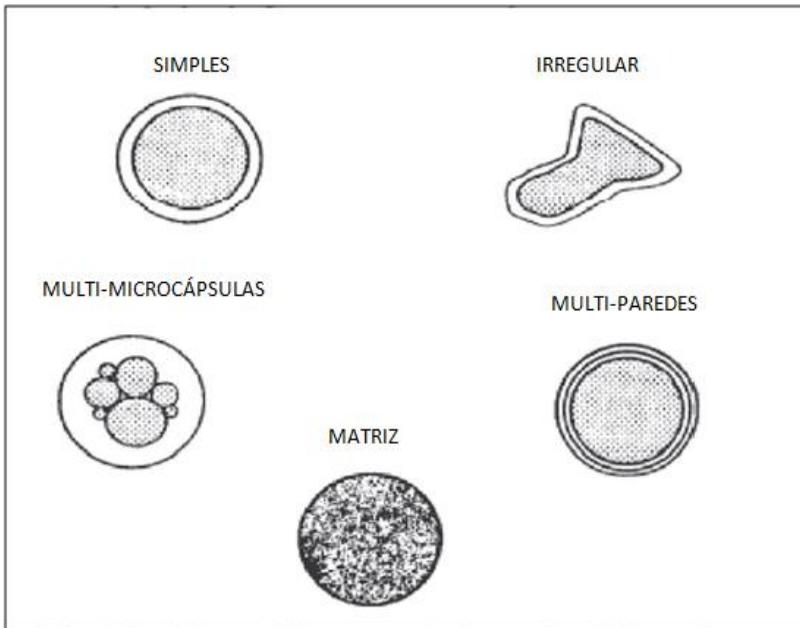


Figura 7 Morfologia dos diferentes tipos de micropartículas. GIBBS et al. 1999.

1.8.2 Matrizes Encapsulantes

Atualmente, diferentes materiais têm sido utilizados como suporte ou matrizes para a microencapsulação de compostos ativos, entre eles a goma arábica, a maltodextrina e o amido modificado. Entre as características que são consideradas estão o custo, a viscosidade, e estabilidade, proteção contra a oxidação e retenção de compostos

voláteis (KENYON; ANDERSON, 1988; REINECCIUS et al., 1991; BHANDARI et al., 1992; SHAHIDI; HAN, 1993).

As propriedades ideais da matriz incluem a facilidade de manipulação durante o processo, capacidade de dispersar o óleo e estabilizar a emulsão produzida, reatividade nula com o agente encapsulado, capacidade de proporcionar máxima proteção frente às condições ambientais, solubilidade nos solventes utilizados na indústria alimentícia e custo compatível a uma substância de uso alimentício. É praticamente impossível que uma substância reúna todas as propriedades desejadas (CHUMPITAZ, 1995; CARNEIRO, 2011).

1.8.2.1 Goma Arábica

A goma arábica ou goma acácia, é um exudado da seiva da árvore do gênero *Acácia*. É a mais antiga das gomas (2650 a. C.). Tem sua origem principal na África. Os principais países produtores de goma são Senegal, Mali, Mauritania, Nigéria e Sudão. O pó tem coloração branca ligeiramente amarelada, inodoro e insípido. As especificações são: total de cinzas menor que 4%; ácidos insolúveis menor que 0,5%; água e resíduos insolúveis menor que 1%; e, 12% de umidade. Quimicamente é considerada um sal de pouca acidez, formado por um polissacarídeo complexo contendo cálcio, magnésio e íons de potássio (NUSSINOVITCH, 1997, apud DIAS, 2009).

As gomas são usadas para modificar a textura de determinados alimentos e, como efeitos secundários, encapsulam, estabilizam a emulsão e controlam a cristalização. Historicamente, a goma arábica constitui o agente encapsulante mais utilizado na microencapsulação de óleos pela sua versatilidade, solubilidade, baixa viscosidade e excelentes propriedades surfactantes. É composta de açúcares simples em uma estrutura altamente ramificada e contém cerca de 2% de proteína. Tem se demonstrado que a goma arábica se adsorve na interface óleo/água formando uma película viscoelástica, onde os lipídios contribuem para aumentar a coerência da estrutura através da formação de ligações com as cadeias da goma arábica (MATSUMARA et al., 2000).

O núcleo da goma está formado principalmente por (1-3)- β -D-galactano e várias cadeias laterais de galactopiranosido, unidas mediante ligações β -(1-6) que por sua vez podem conter L-arabinose, conforme a FIGURA 5.

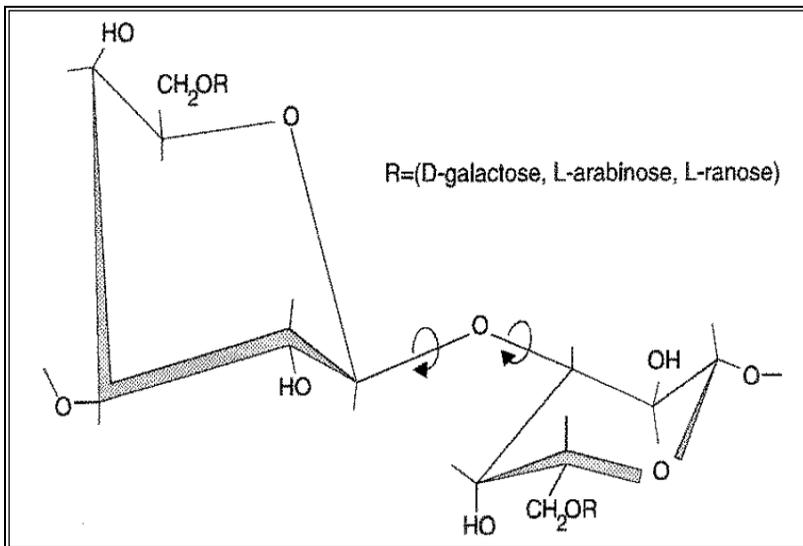


Figura 8 Estrutura da cadeia principal da goma arábica. ROBINSON, 1991.

A goma arábica se dissolve com facilidade com agitação em água. Essa é uma propriedade ímpar entre as gomas alimentícias, exceto para as que foram despolimerizadas para produzir tipos de baixa viscosidade. Com sua capacidade tensoativa, forma uma camada macromolecular espessa em torno das gotículas de óleo, de modo a produzir estabilização espacial.

Suspensões elaboradas com flavorizantes oleosos e goma arábica podem ser secas por atomização para produzir pós não higroscópicos e protegidos da oxidação e volatilização (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010). No entanto, Sootitiantawat et al., (2005), afirmam que a estrutura da goma é altamente permeável ao oxigênio e sugerem a combinação de outros polímeros para a redução desta permeabilidade e aumento da proteção aos núcleos sensíveis a oxidação.

1.8.2.2 Maltodextrina

As moléculas de amido, como todas as outras moléculas de polissacarídeos, são despolimerizadas por ácidos a quente e enzimas. Despolimerizações mais intensas produzem dextrinas. Essas, por sua vez, possuem baixa viscosidade e possuem propriedades formadoras de filmes, podendo ser utilizadas em alimentos revestidos, como agentes de

encapsulação e carreadores de aromas, em especial aromas secos por atomização. Quando a hidrólise de amido é parcial, há produção de malto-oligossacarídeos, os quais são comercialmente conhecidos como maltodextrinas ($(C_6H_{12}O_5)_nH_2O$), polímero sacarídeo formado de unidades D-glicose unidas principalmente por ligações α -1,4 conforme a FIGURA 6 (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

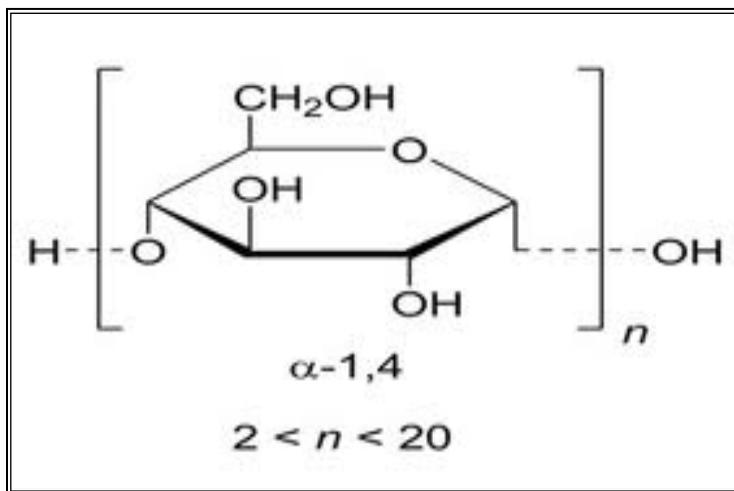


Figura 9 Estrutura Química da Maltodextrina. ROBINSON, 1991.

Maltodextrinas ou amidos hidrolisados são extensivamente utilizados na microencapsulação por atomização. Estão disponíveis em diferentes dextroses equivalentes (DE), que são relacionadas com o grau de polimerização do amido (DP) e indicam o grau de hidrólise do amido (GHARSALLAOUI et al., 2007). O valor de DE para esses produtos deve ser menor que 20.

As principais vantagens são: custo relativamente baixo, aroma e sabor neutros e baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos. Além disso, oferecem boa proteção contra oxidação. Porém, não apresenta capacidade emulsificante, sendo desejável a combinação com outros materiais com objetivo de melhorar o processo de microencapsulação. A proteção das substâncias ativas contra a oxidação por parte das maltodextrinas varia bastante, dependendo do valor de DE. Quanto maior esse valor, maior a proteção proporcionada devido à menor permeabilidade ao oxigênio do ar (SHAHIDI & HAN, 1993; JAFARI et al., 2008).

1.8.2.3 Amidos Modificados

Amidos nativos têm sido amplamente utilizados na indústria de alimentos, no entanto, os mesmos apresentam algumas desvantagens, como insolubilidade em água fira e perda de viscosidade durante o processo, o que têm limitado sua aplicação. Porém, essas deficiências são eliminadas pela modificação da estrutura das moléculas. Essas modificações podem ser físicas (tratamento térmico, exposição a radiações, entre outros), químicas (reagentes específicos) ou biotecnológicas (processo enzimático). Os objetivos dessa modificação são: diminuição da retrogradação; aumento da estabilidade ao resfriamento, ao descongelamento e a adesividade; melhora da textura das pastas ou géis e da formação de filmes; adição de grupamentos hidrofóbicos e, conseqüentemente, poder emulsificante (BEMILLER, 1997, apud CARNEIRO, 2011).

As modificações podem ser de um só tipo, porém, com frequência são utilizadas combinações de até quatro processos. Os processos químicos atualmente envolvem: esterificação com anidrido acético, anidrido succínico, uma mistura de anidrido acético e ácido adípico, anidrido 1-octenilsuccínico, cloreto de fosforil, trimetafosfato de sódio, ortofosfato monossódico; esterificação com óxido de propileno; modificação ácida com ácido clorídrico e sulfúrico; branqueamento com hidrogênio, ácido peracético, permanganato de potássio e hipoclorito de sódio; oxidação com hipoclorito de sódio; e várias combinações dessas reações (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

Os amidos modificados são muito utilizados na microencapsulação de ingredientes alimentícios por apresentar excelente retenção de voláteis, pela estabilização da suspensão e por apresentar baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos (KING; TRUBIANO; PERRY, 2006, apud CARNEIRO, 2011).

A viscosidade das soluções de um amido modificado é substancialmente menor que a da goma e, portanto é possível usar níveis elevados de sólidos nas suspensões (até 50%), a qual reduz a perda de voláteis no processo de microencapsulação por atomização. Também, sua utilização possibilita a obtenção de glóbulos com diâmetros menores que 2µm, garantindo melhor estabilidade na suspensão (REINECCIUS, 1991, apud CHUMPITAZ, 1995).

Dentre os amidos modificados utilizados no processo de microencapsulação em Spray Drying, o Capsul® representa uma boa

alternativa. É modificado com octenilsuccinato, resultado de pesquisas da *National Starch and Chemical Corporation*, com capacidade de formar suspensões finas e com capacidade de formação de película, sendo eficaz na retenção de voláteis e materiais ativos no núcleo, bem como, na minimização da retenção destes na superfície das micropartículas na secagem por atomização (KING et al., 1976, apud ABURTO, 1998).

1.9 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO FINAL

1.9.1 Retenção superficial e interna do óleo

Normalmente a amostra com óleo encapsulado é tratada com hexano ou éter de petróleo durante 15 minutos em temperatura ambiente. Para calcular a eficácia da microencapsulação é necessário extrair quantitativamente a fração do óleo encapsulado. Dependendo da matriz encapsulante, podem-se utilizar tratamentos com ácidos ou bases para a hidrólise e posterior liberação do óleo. Na Figura 6 pode ser observada a representação esquemática da extração de óleos microencapsulados e o cálculo para a eficácia da microencapsulação.

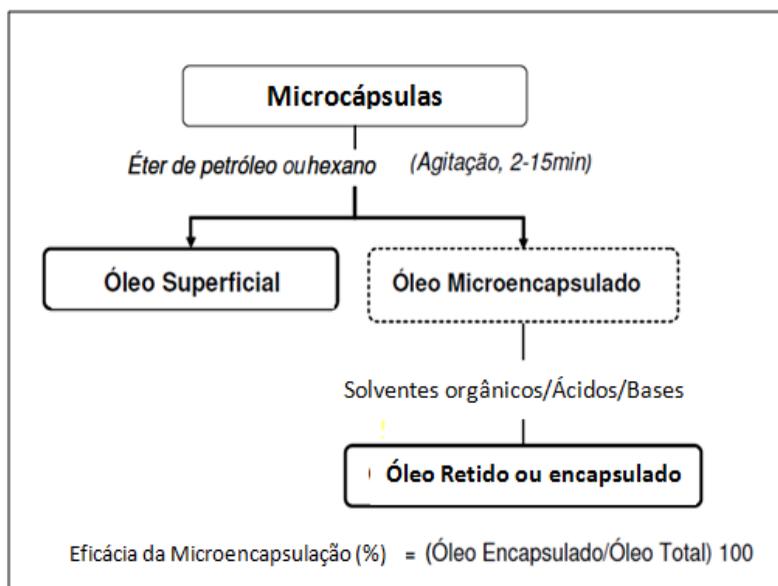


Figura 10 Representação esquemática da extração das frações microencapsuladas e superficial VELASCO, J.; DOBARGANES et al., 2003.

1.9.2 Estrutura das micropartículas

A proteção que o material de parede oferece ao núcleo das micropartículas depende das propriedades internas e externas da estrutura e da distribuição do núcleo. Esses fatores podem ser estudados por diversos métodos de microscopia, particularmente a técnica SEM (*Scanning Electron Microscopy*) ou de microscopia eletrônica de varredura (MEV) que apresenta boa profundidade de campo e excelente resolução (CHUMPITAZ, 1995).

1.9.3 Propriedades Térmicas

1.9.3.1 Termogravimetria (*Thermogravimetric analysis* - TGA) e Calorimetria exploratória diferencial (*Differential Scanning Calorimetry* - DSC)

A TGA nos permite medir a variação de uma substância em função da temperatura ou do tempo. Sendo assim, é um sistema com vasto campo de aplicação na caracterização do comportamento térmico de materiais (WENDLANT, 1986). A amostra do material é colocada em uma plataforma de uma balança de precisão acoplada a um forno, de maneira que a temperatura da amostra pode ser controlada variando-se a potência do forno. Os resultados são apresentados sob forma de curva termogravimétrica (TGA), na qual a variação da massa é registrada em função da temperatura ou do tempo (CIENFUEGOS; VAITMAN, 2000, apud OZÓRIO, 2007).

A técnica é útil em determinações complexas e qualquer mudança na velocidade de perda de peso pode ser prontamente identificada pelas inflexões que indicam reações consecutivas, sendo que mudanças de massa que ocorram em temperaturas próximas podem ser perfeitamente identificáveis (VOGEL, 2002 apud OZÓRIO, 2007). Esse parâmetro é relevante para estudar o comportamento de processabilidade em função da temperatura. Por ser uma característica específica para cada material, consistem em uma ferramenta para identificação de compostos (MACHADO, 2004).

A DSC é uma técnica de análise térmica que detecta alterações na temperatura da amostra que são resultado de transições entálpicas exotérmicas ou endotérmicas, ou reações tais como aquelas causadas por mudanças de fase, fusão, inversão de estruturas cristalinas, sublimação e

vaporização, reações de desidratação, dissociação ou decomposição, reações de oxidação e redução, desnaturação proteica e outras reações químicas (WENDLANT, 1986, apud OZÓRIO, 2007).

A aplicação de métodos térmicos de análise, em especial o DSC e a TG tem sido de fundamental importância no estudo de caracterização, desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos. As principais aplicações nessa área têm visado a caracterização de matérias-primas e produtos acabados a determinação do grau de pureza e a realização de ensaios de estabilidade e cinética de decomposição.

Conforme Ozório, (2007), a técnica DSC é uma grande ferramenta para a obtenção da Transição vítrea (T_g), efeito térmico que pode ser utilizado para a caracterização de plásticos e outros materiais amorfos ou semicristalinos como alimentos, onde os componentes nos materiais alimentícios apresentam efeitos similares aos dos polímeros.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABURTO, L. C.; TAVARES, D. Q.; MARTUCCI, E. T.; Microencapsulação de óleo essencial de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 18, no. 1, p. 1-7, 1998.
- AHN, J.H.; KIM, Y.P.; LEE, Y.M.; SEO, E.M.; LEE, K.W.; KIM, H.S. Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. **Food Chemistry**. v. 107, p. 98-105, 2008.
- ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.; ARANZAZU MARTÍNEZ, M. Probiotics for animal nutrition in the European Union.Regulation and safety assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v.45 p.91–95, 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the AOAC. 18th. Ed. AOAC, Arlington, VA, 2005.
- BHANDARI, B.R.; DUMOULIN, E.D.; RICHARD, H.M.J.; NOLEAU, I. & LEBERT, A.M. Flavor encapsulation by spray Drying: application to citral and linalyl acetate. **Journal of Food Science**, 57(1), p.217-221, 1992.
- BOYEN, F.; HAESEBROUCK, F.; VANPARYS, A.; VOLF, J.; MAHU, M.; VAN IMMERSEEL, F.; RYCHLIK, I.; DEWULF, J.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; Coated fatty acids alter virulence properties of Salmonella typhimurium and decrease intestinal colonization of pigs. **Veterinary Microbiology**. v. 132, p. 319-327, 2008.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>, acessado em: 08 ago 2011.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, Ministério da Saúde. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes>.
- BRENESA, A. ROURAB, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**. v. 158, p. 1-14, 2010.
- CARNEIRO, H. C. F., Microencapsulação de óleo de linhaça por *spray Drying*: Influência da utilização de diferentes combinações de materiais de parede. 2011. p. 91. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

- CHUMPITAZ, L. D. A., **Microencapsulação de óleo essencial de laranja por atomização**. 1995. p. 95. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O.; **QUÍMICA DE ALIMENTOS**. Artemed, 2010, 4ª ed. São Paulo, p. 131.
- DESCHEPPER, K. BRUGGEMAN, G. Evaluation of Aromabiotic as sustainable alternative of antibiotic growth promoters in pig nutrition. Disponível em: www.vitamex.com, acesso em 08 nov. 2011.
- DIAS, P. D. C. M., **Microencapsulação de óleo de peixe utilizando Goma arábica/maltodextrina e o complexo Caseína-pectina/maltodextrina**. 2009. p. 109. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- EFSA. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. **EFSA Journal**. p. 223, 2009.
- FAHY E, SUBRAMANIAM S, BROWN HA, GLASS CK, MERRILL AH JR, MURPHY RC, RAETZ CR, RUSSELL DW, SEYAMA Y, SHAW W. A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 46 839–862, 2005.
- FRANCO, B.D.G. de M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Atheneu, 2005, São Paulo, p.131.
- 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. 1107-1121, 2007.
- GIBBS, F. et al. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, vol. 50, p. 213-234, 1999.
- GOMES, G. V. L. Produção e caracterização microestrutural de sistemas lipídicos micro e nanoparticulados utilizados na encapsulação de beta-caroteno. 2011. p. 121. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.
- GOUIN, S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p. 330-347, 2004.
- HINTON, A. Jr.; Atividade bactericida dos sais alcalinos de ácidos graxos contra bactérias associadas ao processamento de aves. **XXII**

- Latin American Poultry Congress.** United States Department of Agriculture, USA. 2011.
- JAFARI, S.M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI. B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray Drying. *Drying Technology*, v.26, n.7, p.816-835, (2008).
- JAY,J.M.**Microbiologia de alimentos**.6.ed.,São Paulo,Ed.ArtmedS.A.,2008.
- KABARA, J. **Fats Are Good For You And Other Secrets.** North Atlantic Books, 2008, p. 16.
- KENYON, M.M. & ANDERSON, R.J. Maltodextrins and low-dextrose-equivalence with syrup solids. In: Flavor encapsulation (RISCH & REINECCIUS), 7-11, ACS Symposium series no 370, **American Chemical Society**, 1988.
- KRASZCZUK, V. **Verificação do processo de higienização pré-operacional de um abatedouro de aves.** Dissertação (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- MACHADO, B.D.L. Análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. In: **Técnicas de caracterização de polímeros**, São Paulo, 2004, p.229-261.
- MARTÍN-PELÁEZ, S. et al. Evaluation of the inclusion of a mixture of organic acids or lactulose into the feed of pigs experimentally challenged with Salmonella Typhimurium. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p.337-345, 2010.
- MATSUMARA, Y.; SATAKE, C.; EGAMI, M.; MORI, T.; Interaction of gum Arabia, maltodextrin and pullulan with lipids in emulsions. *Bioci. Biotechnol. Biochem.*, v. 64, p. 1927-1835, 2000.
- MESSENS, W. et al. Inhibition of Salmonella typhimurium by medium-chain fatty acids in an in vitro simulation of the porcine cecum. **Veterinary Microbiology**. v.14, p. 73-80, (2010).
- MOUNTZOURIS, K. C.; BALASKAS, C.; FAVA, F.; TUOHY, K. M.; GIBSON, G. R.; FEGEROS, K.; Profiling of composition and metabolic activities of the colonic microflora of growing pigs fed diets supplemented with prebiotic oligosaccharides. **Clinical microbiology**, v. 12, p. 178-185, 2006.
- OETTERER, M; REGITANO-D'ARCE, M.A.B; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. 1. edição, Editora Manole Ltda, Barueri - SP, 2006.
- OZÓRIO, R. A., Elaboração e caracterização de micropartículas de astaxantina com quitosana. 2007. p.101. Dissertação de Mestrado –

Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

PRADO, A. C. P.; MANION, B. A.; SEETHANRAMAN, K.; DESCHAMPAS, F. C.; BARRERA ARELLANO, D.; BLOCK, J. M. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 64-73, 2013.

RAMOS, L. de S. N. **Aditivos alternativos a antibióticos em rações para frango de corte**. Tese (Doutorado e Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2009.

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

REINECCIUS), 7-11, ACS Symposium series no 370, **American Chemical Society**, 1988.

ROBINSON, D. S., **Bioquímica y valor nutritive de los alimentos**. Zaragoza, Acribia S.A., 1991.

RODRIGUES, R. A. F. Preparo, caracterização e avaliação funcional de micropartículas obtidas por spray drying, contendo extrato de café crioconcentrado. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2004.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; TOLEDO, R.S., Enzimas e probióticos em rações para aves In: V SIMPÓSIO ACETAV – **Atualidades avícolas**, v.5 Fortaleza. Anais. Fortaleza: ACETAV. 2000.

ROSSI, R.; PASTORELLI, S.; CORINO, C. Recent advances in the use of fatty acids as supplements in pig diets: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 162, p. 1-11, 2010.

SCHWARTZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary Research**, v. 32, n. 3-4, p. 201-225, 2001.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH T.R.; Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents** v.17, p. 431-437, 2001.

SCRIMGEOUR, C. Chemistry of Fatty Acids. In: SHAHIDI, F. Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects. 6.ed., v.1, EUA, **Wiley – Interscience**, 2005.

SEMJÉN, G. The effects of Intervention on antimicrobial resistance. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Vanloese, v. 6, n. 93, p.105-110, 2000.

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

- 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.
- SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E.C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V.; Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.
- TWAN, V. G.; BOUMA, A.; KLINKENBERG, D.; WAGENAAR, J. A.; JACOBS-REITSMA, W. F. STEGEMAN. A.; Medium chain fatty acid feed supplementation reduces the probability of campylobacter jejuni colonization in broilers. **Veterinary Microbiology**, v. 143, p. 314-318, 2009.
- VELASCO, J.; DOBARGANES, C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. Variables affecting lipid oxidation in dried microencapsulated oils. **Grasas y Aceites**, v. 54, fasc.3, p. 304-314, 2003.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICROPARTÍCULAS CARREGADAS DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA OBTIDAS POR SPRAY DRYING

**CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
MICROPARTÍCULAS CARREGADAS DE ÁCIDOS GRAXOS
DE CADEIA CURTA OBTIDAS POR SPRAY DRYING
RESUMO**

No presente trabalho micropartículas contendo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foram obtidas por atomização em Spray Dryer. Dez formulações contendo diferentes proporções de amido modificado Capsul®, maltodextrina, goma arábica, L-fosfatidilcolina e Tween foram caracterizadas através de análises físico-químicas (eficiência da microencapsulação, teor de umidade, densidade, Espectroscopia de infravermelho - FTIR (*Fourier transform infrared spectroscopy*), microscopia eletrônica de varredura - MEV, calorimetria exploratória diferencial – DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) e análise termogravimétrica – TGA (*Thermogravimetric analysis*). Os AGCC foram submetidos às análises de concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) a fim de avaliar o potencial antimicrobiano, antes e após o processo de atomização. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que as formulações que continham surfactantes na composição (fosfatidilcolina e Tween 80) apresentaram melhor eficiência de microencapsulação (80%; 77,3% e 76,5% respectivamente), menor teor de umidade e menor densidade aparente. Para estas amostras também foram observadas estruturas na forma de esferas com menor tendência a agregação. Através dos espectros de FTIR foi possível observar que as partículas obtidas apresentaram diferenças na concentração de AGCC retido. Os termogramas de DSC e TGA revelaram a presença de um evento endotérmico, com temperatura *onset* de fusão de 137,17°C e com perda de massa (Δm) de 54,92% entre 188,40°C e 2951,15°C. A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) indicaram atividade antimicrobiana para todas as cepas testadas (*Escherichia coli* - ATCC 25922; *Salmonella enteritidis* - ATCC 13076; *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923; *Staphylococcus aureus* - ATCC 29213; *Listeria monocytogenes* - ATCC 19117 e, *Listeria monocytogenes* sorotipo 2 - ATCC 19112), antes e após a obtenção das micropartículas carregadas de AGCC. A técnica de Spray Drying se mostrou um método eficaz para a obtenção de um produto com maior estabilidade e pode tornar mais fácil e eficiente a utilização dos AGCC com atividade antimicrobiana na indústria. .

Palavras-chave: ácidos graxos de cadeia curta, micropartículas, atomização, atividade antimicrobiana, spray-drier.

ABSTRACT

Microcapsules containing short-chain fatty acids (SCFA) were obtained by atomization Spray dryer. Ten formulations containing different proportions of Capsul ® (modified starch) , maltodextrin, gum arabic , L- phosphatidylcholine and Tween were characterized by physico-chemical analysis (efficiency of microencapsulation , moisture content, density, infrared spectroscopy - FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy), scanning electron microscopy - SEM, differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis. The SCFA were analyzed for determinate the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) to evaluate the antimicrobial activity before and after the atomization process. According to the results, it was observed that formulations containing surfactants in the composition (L-phosphatidylcholine and Tween 80) showed better efficiency microencapsulation (80%; 77,3% and 76,5% respectively), less moisture content and less bulk density. For these samples also were observed structures in the form of spheres with fewer tendencies to aggregation. Through the FTIR spectra was observed that the particles obtained showed differences in the concentration of AGCC retained. The DSC and TGA thermograms revealed the presence of an endothermic event with onset melting temperature of 137.17 ° C and weight loss (Δm) 54.92 % from 188,40 °C and 295,15 °C. The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration showed antimicrobial activity against all tested strains (*Escherichia coli* - ATCC 25922 , *Salmonella enteritidis* - ATCC 13076 , *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923 , *Staphylococcus aureus* - ATCC 29213 , *Listeria monocytogenes* - ATCC 19117 and *Listeria monocytogenes* serotype 2 - ATCC 19112) before and after the atomization process of SCFA. The Spray Drying technique proved to be an effective method for obtaining a product with greater stability and can make use of ACGC with antimicrobial activity in the industry easier and more efficient.

Keywords: Short-chain fatty acids, microcapsules, atomization, antimicrobial activity, spray drier.

1 INTRODUÇÃO

Ácidos graxos de cadeia curta (menos de 14 átomos de carbono) são encontrados em algumas gorduras vegetais (coco, babaçu, palmiste e óleos de amêndoas) e na gordura do leite (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

Atualmente, muitas pesquisas têm sido direcionadas para encontrar alternativas naturais para os antibióticos sintéticos. Em alimentos para animais, antibióticos são adicionados para controlar patologias entéricas e respiratórias e/ou utilizados como melhoradores de desempenho. Esta prática vem sendo banida em vários países, principalmente em função do desenvolvimento nas últimas décadas de super bactérias resistentes aos antibióticos reportadas tanto em animais como em humanos (DIERICK, N. A. et al., 2002; RAMOS, L. S. N. 2009; ROSSI, R. et al., 2009). As bactérias resistentes aos antibióticos podem ser transmitidas ao ser humano a partir do consumo de produtos de origem animal, entretanto, não se pode determinar ainda os riscos dessa transmissão para a saúde pública. Entre os microrganismos potencialmente letais que podem ser transmitidos ao homem estão a *Salmonella* e a *Escherichia coli* (Consejo Nacional de Investigación, 1999).

Tem sido reportado que alguns ácidos graxos de cadeia curta apresentam efeitos sobre a mucosa intestinal, atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (ROSSI, R. et al., 2010).

Os ácidos graxos livres têm uma longa história de utilização como agentes antimicrobianos, inibindo determinadas enzimas ou mudando a estrutura da membrana celular de diferentes bactérias. Os ácidos graxos saturados de cadeia curta (AGCC) capríco (C6), caprílico (C8), cáprico (C10) e láurico (C12) exercem efeito contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos (KABARA, 2008; ROSSI, R. et al., 2010).

Suplementos alimentares contendo AGCC podem ser utilizados para promover o crescimento, bem como servir como um tratamento preventivo e curativo para problemas gastrointestinais (Rossi et al., 2010). Porém, a alta capacidade de volatilização e o estado físico líquido dificultam a utilização destes compostos nestes produtos. A microencapsulação por atomização em spray dryer, um processo onde gotículas de um líquido, partículas sólidas, ou compostos gasosos são aprisionados em filmes de um agente encapsulante tem sido estudada para facilitar a aplicação de diferentes compostos em alimentos, medicamentos e cosméticos. (GHARSALLAOUI et al., 2007). Entre as

vantagens da aplicação da técnica de microencapsulação na indústria de alimentos estão a proteção do material encapsulado contra o oxigênio e a luz; diminuição da taxa de transferência do material do núcleo para o exterior; manuseio mais fácil; liberação controlada do material do núcleo; proteção contra sabores indesejáveis e liberação controlada do material do núcleo (SHAHIDI E HAN, 1993).As micropartículas obtidas podem possuir diferentes formas que variam desde um recobrimento de membrana simples, uma parede ou membrana, uma forma esférica ou irregular, uma estrutura de multiparedes de mesma composição, ou ainda diversos núcleos com uma mesma estrutura de parede (GIBBS et al., 1999).

Diferentes materiais têm sido utilizados para o microencapsulação de compostos ativos, entre eles a goma arábica, a maltodextrina e o amido modificado. As características que são consideradas em um suporte são: custo, viscosidade, estabilidade, proteção contra a oxidação e retenção de compostos voláteis (KENYON; ANDERSON, 1988; REINECCIUS et al., 1991; BHANDARI et al., 1992; SHAHIDI; HAN, 1993).

Este trabalho teve por objetivo utilizar a tecnologia de Spray Drying para obter micropartículas carregadas de AGCC utilizando diferentes materiais de parede (maltodextrina, amido modificado Capsul® e goma arábica). As micropartículas obtidas foram determinadas as características físico-químicas e a atividade microbiana.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA PRIMA

Ácidos Graxos: mistura comercial de AGCC composta pelos ácidos caprótico, caprílico, cáprico e láurico - “AROMABIOTIC” - comercializada e gentilmente cedida pela empresa Nutrifarma – Nutrição e Saúde Animal - Brasil.

Material de parede: maltodextrina Mor-Rex 1920 (DE 20) e amido modificado Capsul®, ambos comercializados pela empresa Corn Products do Brasil, e goma arábica da marca Vetec. Para preparo da suspensão, foram utilizados os surfactantes Lecitina (composta de aproximadamente 60% de L- α -fosfatidilcolina gema do ovo) da Sigma-Aldrich (Germany) e TWEEN 80 (Polisorbato 80) Synth (USA). Todos os demais solventes e reagentes utilizados no experimento foram de grau analítico (P.A.) adquiridos da Hexis Científica.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Formulação para obtenção das micropartículas

Foram estudadas 10 formulações preparadas com diferentes proporções dos materiais encapsulantes, ácidos graxos e surfactantes (Tabela 2).. A quantidade de água utilizada para preparo das suspensões foi Q.S.P.

Tabela 02 – Formulações utilizadas para a obtenção das de micropartículas de AGCC por Spray Drying.

Formulação	AM/MD/GA ^a (g)	L- α - Fosfatidilcolina (g)	Tween 80 (g)	AGCC ^b (g)
F1	31/14/0	0	0,45	6,75
F2	31/14/0	0,9	0	6,75
F3	35/0/10	0,9	0,45	15,75
F4	31/14/0	0,9	0,45	15,75
F5	31/14/0	0,9	0,45	6,75
F6	35/0/10	0,9	0,45	6,75
F7	35/0/10	0	0,45	15,75
F8	35/0/10	0	0	15,75
F9	31/14/0	0	0	15,75
F10	35/0/10	0,9	0	6,75

(a) AM: amido modificado, MD: maltodextrina, GA: goma arábica AGCC: mistura de ácidos graxos de cadeia curta.

2.2.2 Preparo das suspensões:

Para o preparo das formulações, os materiais de suporte foram hidratados utilizando agitador mecânico (modelo TE-139 da marca Tecnal®) até a solubilização na fase aquosa. Após a solubilização do suporte a mistura de AGCC foi adicionada e a dispersão obtida foi homogeneizada em homogeneizador Ultra-Turrax (modelo IKA® T25 digital) durante 8 minutos a 10.000 rpm.

2.2.3 Atomização das suspensões

As formulações foram submetidas ao processo de atomização em Spray Drying da marca BÜCHI (modelo Mini B-290) utilizando 120 °C como temperatura de entrada e 50°C de saída; fluxo de ar de 35m³.h⁻¹ – 100%; taxa de alimentação 10 mL.min⁻¹ – bomba 25%. Os produtos obtidos foram então armazenados em sacos coletores e mantidos sob refrigeração a -24°C até o momento das análises (ABURTO, et. al., 1998).

2.2.4 Caracterização físico-química das micropartículas

As micropartículas obtidas foram caracterizadas através da determinação dos seguintes parâmetros:

2.2.4.1 Eficiência da microencapsulação

A eficiência da microencapsulação (EM) foi calculada de acordo com o método descrito por Bae e Lee (2008).

$$EM = (\text{óleo total} - \text{óleo microencapsulado} / \text{óleo total}) * 100$$

O óleo total foi determinado da seguinte forma: 100 mL de éter de petróleo foram adicionados em 10 g de amostra em erlenmeyer de 250 mL com rolha de borracha e agitado suavemente em temperatura ambiente por 15 min. A solução foi passada em funil de Büchner com papel filtro Whatman N° 4 e coletada um *erlenmeyer* previamente seco em estufa a 105°C por 2 horas e o solvente foi evaporado em evaporador rotatório TECNAL TE – 211 com temperatura de 30°C e levado a estufa a 80°C +/- 5°C até peso constante. Após, foi utilizada a mesma amostra para determinação do óleo retido no interior das micropartículas. Foram adicionados 100 mL de água destilada, 15 mL de hidróxido de amônia 25%, e, levado ao banho de aquecimento em capela de exaustão por aproximadamente 15min a 70°C. Após resfriado, foram adicionados 10 mL de álcool etílico, 25 mL de éter de petróleo e 25 mL de éter etílico, a mistura então foi agitada em funil de separação. A fase etérea foi transferida para um *erlenmeyer* previamente seco por 2 horas a 105°C, o solvente foi então evaporado em evaporador rotativo e o *erlenmeyer* seco em estufa a 80°C até peso constante.

2.2.4.2 Umidade

O teor de umidade e compostos voláteis foi determinado por gravimetria até peso constante de acordo com a metodologia 925.10 I da AOAC (1995).

2.2.4.3 Densidade

A densidade das micropartículas foi determinada através de Picnometria por gás Hélio em equipamento Micromeritics Accu Pyc II

340 Gas Pycnometer® com uso do Software 1340 AccuPyc®. Foram pesados entre 3 e 4g de amostra previamente seca em estufa a 105°C até peso constante. A amostra foi então transferida para uma cápsula de alumínio onde foi compactada com auxílio de um bastão de vidro até preencher 2/3 do volume da mesma.

Microestrutura: A morfologia da superfície das amostras e o tamanho das micropartículas foram avaliados através de microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca Philips, modelo XL-30. As amostras foram previamente recobertas com uma fina camada de ouro antes da obtenção das micrografias. A voltagem utilizada variou de 5 a 15 kV.

2.2.4.4 Análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise térmica das amostras foi realizada em equipamento DSC-60 “*Differential Scanning Calorimeter*” (Shimadzu®) seguindo o procedimento utilizado por Hansen et al. (2004). Foram pesados entre 2 – 3 mg de amostra em cápsulas de platina e submetidas a uma razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, no intervalo de temperatura de 25°C até 260°C, com taxa de fluxo de Nitrogênio de 50 mL.min⁻¹.

2.2.4.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises de TGA foram realizadas em termobalança modelo DTG-60 (Shimadzu – Kyoto, Japan) e equipamento TGA “*Termogravimetric Analyser*” (Shimadzu®) utilizando cadinho de platina contendo aproximadamente 5 mg de amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹, com taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ nas faixas de temperatura de 25 a 300°C e 25 a 800°C. A termobalança foi previamente calibrada com padrão de oxalato de cálcio.

2.2.5 Atividade Antimicrobiana dos AGCC: determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB)

A concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) foram determinadas antes e após a microencapsulação através do método de microdiluição, com base no documento M7-A6 (CLSI, 2009). Os ácidos graxos encapsulados foram

extraídos do interior das micropartículas através do método descrito no item 2.2.4.2.

2.2.5.1 Concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Foram testadas as seguintes espécies de bactérias: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117) e *Listeria monocytogenes* sorotipo 2 (ATCC 19112).

As culturas em TSA (*Trypticase Soy Agar*) foram repicadas para ágar sangue e incubadas a 35 °C por 12-18h, para pesquisa da morfologia das colônias e pureza da cultura. A partir das placas de TSA foram transferidas de 3 a 5 colônias isoladas para o caldo triptose de soja (TSB – *Tryptone Soy Broth*), incubado a 35 °C por 2 a 6 horas, a fim de obter-se uma cultura pura. O inóculo de cada espécie bacteriana, preparado a partir da cultura pura, foi diluído em solução salina 0,9% a uma concentração de aproximadamente 10⁸ UFC/mL, comparável à solução padrão de *McFarland* 0,5, verificada espectrofotometricamente a 625 nm. A suspensão foi diluída a aproximadamente 10⁷ UFC/ml, em solução salina para incubar os poços das placas de microdiluição.

O AGCC foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) à concentração de 100 mg/mL. A seguir, foram preparadas séries de diluições sucessivas, na faixa de 10 mg/mL a 0,075 mg/mL, em caldo Mueller-Hinton.

Foram adicionados aos poços das placas de microdiluição 100µL de cada solução diluída e 5 µL da suspensão bacteriana. Em cada placa, foram mantidos controles de esterilidade (sem adição de inóculo) e controles de crescimento (caldo Mueller-Hinton adicionado de DMSO e inóculo). As placas foram incubadas a 36 °C por 18h e o crescimento microbiano detectado visualmente e confirmado pela adição de 20 µL de solução aquosa de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% (m/v) com incubação adicional de 1 hora, à mesma temperatura. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados expressos em mg/mL. A CMI foi definida como a menor concentração de AGCC que inibiu totalmente o crescimento microbiano (SMÂNIA JR. et al., 1995).

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada com base na metodologia proposta por Celiktas et al. (2007), a partir das microplacas utilizadas para a determinação da CMI. De cada poço onde

não ocorreu crescimento microbiano visível, foram transferidas alíquotas (10 μ L) para placas de ágar triptona de soja (TSA). As placas foram incubadas a 36 °C por 24h e o crescimento de colônias foi verificado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mg/mL. A CMB foi definida como a menor concentração de AGCC que impediu totalmente o crescimento microbiano nas placas sem a presença do agente antimicrobiano.

2.2.6 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do programa SAS v 6.11. Os dados foram submetidos à análise de variância de comparação das médias ANOVA / testes de Tukey ($p < 0,05$). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

Na Tabela 03 podem ser observados os resultados obtidos para a eficiência da microencapsulação para as micropartículas obtidas.

Tabela 03 – Eficiência da microencapsulação determinada nas partículas obtidas.

Formulação	% AGCC superfície (S) ^a	% AGCC Interior (I) ^b	Total (S + I) ^c	Perda ^d
F1	10,2 ^C ±0.03	48,7 ^C ±0.10	58,9	41,1
F2	10,0 ^C ±0.14	47,7 ^C ±0.29	57,8	42,3
F3	8,8 ^D ±0.01	77,3 ^A ±0.15	86,1	13,9
F4	14,8 ^B ±0.01	46,9 ^C ±0.74	61,7	38,3
F5	5,1 ^E ±0.03	80,0 ^A ±1.41	85,1	14,9
F6	5,3 ^E ±0.04	76,5 ^B ±1.35	81,8	18,2
F7	15,3 ^A ±0.07	46,2 ^C ±0.80	61,4	38,6
F8	14,9 ^B ±0.01	45,6 ^C ±0.67	60,5	39,6
F9	15,0 ^A ±0.06	47,5 ^C ±1.21	62,5	37,5
F10	10,3 ^C ±0.08	48,4 ^C ±0.77	58,8	41,2

(a) Média ± Desvio Padrão para % de AGCC na superfície. (b) Média ± Desvio Padrão para % de AGCC microencapsulado. (c) Total (%) de AGCC na superfície (S) e interior (I) da micropartícula. (d) % de perda de AGCC no processo de microencapsulação. Letras na mesma coluna diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05\%$)

De acordo com os resultados obtidos as formulações F5, F6 e F3 apresentaram as menores concentrações de ácidos graxos retidos na parede do material encapsulante (5,1%; 5,3% e, 8,8% de AGCC, respectivamente). As maiores concentrações de AGCC no interior das micropartículas foram observadas para as formulações F5, F3 e F6 (80%; 77,3% e, 76,5%, respectivamente). De acordo com a análise estatística as mostras F3 e F5 não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para a eficiência de encapsulação. Porém, a formulação F3 foi realizada com 15,75 g (25,36%) de AGCC, o dobro da concentração se comparada à formulação F3 com 6,75 g (12,71%) de AGCC,

considerando a formulação F3 a que apresentou maior eficiência no processo de microencapsulação. Nota-se que as formulações F5, F3 e F6 apresentam em sua composição os surfactantes L- α -fosfatidilcolina e Tween 80, o que favoreceu a formação da suspensão, indispensável para a eficiência no processo de microencapsulação por Spray Dryer (HORWITZ, KRUT e Kaminsky, 1971).

Nas formulações F3 e F6 (com a mesma concentração de amido modificado e goma arábica, e concentrações de óleo diferentes (25,36% e 12,71%, respectivamente) a presença destes surfactantes foi suficiente para estabilizar as partículas. Quando as partículas foram formuladas com AM e MD o efeito de estabilização dos surfactantes aconteceu apenas para as micropartículas com concentração menor de AGCC (formulação F5 com 12,71%, quando comparada com a formulação F4 com 25,36% de AGCC). Aburto et al. (1998), em um estudo para microencapsulação de óleo essencial de laranja, reportaram eficiência de encapsulação de 90% utilizando como materiais de parede AM (10%) e MD (36%) com 10% de óleo na formulação, sem a utilização de surfactantes.

As amostras que apresentaram os melhores resultados para eficiência de encapsulação (F3, F5 e F6) foram caracterizadas e os resultados obtidos para umidade e densidade podem ser observados na Tabela 04.

Tabela 04- Teor de umidade e densidade das micropartículas F3, F5 e F6 obtidas por Spray Drying.

Formulação	Umidade (%)	Densidade (g/cm ³)
F3	3,88 ^C ±0.04	1,1377 ^E ±0.0003
F5	3,73 ^C ±0.06	1,1739 ^B ±0.0003
F6	6,16 ^A ±0.08	1,2322 ^A ±0.0013

F3 = 35g de AM + 10g de GA + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g de Tween 80 +15,75g de AGCC; F5 = 31g de AM + 14g de MD + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g Tween 80 + 6,75g de AGCC; F6 = 35g de AM + 10g de GA + 0,45g de Tween 80 + 6,75g de AGCC;

De acordo com os resultados obtidos, as micropartículas F5 e F3 apresentaram valores significativamente inferiores para teor de umidade quando comparadas com as micropartículas F6. As micropartículas F3. Prado (2013) observou resultados semelhantes nos

estudos realizados com uso destes surfactantes, obtendo suspensões mais estáveis para o processo de microencapsulação de extrato de noz pecã, refletindo em uma redução de umidade drástica no teor de umidade e densidade das micropartículas.

A formulação F3 apresentou o menor valor de densidade aparente, enquanto a formulação F6 a maior. Este fato pode ser explicado pela maior quantidade de AGCC na formulação F3 e conseqüentemente maior número de partículas com AGCC retido, contribuindo para a diminuição da densidade aparente e pelo maior teor de umidade presente na formulação F6. No entanto, Frascareli (2010) reportou valores de densidade maiores para formulações preparadas com MD, relacionando ao fato das micropartículas contendo MD apresentarem menor tamanho. Prado (2013) encontrou valores de densidade reduzidos para micropartículas carregadas com extrato de noz-pecã contendo GA e L-Fosfatidilcolina, atribuindo à melhora da suspensão e conseqüentemente maior teor de material encapsulado.

Na Figura 11 podem ser observados os espectros de FTIR para as micropartículas estudadas.

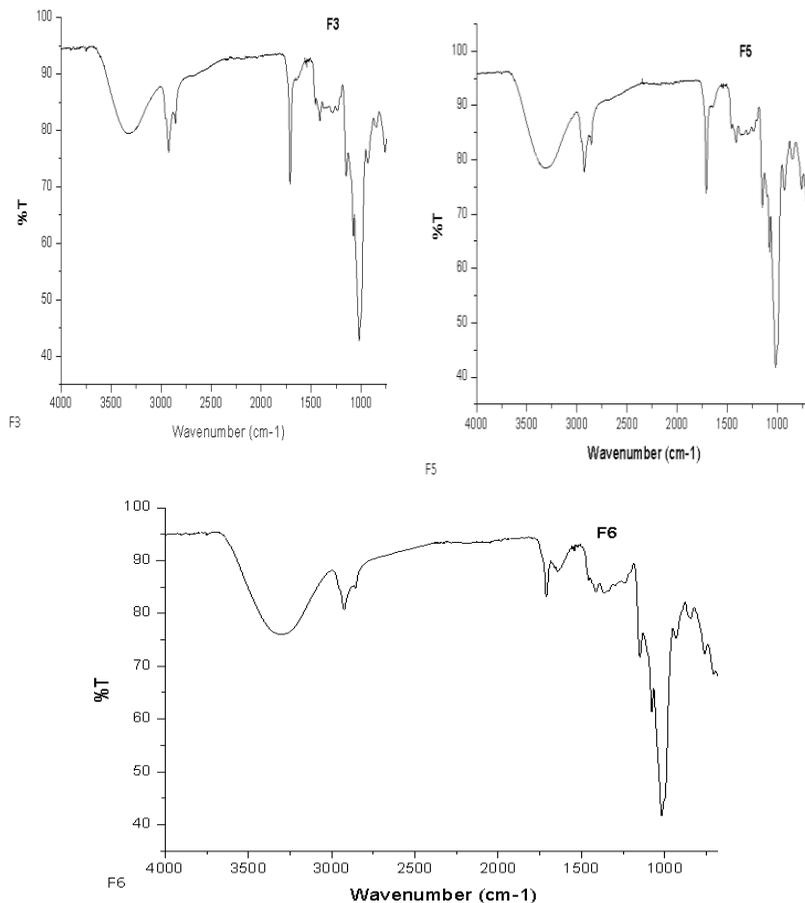


Figura 11 - Espectro FTIR. F3 = 35g de AM + 10g de GA + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g de Tween 80 +15,75g de AGCC; F5 = 31g de AM + 14g de MD + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g Tween 80 + 6,75g de AGCC; F6 = 35g de AM + 10g de GA + 0,45g de Tween 80 + 6,75g de AGCC; F7 = 35g de AM + 10g de GA + 0,45g de Tween 80 + 15,75g de AGCC; F8 = 35g de AM + 10g de GA + 15,75g de AGCC.

Os espectros de FTIR mostraram diferenças sutis entre as amostras na região espectral de $2.800-3.000\text{ cm}^{-1}$. Estas diferenças estão relacionadas ao estiramento C-H, relacionado ao conteúdo de AGCC das micropartículas. Os menores picos foram observados para as amostras que apresentaram menor eficiência de encapsulação (F7 e F8). Também foram observadas diferenças na região espectral de $3000-3600\text{ cm}^{-1}$, atribuídas ao estiramento OH que frequentemente está relacionada à moléculas de H_2O ligadas às amostras. Quanto às bandas na região $1.200-1.000\text{ cm}^{-1}$, usualmente indicativos da presença de ligações C-O, estão provavelmente relacionados à presença dos polímeros utilizados como material de parede (GA, MD e AM) (PEREIRA, L. H. G. 2008; PRADO et al., 2013)

Na Figura 12 podem ser observados os resultados para as análises de microscopia de varredura eletrônica das micropartículas F3, F5 e F6. .

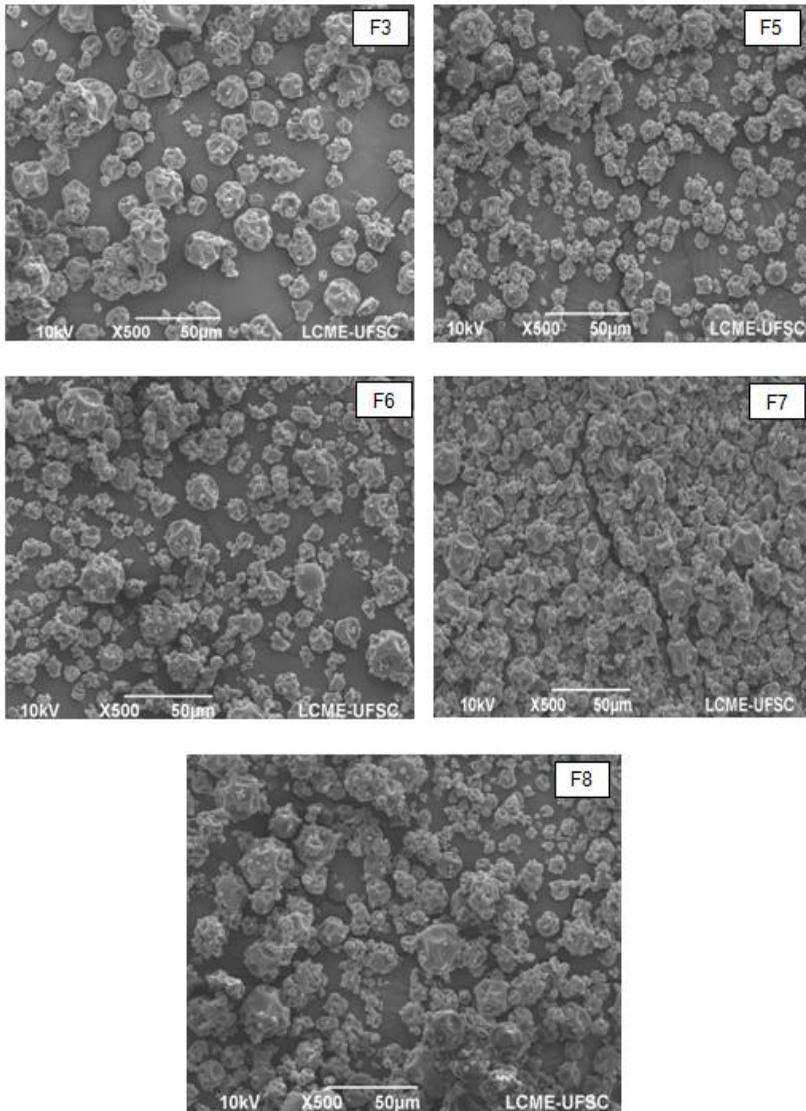


Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV). F3 = 35g de AM + 10g de GA + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g de Tween 80 + 15,75g de AGCC; F5 = 31g de AM + 14g de MD + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g Tween 80 + 6,75g de AGCC; F6 = 35g de AM + 10g de GA + 0,45g de Tween 80 + 6,75g de AGCC; F7 = 35g de AM + 10g de GA + 0,45g de Tween 80 + 15,75g de AGCC; F8 = 35g de AM + 10g de GA + 15,75g de AGCC.

De acordo com a análise morfológica observou-se que as micropartículas de AGCC apresentaram formato de esferas irregulares e tamanhos variados, apresentando superfície rugosa. A presença de agentes surfactantes pode ter contribuído para a obtenção de esferas uniformes e agregadas. Segundo Rosenberg, Talmon e Kopelaman (1990), essa característica é comum em processos de secagem heterogêneos e incompletos quando ocorre a concentração das partículas pela perda de umidade em função da rápida secagem e o resfriamento no secador. Conforme Thies (2001), a superfície rugosa é característica de materiais como polissacarídeos, que foram utilizados como material de parede.

Foi observada uma tendência à aglomeração maior nas micropartículas F6, com GA como material de parede, quando comparadas com as micropartículas F3 e F5. De acordo com Bhandari (1993) a presença de GA favorece a ocorrência de pequenas partículas posicionadas na superfície das partículas maiores. Resultado semelhante foi encontrado por Aburto et al (1998) em um estudo sobre a microencapsulação de óleo essencial de laranja utilizando amido modificado (capsul®), maltodextrina e goma arábica. Estes autores obtiveram micropartículas agregadas eletrostaticamente e atribuíram à presença dos polímeros utilizados como material de suporte. Segundo Ré (1998), as imperfeições superficiais (fissuras, rugosidade, colapsos) são formadas quando há um lento processo de formação de filme durante a secagem das gotículas atomizadas, associando a presença de depressões superficiais ao colapso sofrido pelas gotas durante os estágios iniciais da secagem. A superfície rugosa das partículas é uma característica indesejável já que afeta as condições de escoamento do material.

Em um estudo para obtenção de micropartículas de óleo de café utilizando como material suporte maltodextrina, goma arábica e proteínas do soro de leite, Frascareli (2010) obteve micropartículas com morfologia altamente rugosa e micropartículas agregadas e atribuiu esse efeito às propriedades da suspensão e método de homogeneização, sendo que suspensões homogeneizadas em Ultra-Turrax apresentaram piores resultados quando comparadas às homogeneizadas em alta pressão.

Os diâmetros médios das micropartículas nas amostras analisadas variaram de 6,63 μm (F5) a 9,48 μm (F3), e 7,65 μm (F6). Em geral, os tamanhos das micropartículas variaram de 2,0 μm a 30 μm em todas as amostras. Resultado semelhante foi reportado por Aburto, et al (1998) que obtiveram micropartículas de tamanhos variados (2 μm até

40 μm), com diâmetro médio de 20 μm e Prado (2013) que obteve micropartículas que variaram entre 3 e 50 μm utilizando os mesmos materiais de suporte do presente estudo, atribuindo esta características à estes materiais.

Na Figura 13 pode ser observada a distribuição dos tamanhos das micropartículas para as formulações estudadas. A formulação F5 apresentou distribuição das micropartículas com maior frequência na faixa de 2,45 μm a 10,63 μm , o que resultou no menor diâmetro médio discutido anteriormente. A formulação F3, com maior diâmetro médio apresentou micropartículas em maior frequência na faixa de 3,14 μm a 14,57 μm , enquanto a formulações F6, apresentou distribuição das micropartículas em maior frequência variando de \sim 3 μm a 15 μm . Carneiro (2011) avaliou a influência de diferentes materiais de suporte na microencapsulação de óleo de linhaça por Spray Dryer. Os resultados obtidos pelo autor reportaram uma distribuição das micropartículas na faixa de 0,2 μm a 270 μm , com maior frequência entre 3 μm e 100 μm , sendo que as formulações contendo GA e MD apresentaram micropartículas maiores do que as formulações contendo Capsul® e MD, resultado semelhante ao obtido para as micropartículas F3 e F5 no presente estudo.

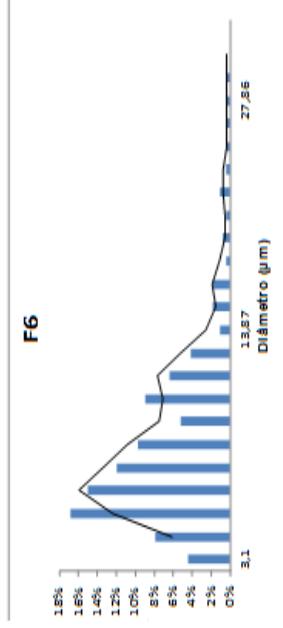
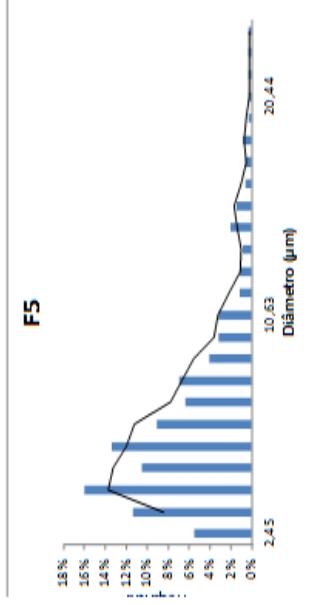
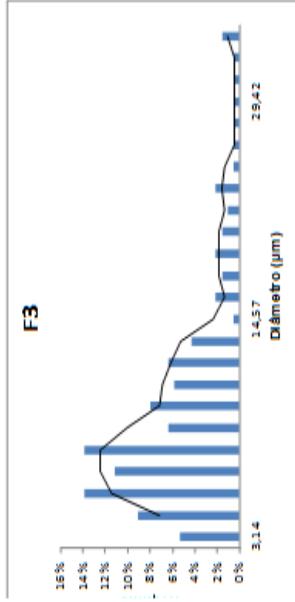


Figura 13 - Distribuição do tamanho das micropartículas. F3 = 35g de AM + 10g de GA + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g de Tween 80 + 15,75g de AGCC; F5 = 31g de AM + 14g de MD + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g Tween 80 + 6,75g de AGCC; F6 = 35g de AM + 10g de GA + 0,45g de Tween 80 + 6,75g de AGCC; F7 = 35g de AM + 10g de GA + 0,45g de Tween 80 + 15,75g de AGCC; F8 = 35g de AM + 10g de GA + 15,75g de AGCC.

A análise térmica através de DSC e TGA foi realizada somente para a amostra F3, que apresentou a melhor eficiência de encapsulação.

A análise de DSC (Figura 14) mostra uma temperatura *onset* de fusão de 137,17°C, com um consumo de energia de 74,13 J g⁻¹, característico do processo de fusão da substância. Em torno de 40°C, temos uma deflexão inicial nos valores de DSC, sendo proporcional a capacidade calorífica do material. Este resultado demonstra boa estabilidade das micropartículas em temperaturas de processamento até 100°C.

Müller (2011), avaliou o comportamento térmico de micropartículas carregadas com óleo essencial de laranja elaborada com amido modificado (octenilsuccinato) e maltodextrina. Em seu estudo, o autor observou um evento endotérmico mais significativo em 182°C. Esta temperatura superior pode estar relacionada com a diferença nas proporções dos materiais de suporte utilizados pelo autor, visto que foi utilizada uma proporção de material de suporte inferior ao do presente estudo (6,5% de óleo de laranja, 23% de maltodextrina, 6,5% de amido modificado e 64% de água) e, pode ser visualizada quando o autor avalia o comportamento térmico de micropartículas contendo apenas o material de suporte (sem óleo de laranja), obtendo um evento endotérmico de 121,9°C, onde ele afirma que a presença do óleo interferiu diretamente no comportamento térmico das micropartículas.

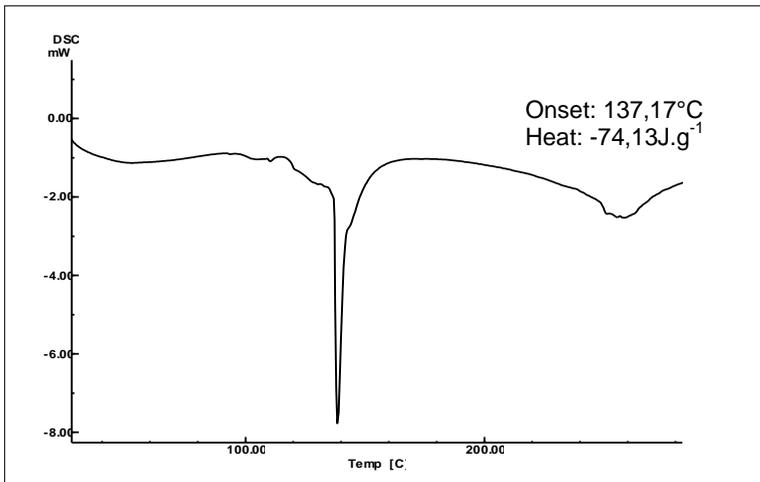


Figura 14 - Análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para a formulação F5 (31g de AM + 14g de MD + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g Tween 80 + 6,75g de AGCC).

A curva termogravimétrica pode ser observada na Figura 15. A temperatura de transição vítrea (T_g) observada foi de $51,22^\circ\text{C}$, sendo percebida pela mudança na linha de base. Fasina e Littlefield (2012) mencionam que este evento é característico para a perda de água. O resultado é vantajoso em se tratando de formulações para rações onde somente há processo de mistura dos ingredientes e não há processamento térmico. O segundo evento (entre 188° e 295°C), corresponde ao calor de fusão das micropartículas durante o processo de mudança de fase, demonstrando boa resistência em temperaturas abaixo deste valor. Observou-se perda de massa (Δm) de $54,92\%$, provavelmente devido à volatilização dos AGCC. A partir deste ponto, é possível observar a degradação do material no terceiro evento que ocorreu entre $304,79^\circ\text{C}$ e $413,87^\circ\text{C}$ com Δm de $54,92\%$. De acordo com Rodrigues et al (2005), esse evento é decorrente da decomposição dos materiais utilizados na formulação das micropartículas.

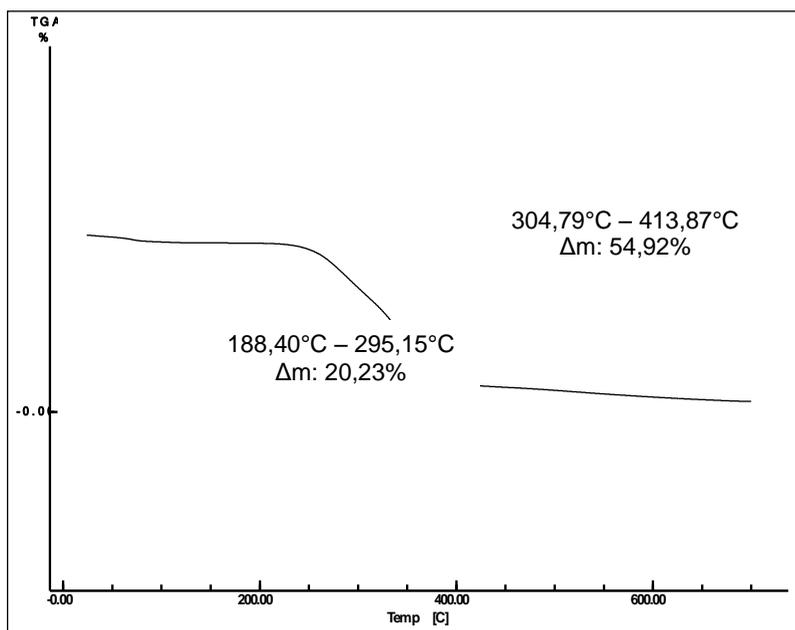


Figura 15 Análise Termogravimétrica (TGA) da formulação F3 (35g de AM + 10g de GA + 0,9g de L- α -Fosfatidilcolina + 0,45g Tween 80 + 6,75g de AGCC).

Quando produtos amorfos são aquecidos acima da temperatura de cristalização, passam a apresentar características excessivamente viscosas. Características referentes à viscosidade e ao conteúdo de umidade apresentam importante relação com as condições de operação e armazenamento na produção de micropartículas em pó. A viscosidade está diretamente relacionada com a temperatura de secagem das micropartículas obtidas em processo de atomização em *Spray Drying*, produzindo produtos amorfos (BHANDARI et al., 1993). Essas mudanças físicas estão relacionadas à temperatura de transição vítrea (T_g). A T_g é considerada como uma temperatura de referência, onde abaixo desta o produto é mais estável. A diferença entre a T_g e a temperatura de estocagem é a responsável pelo controle das taxas de mudanças físico-químicas e biológicas (SANTOS, 2013).

Em um estudo sobre microencapsulação de *Lactobacillus* em *Spray Drying* utilizando maltodextrina como material de suporte, Santos (2013), menciona que a sua utilização pode aumentar a T_g de microcápsulas. O autor observou T_g de 56°C , e decomposição das micropartículas a partir dos 160°C , resultados semelhantes ao do presente estudo.

Müller (2011), ao avaliar os parâmetros termogravimétricos das micropartículas de óleo essencial de laranja, observou a presença de três eventos distintos. O primeiro evento (Δt $30\text{-}100^\circ\text{C}$) com Δm de 10%, o segundo evento (Δt $208\text{-}435^\circ\text{C}$) com Δm de 75% e o terceiro evento (Δt $435\text{-}496^\circ\text{C}$) com Δm de 15%, resultados semelhantes ao do presente estudo. O autor atribui esses eventos à volatilização do óleo e à perda de massa dos materiais de suporte.

Na Tabela 5 podem ser observados os valores para as análises de CMI e CMB para os AGCC antes e após do processo de atomização por *Spray Drying*.

Tabela 5 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) para os AGCC antes e após o processo de encapsulação.^a

Bactéria	CMI*	CMB**	CMI*	CMB**
	(mg/mL)	(m g/mL)	(mg /mL)	(m g/mL)
	Antes ^b		Após ^c	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1,25 ^A ±0,01	2,5 ^a ±0,01	5,0 ^B 0,01	5,0 ^b 0,01
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	1,25 ^A ±0,01	1,25 ^a ±0,01	2,5 ^B 0,01	2,5 ^b 0,01
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,62 ^A ±0,01	1,25 ^a 0,01	1,25 ^B 0,01	1,25 ^a 0,01
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0,62 ^A ±0,01	1,25 ^a 0,01	1,25 ^B 0,01	1,25 ^a 0,01
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117	1,25 ^A ±0,01	1,25 ^a 0,01	1,25 ^A 0,01	1,25 ^a 0,01
<i>Listeria monocytogenes</i> sorotipo 2 ATCC 19112	1,25 ^A ±0,01	1,25 ^a 0,01	1,25 ^A 0,01	1,25 ^a 0,01

^a Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores modais são apresentados. ^b CMI e CMB do AGCC antes do processo de secagem no Spray Drying. ^c CMI e CMB do AGCC após o processo de secagem no Spray Drying. *CMI: concentração mínima inibitória; **CMB: concentração mínima bactericida; letras maiúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferenças significativas para CMI; letras minúsculas na mesma linha não apresentam diferenças mínimas significativas para CMB; (Teste de Tukey, p<0,05).

Os AGCC apresentaram atividade bactericida para todas as culturas testadas. A CMI mais efetiva foi para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). A CMB foi de 1,25 mg/mL para todas as culturas com exceção da *Escherichia coli* (ATCC 25922). A CMI e CMB dos AGCC após a microencapsulação por Spray Drying foi observada uma diminuição na atividade antimicrobiana (aumento da CMI e da CMB) para *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), e um aumento na CMI para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 e ATCC 29213).

Tal comportamento indica que o processo térmico diminuiu a atividade antimicrobiana dos AGCC.

Hinton (2011), em um estudo para avaliar a atividade bactericida de AGCC contra bactérias associadas ao processamento de aves, concluiu que misturas de AGCC apresentaram atividade antimicrobiana para oito bactérias (*Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *A. calcoaceticus*, *L. monocytogenes*, *S. simulans*, *P. fluorescens*, *E. faecalis*, *C. jejuni*). Entre as bactérias Gram negativas, os AGCC apresentaram maior atividade contra *Campylobacter jejuni*. *Salmonella typhimurium* apresentou maior resistência aos ácidos graxos de cadeia curta cáprico e caprílico enquanto *E. coli* apresentou maior resistência ao ácido láurico. O autor ainda afirma que a parede celular composta por várias camadas de peptidoglicano das bactérias Gram positivas pode ajudá-los a ter resistência contra a atividade antibacteriana de alguns ácidos graxos e que em geral, os ácidos graxos de cadeia curta tiveram maior efeito inibidor sobre as bactérias Gram negativas, que apresentam parede celular composta por lipoproteínas, polissacarídeos e fosfolipídeos.

4 CONCLUSÕES

As micropartículas obtidas por Spray Drying apresentaram diferenças significativas entre as formulações testadas, sendo que as formulações compostas por diferentes concentrações de amido modificado, maltodextrina e goma arábica contendo surfactantes apresentaram os melhores valores de rendimento, independentemente do material de parede utilizado. A presença dos agentes surfactantes nessas formulações L- α -fosfatidilcolina (0,9g) e Tween (0,45g) favoreceu a formação de uma suspensão mais estável, melhorando a solubilização dos componentes das fórmulas e refletindo diretamente em um processo de atomização mais eficiente, com valores inferiores para umidade e densidade devido ao maior teor de AGCC no interior.

Foram obtidos espectros de FITR semelhantes e com formação de micropartículas com diâmetros médios que variaram entre 6,63 μm (F5) a 9,48 μm (F3) e irregulares que apresentaram boa estabilidade térmica.

As análises de CMI e CMB demonstraram atividade antimicrobiana dos AGCC para todas as bactérias testadas, antes e após o processo de atomização, embora o mesmo tenha contribuído para a elevação dos valores para as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis* e *Staphylococcus aureus*.

Os resultados obtidos indicaram que as micropartículas de AGCC obtidas por Spray Drying apresentaram atividade antimicrobiana e estudos mais aprofundados sobre atividade antimicrobiana e cinética de liberação *in vivo*, bem como a otimização do processo de obtenção das micropartículas são necessários para que os mesmos sejam considerados como uma alternativa aos antibióticos sintéticos.

5 REFERENCIAS

ABURTO, L. C.; TAVARES, D. Q.; MARTUCCI, E. T.; Microencapsulação de óleo essencial de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 18, no. 1, p. 1-7, 1998.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the AOAC. 18th. Ed. AOAC, Arlington, VA, 2005.

BAE, E. K.; LEE, S. J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. **Journal of Microencapsulation**, p. 1-12, 2008.

BHANDARI, B.R.; DUMOULIN, E.D.; RICHARD, H.M.J.; NOLEAU, I. & LEBERT, A.M. Flavor encapsulation by spray Drying: application to citral and linalyl acetate. **Journal of Food Science**, 57(1), p.217-221, 1993.

CARNEIRO, H. C. F., Microencapsulação de óleo de linhaça por *spray Drying*: Influência da utilização de diferentes combinações de materiais de parede. 2011. p. 91. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

CELIK TAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* , depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, p. 553-559, 2007.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Eighth Edition**. CLSI document M7-A8 [ISBN 1-56238-689-1]. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087 USA, 2009.

CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN (NRC, EUA). Crean resistencia los antibióticos? **Industria Avícola**, v.46, n.3, p. 42 - 46, Marzo, 1999.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O.; **QUÍMICA DE ALIMENTOS**. Artemed, 2010, 4^a ed. São Paulo, p. 131.

DIERICK, N. A., MOLLY, D. K., BEEK, E. V., VANDERBEKE, E. The combined use of triacylglycerols (TAGs) containing medium fatty acids and exogenous lipolytic enzymes as an alternative to nutritional

antibiotics in piglet nutrition. **Livestock Production Science**, v. 76, p. 1-16, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FASINA, O; LITTLEFIELD, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 510 – 523, 2010.

FRASCARELI, E. C. **Microencapsulação de óleo de café através de secagem por atomização: avaliação das propriedades da emulsão e do tipo de material de parede sobre as características do pó**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

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. 1107-1121, 2007.

GIBBS, F. et al. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, vol. 50, p. 213-234, 1999.

HINTON, A. Jr.; Atividade bactericida dos sais alcalinos de ácidos graxos contra bactérias associadas ao processamento de aves. **XXII Latin American Poultry Congress**. United States Department of Agriculture, USA. 2011.

HORWITZ, C.; KRUT, L.; KAMINSKY, L.S. The emulsifying properties of egg yolk phosphatidylcholine. **Lipids**, v. 7, n. 4, p. 234 – 239, 1971.

KABARA, J. **Fats Are Good For You And Other Secrets**. North Atlantic Books, 2008, p. 16.

KENYON, M.M. & ANDERSON, R.J. Maltodextrins and low-dextrose-equivalence with syrup solids. In: Flavor encapsulation (RISCH & REINECCIUS), 7-11, ACS Symposium series no 370, **American Chemical Society**, 1988.

MÜLLER, P. S., **Microencapsulação de Óleo essencial de laranja**. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, 2011.

PEREIRA, L. H. G., **Obtenção e estudo das propriedades físico-químicas de amidos de mandioca (*Manihot esculenta*) oxidados e ácido-modificados**. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2008.

PRADO, A. C. P.; MANION, B. A.; SEETHANRAMAN, K.; DESCHAMPAS, F. C.; BARRERA ARELLANO, D.; BLOCK, J. M.

- Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 64-73, 2013.
- RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, F. M.; SILVA, M. A. S.; MATOS, J. R. Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização, Determinação da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farm. Bonaerense**, v 24, p. 383 – 391, 2005.
- RAMOS, L. de S. N. **Aditivos alternativos a antibióticos em rações para frango de corte**. Tese (Doutorado e Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2009.
- RÉ, M. I. Microencapsulation by *spray Drying*. **Drying Technology**. v. 16, n. 6, p. 1195-1236, 1998.
- REINECCIUS), 7-11, ACS Symposium series no 370, **American Chemical Society**, 1988.
- ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 5, p. 1288-1294. 1990.
- ROSSI, R. PASTORELLI, S. C. CORINO, C. Recent advances in the use of fatty acids as supplements in pig diets. **Animal Feed Science and technology**, v. 162, p. 1-11, 2010.
- SANTOS, R. C. S., **Microencapsulação de Lactobacillus casei por spray drying**. Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pernambuco, 2013.
- SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. Critical Review in **Food Science and Nutrition**, v.33, p. 501–547, 1993.
- SMÂNIA JR., A. et al. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 177–181, 1995.
- THIES, C. Microencapsulation: what it is and purpose. In: VILSTRUP, P. **Microencapsulation of Food Ingredients**. Surrey: Leatherhead Publishing, 2001, p. 1-30.