

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

TERESA CRISTINA ABRANCHES ROSA

**DESENVOLVIMENTO DE MICROCÁPSULAS CONTENDO ÁCIDOS GRAXOS
POLI-INSATURADOS ÔMEGA 3 PARA ADIÇÃO EM LEITE HUMANO
DESTINADO A RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO**

Campo Grande, MS
2023

TERESA CRISTINA ABRANCHES ROSA

**DESENVOLVIMENTO DE MICROCÁPSULAS CONTENDO ÁCIDOS GRAXOS
POLI-INSATURADOS ÔMEGA 3 PARA ADIÇÃO EM LEITE HUMANO
DESTINADO A RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de pesquisa: Atenção à saúde integral da criança do adolescente e da gestante

Orientador: Prof. Dr. Durval Batista Palhares
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Karla Rejane de Andrade Porto

Campo Grande, MS
2023

TERESA CRISTINA ABRANCHES ROSA

**DESENVOLVIMENTO DE MICROCÁPSULAS CONTENDO ÁCIDOS GRAXOS
POLI-INSATURADOS ÔMEGA 3 PARA ADIÇÃO EM LEITE HUMANO
DESTINADO A RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de pesquisa: Atenção à saúde integral da criança do adolescente e da gestante

Orientador: Prof. Dr. Durval Batista Palhares
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Karla Rejane de Andrade Porto

Banca examinadora:

Nota/conceito:

Dr. Durval Batista Palhares (orientador) – UFMS

Dr.^a Daniele de Almeida Soares Marangoni (membro) – UFMS

Dr.^a Leila Simone Foerster Merey (membro) – UFMS

Dr.^a Débora Marchetti Chaves Thomaz (membro) – UFMS

Dr.^a Ângela Alves Nunes (membro) – Unigran Capital

Dr. Gustavo Christofolletti (suplente) – UFMS

Dr. Tiago Tognolli de Almeida (suplente) – UCDB

AVALIAÇÃO FINAL:

() Aprovada

() Reprovada

Dedico esse trabalho aos meus pais, José e Maria, ao meu esposo Fabrício e aos meus filhos Pedro, Vicente e Elisa.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Durval Batista Palhares pela orientação e à professora Dr.^a Karla Rejane de Andrade Porto pela coorientação, pelos ensinamentos, pelo incentivo e pela confiança depositada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste e à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo espaço e estrutura para o desenvolvimento do trabalho e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Aos professores que, com zelo, ministraram as disciplinas cursadas, permitindo aprendizado, crescimento e a abertura de horizontes e possibilidades.

Aos professores e técnicos responsáveis pelos laboratórios parceiros envolvidos no desenvolvimento do trabalho, a saber, Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação – LDTI, Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas – LPPFB e Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

À direção e coordenação administrativa da FACFAN pelo apoio para a capacitação e qualificação.

Aos meus pais e ao meu esposo pela compreensão, apoio e suporte, pelos cuidados com o Pedro e, em especial, com o Vicente e a Elisa que nasceram durante o andamento do presente trabalho.

Que seu alimento seja seu remédio, que
seu remédio seja o seu alimento.”

(Hipócrates)

RESUMO

Recém-nascidos pré-termo perdem a transferência placentária de nutrientes que criariam reservas no último trimestre de gestação, como é o caso dos ácidos graxos ômega 3 e eles precisam ser fornecidos via alimentação. Entretanto, o processamento do leite humano e a técnica da nutrição enteral estão relacionados a perdas do conteúdo total de lipídios. O objetivo do trabalho foi desenvolver e testar microcápsulas contendo ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 para adição em leite humano destinado à alimentação de recém-nascidos pré-termo. Realizou-se um estudo experimental para desenvolver e testar microcápsulas contendo ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 a partir de óleo de peixe, lecitina de soja, amido de milho e maltodextrina. Foram desenvolvidas emulsões mono e multicamada, posteriormente submetidas à secagem por liofilização para produção de pós contendo as microcápsulas de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3. Avaliou-se o pH, a formação das microcápsulas em microscópio óptico e a ocorrência da separação de fases pelo índice de creme. A concentração de amido a 1% parece ocasionar menor variação do tamanho das microcápsulas. O pH se manteve entre 3,02 a 3,3, independente da concentração de amido. A homogeneização a 18.000 rpm/ 10 min garantiu a mistura uniforme consistente. Nas condições simuladas de nutrição enteral, o pó contendo microcápsulas parece melhorar a solubilidade do óleo de peixe. Os resultados preliminares são promissores. Testes adicionais poderão ser feitos para quantificação do óleo de peixe e análise de seu perfil de ácidos graxos. O experimento se mostrou viável e exequível como uma alternativa de adição de lipídios ao leite humano, em especial de ácidos graxos essenciais da série ômega 3. A tecnologia das microcápsulas poderá favorecer a oferta e a biodisponibilidade desses lipídios aos recém-nascidos prematuros de baixo peso, garantindo seu acesso ao leite humano fortificado de modo a promover melhores taxas de crescimento e desenvolvimento.

Descritores: Recém-Nascido de Baixo Peso; Recém-Nascido de Muito Baixo Peso; Nutrição da Criança; Aditivos Alimentares; Leite Humano; Microcápsulas.

ABSTRACT

Preterm newborns lose placental transfer of nutrients that would create reserves in the last trimester of gestation, such as omega-3 fatty acids, and these need to be supplied via the diet. However, the processing of human milk and the technique of enteral nutrition are related to losses of total lipid content. The objective of this study was to develop and test microcapsules containing omega-3 polyunsaturated fatty acids for addition to human milk intended for feeding preterm newborns. An experimental study was conducted to develop and test microcapsules containing omega-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil, soy lecithin, corn starch and maltodextrin. Monolayer and multilayer emulsions were developed and then subjected to freeze-drying to produce powders containing the microcapsules of omega-3 polyunsaturated fatty acids. The pH, the formation of the microcapsules under an optical microscope, and the occurrence of phase separation by the cream index were evaluated. The 1% starch concentration seems to cause less variation in microcapsule size. The pH remained between 3.02 and 3.3, regardless of the starch concentration. Homogenization at 18,000 rpm/10 min ensured consistent uniform mixing. Under simulated enteral nutrition conditions, the powder containing microcapsules appears to improve the solubility of fish oil. The preliminary results are promising. Further testing could be done to quantify the fish oil and analyze its fatty acid profile. The experiment has been shown to be viable and feasible as an alternative addition of lipids to human milk, especially of essential omega-3 fatty acids. The microcapsule technology may favor the supply and bioavailability of these lipids to premature low birth weight infants, ensuring their access to fortified human milk in order to promote better growth and development rates.

Descriptors: Infant, Low Birth Weight; Infant, Very Low Birth Weight; Child Nutrition; Food Additives; Milk, Human; Capsules

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade no sistema de emulsão	30
Figura 2	Diferentes tipos de microcápsulas	33
Figura 3	Emulsão monocamada	40
Figura 4	Representação esquemática das emulsões multicamada	40
Figura 5	Representação esquemática das emulsões de alimentação .	41
Figura 6	Imagens obtidas em microscópio óptico em objetiva de imersão em óleo $\times 100$ de emulsões com diferentes concentrações de amido (0,5% e 1,0%).....	46
Figura 7	<i>Boxplot</i> relacionado a área média das partículas nas concentrações a 0,5 e 1,0 % de amido.....	47
Figura 8	Evolução do pH avaliado em triplicata nos dias 1 e 15 nas emulsões com diferentes concentrações de amido (T1=0,5% e T2=1,0%) armazenadas à temperatura ambiente	48
Figura 9	Avaliação da separação de fases e índice de cremeação para estudo da estabilidade das emulsões em diferentes concentrações de amido.....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Conversão dos ácidos graxos essenciais, ácido linoleico (18: 2 ω -6) e do ácido linolênico (18:3 ω -3) nos outros ácidos graxos das respectivas famílias.....	24
Quadro 2	Métodos para Microencapsulação.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Recomendação de macronutrientes para recém-nascidos pré-termo	20
Tabela 2	Principais recomendações de ingestão de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 de autoridades internacionais.....	27
Tabela 3	Informação nutricional das cápsulas gelatinosas contendo óleo de peixe, segundo informações do fabricante.....	39
Tabela 4	Controle do volume de leite humano puro, acrescido de óleo de peixe e óleo de peixe microencapsulado em simulação de sistema de nutrição enteral	51
Tabela 5	Comparação entre os volumes médios após simulação em sistema de nutrição enteral.....	51
Tabela 6	Avaliação do tempo médio de descida de leite humano puro, acrescido de óleo de peixe e óleo de peixe microencapsulado em simulação de sistema de nutrição enteral sem controle de gotejamento	51
Tabela 7	Exemplos de análises e técnicas aplicadas no processo de microencapsulação de óleos conforme literatura científica.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	Ácidos graxos essenciais
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AGPI-CL	Ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa
ALA	Ácido alfa-linolênico
ANSES	<i>Agence nationale de sécurité sanitaire</i> (FR)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARA	Ácido araquidônico
BLH	Banco de Leite Humano
BPN	Baixo peso ao nascer
CG	Cromatografia Gasosa
DPB	Displasia broncopulmonar
DHA	Ácido docosaexaenoico
DRIs	Ingestões dietéticas de referência
EA	Emulsões de Alimentação
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EP	Emulsão Primária
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (EUA)
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
IC	Índice de creme
IMO	<i>Institute of Medicine</i> (EUA)
LA	Ácido linoleico
LDTI	Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (UFMS)
LH	Leite humano
LPPFB	Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (UFMS)
MO	Monocamada

MU	Multicamda
NEC	Enterocolite Necrosante
NHMRC	<i>National Health and Medical Research Council</i> (AU e NZ)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDA	Persistência do canal arterial
RCEU	Retardo de crescimento extra-uterino
RNMBP	Recém-nascido de muito baixo peso
ROP	Retinopatia da prematuridade
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UL	Ingestão máxima tolerável
UTIN	Unidade de terapia intensiva neonatal
UV	Ultravioleta
WMI	Lesão da substância branca

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Leite humano na alimentação de recém-nascidos pré-termo	19
2.2 Ácidos Graxos Essenciais (AGEs)	24
2.3 Emulsões	27
2.4 Microcápsulas	31
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 METODOLOGIA	39
4.1 Tipo de pesquisa	39
4.2 Material e Métodos	39
4.2.1 Estudo Piloto.....	39
4.2.2 Experimento.....	41
4.3 Caracterização das emulsões lipídicas e análise estatística.....	43
4.4 Aspectos Éticos	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
APÊNDICE 1 – Exemplos de análises e técnicas aplicadas no processo de microencapsulação de óleos conforme literatura científica.....	64
APÊNDICE 2 – Fluxograma: Tratamento das Imagens obtidas na Microscópicas óptica utilizando o Image J ®	69
APÊNDICE 3 - Estabilidade de emulsões lipídicas ricas em ômega-3 para preparo de microcápsulas para aditivo de leite humano para recém-nascidos prematuros	72

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços no suporte nutricional ao longo dos últimos 20 anos e do foco atual na “nutrição precoce intensa” nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), a desnutrição e a restrição de crescimento extrauterino (RCEU) ainda são problemas importantes para recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso (RNMBP). Crianças nascidas prematuramente, isto é, com 37 semanas ou menos, perdem a transferência placentária de nutrientes que criariam reservas para uso no período pós-natal. É o caso dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), cuja necessidade é suprida através da placenta durante o último trimestre de gestação (ARSLANOGLU et al., 2019).

Os AGPI atuam em diversos processos fisiológicos e metabólicos e são importantes na nutrição infantil. Estão relacionados à nutrição e ao crescimento e são críticos nos processos celulares que contribuem para a angiogênese, organogênese, resposta imune e regulação da inflamação. Estruturalmente, eles se incorporam às membranas celulares e participam de atividades reguladoras em todos os níveis de tecido – cérebro, olhos, pulmões, intestino, ossos e outros. Esses ácidos graxos são altamente concentrados na retina e na substância cinzenta neuronal apresentando papel importante no neurodesenvolvimento, no funcionamento cognitivo e na acuidade visual (SANTORO; MARTIN, 2022).

Os ácidos graxos araquidônico (ARA) e docosahexaenoico (DHA) são os principais componentes da membrana fosfolipídica das células e são os AGPI predominantes no sistema nervoso central. O DHA é o ácido graxo mais abundante na membrana fotorreceptora da retina. Por isso, é crítico que a incorporação de ácidos graxos ômega 3 (ω -3) e ômega 6 (ω -6) ocorra durante a embriogênese e nos estágios de desenvolvimento pós-natais. Em humanos, esse processo ocorre durante o último trimestre de gestação e segue nos primeiros 6 a 10 meses após o nascimento. Os bebês nascidos prematuramente perdem esse período de acúmulo máximo de ARA e DHA a partir de fontes maternas durante o último trimestre de gravidez e, apesar da síntese endógena ser maior em prematuros do que em nascidos a termo, a quantidade de DHA é insuficiente para corresponder à taxa de acumulação do período intraútero. Por isso, os ácidos graxos essenciais devem ser fornecidos através da dieta (KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017; WENDEL et al., 2021).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que esses lactentes pré-termo com baixo peso ao nascer (BPN) (<2500g), incluindo aqueles recém-nascidos de muito baixo peso (RNMBP) (<1500g), sejam alimentados preferencialmente com leite materno. Aqueles que não puderem ser alimentados com o leite da própria mãe deverão ser alimentados com leite humano proveniente de bancos de leite (WHO, 2017; DUTTA et al., 2015; HAIR et al., 2020).

No entanto, recém-nascidos prematuros geralmente não apresentam as habilidades de sucção necessárias. Assim, aqueles menores de 34 semanas de idade gestacional corrigida podem receber toda a alimentação láctea por meio de uma sonda para nutrição enteral até que suas habilidades de sucção amadureçam (GEDDES et al., 2021).

Contudo, a técnica da nutrição enteral está relacionada com a diminuição do conteúdo final de lipídeos devido a interação química e adesão ao equipo e a sonda de alimentação (RAYYAN; ROMMEL; ALLEGAERT, 2015). Embora não esteja bem estabelecida a exata perda de gordura dos leites pelos equipos rotineiramente utilizados em unidades neonatais, observa-se que os processos utilizados nos bancos de leite humano (BLH) contribuem para quebra da estabilidade da micela de gordura e consequente coalescência e maior aderência às paredes do sistema plástico de nutrição enteral (MULLER, 2017).

Assim, embora o leite humano aja como “um medicamento terapêutico preventivo”, não fornece quantidades suficientes de muitos nutrientes para recém-nascidos pré-termo quando alimentados nos volumes habituais. A otimização da assistência nutricional ao prematuro tem um papel fundamental na melhora dos resultados de crescimento e neurodesenvolvimento e deve ser uma prioridade (ARSLANOGLU et al., 2019).

Devido às necessidades nutricionais aumentadas desses recém-nascidos, a fortificação do leite humano é frequentemente necessária. Sabe-se que a oferta enteral recomendada de energia é de 110 a 135 kcal/kg/dia, porém, a composição do leite humano é variável, e por vezes apresenta quantidades insuficientes de macronutrientes. Para que os objetivos nutricionais sejam então alcançados, faz-se necessário a modificação do conteúdo do leite humano com o uso de suplementos e fortificantes. A Academia Americana de Pediatria (AAP) recomenda a fortificação de rotina do leite materno como padrão de cuidado em lactentes com peso de nascimento inferior a 1.500 g (PREMKUMAR et al., 2020).

Visando garantir melhor aporte nutricional é comum o uso de aditivos do leite humano e embora o suplemento comercial FM85[®] seja o principal produto usado na maioria dos serviços de neonatologia no Brasil, sua composição aponta muito baixas concentrações de gorduras, sem relação com os AGPI em questão (IRANPOUR et al., 2013).

No tocante à fortificação do leite humano, muitos estudos são voltados à suplementação proteica e existe uma lacuna quanto à suplementação de lipídios. Parte dos estudos se concentrou na fortificação multinutriente ou na adição de proteínas (proteína animal – intacta e/ou hidrolisada; suplementos homólogos). Ainda são necessários estudos sobre a suplementação de gorduras ao leite humano e os estudos existentes não são robustos o suficiente para embasar uma recomendação (SANTORO; MARTIN, 2022).

Premkumar et al. (2020) discutem que a fortificação com gorduras em combinação com a fortificação de multinutrientes pode ser útil para aumentar ainda mais o conteúdo energético. Entretanto, a importância dos lipídios vai além da oferta de energia e a capacidade de atender essa demanda é dificultada pela falta de emulsões lipídicas parenterais específicas para as necessidades exclusivas do bebê prematuro e um atraso na alimentação enteral pode ser observado (SANTORO; MARTIN, 2022).

O presente grupo de pesquisa vem trabalhando no desenvolvimento de suplementos homólogos (THOMAZ et al., 2012; GRANCE et al., 2015) e adição de ácidos graxos ômega 3 (MULLER, 2017) para formulação de um suplemento destinado a recém-nascidos pré-termo, com ênfase àqueles em cuidados intensivos em hospitais públicos brasileiros.

Uma dieta à base de leite humano está associada à diminuição da morbidade e mortalidade quando comparada a lactentes que recebem fortificantes à base de leite bovino e fórmula (HAIR et al., 2020). Contudo, a adição de lipídeos diretamente ao leite humano ocasionou perdas desses constituintes no sistema de alimentação (MULLER, 2017). Portanto, o desafio consiste em propor uma alternativa de adição de lipídeos com ênfase nos ácidos graxos ômega 3 de modo a reduzir as perdas no sistema de nutrição enteral, diminuir a oxidação lipídica e melhorar a biodisponibilidade.

Embora a lactoengenharia do leite humano tenha avançado, ainda é latente a necessidade de uma alternativa econômica de suplementos para que recém-nascidos

prematturos em ambientes com recursos limitados também possam se beneficiar dos avanços na ciência (PREMKUMAR et al., 2020).

Diante do exposto, o desafio agora é buscar técnicas que permitam garantir uma eficaz suplementação de AGPI para estes lactentes com déficit de peso, em especial aos componentes da série ômega-3 devido a sua importância no desenvolvimento neurológico e integridade celular. Neste sentido, surge como alternativa os processos de encapsulação de lipídeos visando melhorar sua solubilidade, a estabilidade em solução e a biodisponibilidade.

A tecnologia de microencapsulação vem sendo utilizada na indústria farmacêutica, cosmética, biotecnológica, alimentícia, agrícola, de pesticidas, têxtil e em aplicações de pesquisa (BAKRY et al., 2016; CORRÊA-FILHO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019; SHARMA; BORAH, 2021). Há relatos da sua utilização para proteção de óleo de peixe, ingrediente para produtos alimentícios, durante armazenamento (JIMÉNEZ-MARTÍN et al., 2015), na formulação de fontes de lipídios de alta qualidade em fórmulas infantis (LI et al., 2018) e como carreadores de compostos funcionais para produtos alimentícios (CORRÊA-FILHO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019), contudo, até o presente momento, não se tem notícias do seu emprego voltado à otimizar a oferta de leite humano adicionado de lipídios, com ênfase aos AGPI ômega 3 para recém-nascidos pré-termo em UTI neonatal.

A microencapsulação é um processo no qual partículas ou gotas de um líquido são envolvidas por uma membrana polimérica para formar uma cápsula que isola o material revestido do meio exterior. O material de parede confere proteção física e evita reações químicas, mantendo as propriedades físico-químicas, biológicas e funcionais do ativo revestido (CALVO et al., 2011).

A microencapsulação de óleos ricos em AGPI ômega-3 apresenta-se como uma alternativa para aumentar sua estabilidade físico-química, principalmente evitar reações de oxidação (ANNAMALAI et al., 2015), bem como facilitar sua incorporação em diversos tipos de preparações alimentares e, ainda, com potencial para melhorar a biodisponibilidade (MALATAINS et al., 2011). Deste modo, surge a proposta de microencapsulação de ácidos graxos ômega-3 visando melhorar a estabilidade, biodisponibilidade, assim como diminuir a perda de lipídeos pelos tubos de alimentação, visando melhorar a oferta, garantindo crescimento e desenvolvimento satisfatórios dos recém-nascidos prematturos com déficit de peso.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leite humano na alimentação de recém-nascidos pré-termo

O leite humano é um biofluido cuja composição varia com o estágio de lactação, com o ritmo circadiano, com base no tempo desde a última mamada, durante a amamentação (aumento do teor de gordura ao final da mamada), com aspectos relacionados à mãe como idade, dieta, etnia, ganho de peso durante a gravidez e com o peso ao nascer do bebê (GARWOLIŃSKA et al., 2018).

A composição do leite materno muda em resposta às características do lactente e de acordo com sua idade refletindo com precisão as necessidades do bebê. Diferentes componentes nutricionais e não nutricionais fazem parte da composição do leite materno e no âmbito dos componentes nutricionais dá-se ênfase aos macro e micronutrientes. Em relação aos componentes não nutricionais enfatiza-se a presença de hormônios, fatores bioativos, fatores imunológicos e bifidobactérias (ANDREAS; KAMPMANN; LE-DOARE, 2015; ZIMMERMANN; CURTIS, 2020).

Normalmente, o leite maduro apresenta uma osmolaridade de cerca de 286 mOsm/L e 124 g/L de componentes sólidos como macronutrientes. Estima-se que o fornecimento energético fique entre 65 e 70 kcal por 100 mL, onde 50% do suprimento total de calorias é proveniente da gordura e 40% de carboidratos (KIM; YI, 2020).

Os lipídios correspondem ao segundo macronutriente mais importante do leite humano (BOQUIEN, 2018). Representam a maior fonte de energia do leite materno, contribuindo com 40% a 55% da energia total presente no alimento. Esses lipídios estão presentes como uma emulsão onde esses componentes são empacotados em glóbulos lipídicos de gordura do leite, com os fosfolipídios formando a maior parte da membrana dos glóbulos que geralmente variam de 1 a 10 μm de diâmetro. A grande maioria dos lipídios secretados são triacilglicerídeos, contribuindo para 98% da fração lipídica (ANDREAS; KAMPMANN; LE-DOARE, 2015).

O leite também contém enzimas, incluindo a lipase estimulada por sais biliares, que permite melhor digestibilidade de lipídios e melhor utilização de triglicerídeos (BOQUIEN, 2018). Além disso, a fração lipídica do leite humano fornece nutrientes essenciais como ácidos graxos poli-insaturados, moléculas bioativas e vitaminas lipossolúveis (GARWOLIŃSKA et al., 2018).

Os principais exemplos de ácidos graxos poli-insaturados presentes no leite humano são o ácido linoleico (LA) e ácido α -linolênico (ALA) que são os precursores

de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPICL) da série ômega 6 e ômega 3, $\omega 6$ e $\omega 3$, respectivamente. Esses precursores não são sintetizados *in vivo*, e o leite materno é a única fonte de ingestão para a criança amamentada. Esses AGPI são essenciais para o desenvolvimento do cérebro, com ênfase para o DHA. Como o crescimento do cérebro continua durante as primeiras semanas de vida da criança, especialmente para o prematuro, essa ingestão de ALA e DHA é essencial (BOQUIEN, 2018).

Diante dessa variação na composição do leite humano, é importante salientar que as necessidades nutricionais dos prematuros precisam ser estabelecidas individualmente. A tabela 1 apresenta uma estimativa das necessidades de macronutrientes de prematuros.

Tabela 1 – Recomendação de macronutrientes para recém-nascidos pré-termo.

Nutriente	Quantidade
Proteínas (g/kg/dia)	3,5 – 4,5
Carboidratos (g/kg/dia)	11,6 – 13,2
Lipídios (g/kg/dia)	4,8 – 6,6
Ácido linoleico (mg/kg/dia)	385 – 1.540
Ácido α -linolênico (mg/kg/dia)	> 55
Ácido araquidônico (mg/kg/dia)	18 – 45
Ácido docosaenoico (mg/kg/dia)	18 – 60

Fonte: Autoria própria. Adaptado de Feferbaum; Falcão; Zamberlan (2017) e Arslanoglu et al. (2019). Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN) (2010).

As recomendações precisam ser estabelecidas com base na idade gestacional, peso ao nascer, tempo de vida, via de alimentação e possíveis intercorrências clínicas (AMÂNCIO; FISBERG; MARCHIONI, 2013). Sabe-se que prematuros perdem a transferência placentária de nutrientes que criariam reservas para uso no período pós-natal, o que é o caso dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3. Embora a síntese endógena desses nutrientes seja maior em prematuros, a quantidade de DHA ainda é inferior à taxa de acumulação que ocorreria intraútero no último trimestre de gestação. Deste modo, esses ácidos graxos precisam ser fornecidos através da alimentação (ARSLANOGLU et al., 2019; KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017; WENDEL et al., 2021).

Ao se planejar a alimentação de prematuros, os profissionais de saúde precisam melhorar a entrega de nutrientes dentro de um volume limitado de LH

(materno ou ordenhado). Para isso podem ser utilizados fortificantes oriundos do leite humano ou provenientes do leite de vaca (GATES et al., 2020).

Fortificantes são definidos como produtos contendo energia, proteínas, eletrólitos, minerais, oligoelementos e vitaminas (de forma isolada ou combinada – fortificante multicomponente), utilizados para fortificar o leite humano para bebês prematuros. A fortificação é definida como a adição de fortificantes de nutrientes ao leite humano de doadoras. Os tipos de fortificantes incluem: pós concentrados de proteína bovina; concentrados líquidos; concentrados à base de leite humano (FANG et al., 2021).

No Brasil, a RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define aditivos em leite humano ordenhado como toda e qualquer substância adicionada de modo intencional ou acidental (BRASIL, 2006).

Existem alguns suplementos e fortificantes à base de leite humano em alguns mercados, de acordo com a legislação de cada país. No entanto, a sua disponibilidade não é universal, e seu alto custo deve ser ponderado em relação à sua eficácia. Portanto, fortificantes à base de leite bovino ou nenhuma fortificação continuam sendo práticas comuns em todo o mundo (TAYLOR, 2019).

O objetivo da fortificação é aumentar a concentração de nutrientes para os níveis que, nos volumes de alimentação recomendados (135-200 ml/kg/d), propiciem quantidades de todos os nutrientes que atendam às necessidades dos prematuros. A maioria dos fortificantes multinutrientes contém proteína do leite bovino. Também estão disponíveis os suplementos de um único nutriente contendo apenas proteínas, lipídios ou carboidratos. Eles são úteis ao individualizar a fortificação. Normalmente, os suplementos de carboidratos são compostos de maltodextrina e os de lipídios são compostos de triglicerídeos de cadeia média (ARSLANOGLU et al., 2019).

No exterior, nos últimos 18 anos, algumas empresas com fins lucrativos foram criadas para coletar e comprar, fabricar e vender produtos à base de LH, como por exemplo, fortificantes pasteurizados à base de LH (ARSLANOGLU et al., 2019), realidade bem distinta do Brasil, onde o leite humano não pode ser comercializado e seu uso é restrito aos bancos de leite humano (BRASIL 2006, 2008).

O leite humano nos bancos de leite é proveniente de doadoras que, na maioria das vezes, tiveram o parto a cerca de 15 dias até 3 meses no momento do início da doação. Consequentemente, boa parte do leite pasteurizado disponibilizado em bancos é maduro. Além disso, o leite dos bancos pode ser agrupado de modo que

reúna leites provenientes de doadoras em diferentes estágios da lactação. A prática padronizada de *pooling* ajuda a homogeneizar o conteúdo de macronutrientes e a fortificação padrão. Por outro lado, leva a inadequações quando esse leite humano pasteurizado é a única fonte de nutrição para bebês prematuros (LUNA; MARTIN; GÓMEZ-DE-ORGAZ, 2021).

Sabe-se que o leite de doadora pasteurizado é recomendado para recém-nascidos de baixo peso e prematuros quando o leite materno não está disponível, no entanto, a pasteurização, os ciclos de congelamento-descongelamento, as múltiplas trocas de recipientes e os tempos de armazenamento prolongados necessários para o processamento do leite reduzem a bioatividade. Esses processos, com ênfase na pasteurização, resultam na perda da atividade da lipase presente no leite humano, o que reduz a digestibilidade da gordura e aumenta o risco de crescimento deficiente (KIM et al., 2013; PARKER et al., 2021).

Em 2008, no manual sobre Bancos de Leite Humano, os autores mencionavam uma tendência futura de aditivação de um ou mais nutrientes ao leite humano para manter a média exigida por esses recém-nascidos em termos de necessidades nutricionais. Na ocasião, o documento considerava que, em condições excepcionais, o acréscimo de aditivos poderia ser realizado – sob prescrição médica, em ambiente hospitalar – no momento da administração, mediante a garantia da isenção de riscos à saúde do receptor, levando-se em consideração os riscos e benefícios provenientes da manipulação e do produto adicionado (BRASIL, 2008).

Nesse sentido, vários estudos vêm sendo desenvolvidos, a nível nacional e internacional, visando propor aditivos do leite humano, como é o caso do suplemento comercial FM85®, de suplementos homólogos ao leite humano e adição de ácidos graxos da série ômega-3 (THOMAZ et al., 2012; GRANCE et al., 2015; MULLER, 2017).

Thomaz et al. (2012) e Grance et al. (2015) descreveram metodologias de preparo de aditivos homólogos ao leite humano. Posteriormente, Muller (2017) avaliou o uso de óleo de peixe rico em ácidos graxos ω -3 na alimentação de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso, quantificou os lipídios presentes nos leites aditivados com suplementos homólogos desenvolvidos por Thomaz et al. (2012) e Grance et al. (2015) e quantificou a influência do sistema de alimentação sobre os ácidos graxos saturados e insaturados do leite humano suplementado. O estudo sugeriu não haver diferenças significativas quanto à composição de ácidos graxos saturados ou

insaturados no leite de doadoras, independente da suplementação. Porém, os dados mostram que a retirada da lactose provoca precipitação de uma parcela dos ácidos graxos.

Além da gordura ser o nutriente mais susceptível a variar no leite humano – variação interpessoal, conforme o período do dia, em função das circunstâncias de coleta, armazenamento e distribuição do leite – os processos de congelamento e descongelamento provocam rompimento nas membranas dos glóbulos (micelas) de gordura, com consequente coalescência e maior aderência às paredes do sistema plástico de nutrição enteral (MULLER, 2017).

Os sistemas de infusão usados para suporte de nutrição enteral em recém-nascidos prematuros resultam em uma redução significativa de lipídios (até 40%), o que evidencia a necessidade de mais estudos envolvendo a maximização da oferta lipídica aos prematuros (RYYAN; ROMMEL; ALLEGAERT, 2015).

Gao et al. (2019) também discutem a provável redução do teor de gordura total em decorrência da adesão da gordura à superfície dos recipientes. Pode-se esperar que isso aconteça clinicamente quando o leite humano é transferido do recipiente para a seringa para entrega ao lactente, ou transferido entre diferentes recipientes para pasteurização, armazenamento e distribuição em bancos de leite. Os autores ponderam que o leite humano tem uma densidade energética de 700 kcal/L e uma concentração de gordura de 40 g/L e que há uma perda de 20% de gordura durante os processos de manipulação, então um prematuro de 2 kg, alimentados com 150 ml/kg pode perder 10% da energia que seria ingerida. Embora a adição de fortificante ao leite humano possa compensar parte da perda de energia (principalmente derivada de proteínas), essa perda de gordura e suprimento de energia pode ser clinicamente significativa para bebês prematuros.

No trabalho de Muller (2017) as concentrações dos ácidos graxos essenciais presentes no leite humano analisados não variaram em decorrência do tratamento sofrido no leite com suplementos homólogos e adição de óleo rico em ômega 3, o que reforça a oferta limitada desses lipídeos no leite humano. Todavia, houve efeito do momento de uso do sistema de nutrição enteral com significativa diminuição das concentrações de EPA e DHA, após o leite com óleo passar pelo sistema. A autora refere a separação do óleo acrescentado ao leite e, apesar do conteúdo ter sido manualmente agitado antes de ser colocado no frasco, parece não ter havido uma emulsificação. Nesse sentido, sugere o desenvolvimento de metodologias que

incluam uma homogeneização mais efetiva do produto, visando promover emulsificação.

Assim, surge a presente proposta para padronizar uma emulsão contendo óleo de peixe, rico em ômega 3, para formulação de microcápsulas solúveis a serem adicionadas em leite humano para recém-nascidos prematuros.

2.2 Ácidos Graxos Essenciais (AGEs)

Ácidos graxos essenciais (AGE) não são sintetizados pelos mamíferos e devem ser obtidos pela dieta. São ácidos graxos poli-insaturados que apresentam ligações *cis* e pertencem à família ω -3 ou ω -6, respectivamente, o ácido linoleico (18:2 ω -6) e o ácido linolênico (18:3 ω -3). Embora o organismo humano não disponha de enzimas para produzi-lo, a partir dele, outros ácidos graxos da mesma família podem ser construídos pela inserção de um maior número de insaturações na cadeia carbônica pelas enzimas dessaturases e pelo aumento do número de carbonos pelas elongases (BASSO, 2013), conforme quadro 1.

Quadro 01 – Conversão dos ácidos graxos essenciais, ácido linoleico (18: 2 ω -6) e do ácido linolênico (18:3 ω -3) nos outros ácidos graxos das respectivas famílias.



Fonte: Basso, 2013. As enzimas dessaturases inserem uma dupla ligação (insaturação) na cadeia do ácido graxo. As enzimas elongases aumentam a cadeia em 2 átomos de carbono a partir da extremidade da carboxila. Dessa maneira, a posição das duplas ligações em relação ao carbono ômega é mantida.

Os AGPI de cadeia longa da família ω -3, ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosaexaenoico (DHA), são ácidos graxos que possuem 20 e 22 átomos de carbonos, com cinco e seis duplas ligações, respectivamente. São produtos metabólicos dos AGEs e componentes críticos para o bom funcionamento do

organismo já que exercem importantes funções fisiológicas, metabólicas e estruturais no organismo, sendo o principal componente da membrana celular e do sistema nervoso central (FEFERBAUM; FALCÃO; ZAMBERLAN, 2017; KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017).

A principal fonte de EPA e DHA corresponde aos pescados, destacando-se os peixes de água fria. O óleo de peixe (tal como de atum, salmão ou arenque) apresenta níveis estimados entre 862 e 1840 mg/100 g de EPA e DHA. O DHA é o principal constituinte, correspondendo em média a 65% do total de AGPI-CL ω -3. Outras fontes naturais são algas marinhas cultivadas e leite humano, uma fonte importante para bebês. O ALA, o precursor dos AGPI-CL ω -3, é encontrado em alguns alimentos vegetais como, por exemplo, linhaça, óleo de colza e nozes. Além disso, há um crescente movimento no mercado para enriquecer ou fortificar alimentos com AGPI-CL ω -3, em especial o DHA (KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017; DAEL, 2021).

Os benefícios dos AGPI-CL não são restritos à população adulta e seu papel funcional durante os primeiros 1.000 dias de vida, um período de rápido crescimento e desenvolvimento, é bem documentado na literatura (DAEL, 2021).

Durante a vida fetal ocorre um processo de bioamplificação da concentração de AGPI-CL da mãe para o feto e das membranas eritrocitárias ou dos endotélios fetais para o cérebro e a retina, em especial do ácido docosaenoico (DHA), cujo depósito aumenta significativamente desde a 24ª semana de gestação até 9 meses após o nascimento. A transferência materno-fetal é garantida pelo transporte desses ácidos graxos pela albumina, a alfa-fetoproteína (AFP), a fetuína e a lipase lipoproteica placentária. Essa transferência é substancial no terceiro trimestre de gravidez. Porém, o processo de bioamplificação é interrompido pelo parto prematuro e esse recém-nascido depende, principalmente, da oferta via dieta, para conseguir apresentar os mesmos níveis de DHA presentes em membranas de um RN a termo (MENA, 2008).

O DHA é preferencialmente incorporado na composição cerebral e retiniana no último trimestre da gestação e nos 2 primeiros anos de vida. É considerado essencial para a função cerebral normal, sendo o principal ácido graxo presente na substância cinzenta do cérebro. Corresponde a 15% da composição total de ácidos graxos no córtex frontal humano e afeta as vias de neurotransmissores, transmissão sináptica e transdução de sinais. Sua deficiência pode alterar a composição das membranas

sinápticas, afetando as funções dos receptores da membrana neuronal, canais iônicos e enzimáticos. Assim, sugere-se que a suplementação dietética se relaciona positivamente com o desenvolvimento neurocognitivo e visual infantil (FEFERBAUM; FALCÃO; ZAMBERLAN, 2017).

A deposição dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL) no feto é rápida, devido ao fato de estar diretamente relacionada à sua necessidade crucial de desenvolvimento neurológico e visual normal. A composição dos ácidos graxos do leite materno varia de acordo com a dieta, mas contém em média 0,3 – 0,6 % de DHA, 0,4 – 0,7 % de ARA, 8 – 17 % de LA e 0,5 – 1 % de ALA. Todos esses ácidos graxos são bem absorvidos e prontamente utilizados pelos bebês. No entanto, o fornecimento de AGPI-CL pode ser dificultado em certas situações, como em bebês prematuros e alimentados com fórmula. Assim, os bebês nascidos prematuramente perdem, como dito anteriormente, o período de acúmulo máximo de ARA e DHA a partir de fontes maternas durante o último trimestre de gravidez (KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017).

Há evidências crescentes de que, além dos efeitos estruturais no crescimento e desenvolvimento de órgãos, a suplementação com ARA e DHA pode reduzir a incidência ou gravidade de afecções como displasia broncopulmonar (DBP), persistência do canal arterial (PDA), retinopatia da prematuridade (ROP), enterocolite necrosante (NEC), lesão da substância branca (WMI) do cérebro e resultados de neurodesenvolvimento prejudicados. A oferta do AGPI-CL que também atuam como moléculas sinalizadoras, é importante na regulação da inflamação. Estudos mostram que bebês imaturos têm níveis elevados de citocinas inflamatórias durante o período neonatal, e que a expressão aumentada de citocinas está associada ao desenvolvimento das afecções elencadas (WENDEL et al., 2021).

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) estabeleceu recomendações para gorduras e ácidos graxos totais, incluindo os ômega 3, há mais de uma década. Estabeleceu-se um nível de ingestão adequado para ALA em 0,5% da energia. Já o Instituto de Medicina (IOM) recomendou que aproximadamente 10% da Faixa de Distribuição de Macronutrientes Aceitável para ALA pode ser consumido como EPA e / ou DHA. Os dados disponíveis são insuficientes para se estabelecer uma ingestão máxima tolerável (UL) para AGPI ω -3 (individualmente ou combinado) para qualquer grupo populacional, contudo, o FDA recomenda não exceder 3 g / dia de EPA e DHA combinados, com uma ingestão de até 2 g / dia de suplementos

dietéticos (KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017; DAEL, 2021). A tabela 2 traz as principais recomendações de autoridades internacionais.

Tabela 2 – Principais recomendações de ingestão de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 de autoridades internacionais.

Autoridade	Recomendação
Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA)	Adultos: EPA + DHA = 250 mg / dia* Crianças > 6 < 24 meses: 100 mg / dia* Gravidez e a lactação: 350 – 400 mg/dia* de DHA
Instituto de Medicina (IOM)	100 mg / dia**
Conselho Nacional de Saúde e Pesquisa Médica (NHMRC), Austrália e Nova Zelândia (2017)	Gravidez: 115 mg/dia Lactação: 145 mg por dia
Autoridade Francesa de Segurança Alimentar (ANSES)	Adultos: 250 mg/dia de DHA ou 500 mg de DHA e EPA combinados Gestantes e lactantes: 250 mg de DHA ou 500 mg de DHA e EPA combinados

Fonte: Autoria própria. Baseado em Dael (2021). *AI – ingestão adequada; ** ingestão média atual de EPA e DHA nos Estados Unidos (EUA).

É discutido na literatura a necessidade urgente de estabelecer ingestões dietéticas de referência (DRIs) para DHA e EPA porque DRIs são reconhecidos como o padrão "oficial" pelo qual as agências federais emitem orientações dietéticas ou diretrizes políticas para a saúde e o bem-estar de indivíduos. Enquanto essas diretrizes não são estabelecidas, uma visão geral recente sugere uma ingestão diária recomendada de 55-60 mg / kg de DHA, <20 mg / kg de EPA e 35-45 mg / dia de ácido araquidônico (ARA) para bebês prematuros totalmente alimentados por via enteral (DAEL, 2021).

2.3 Emulsões

Emulsões são sistemas coloidais largamente utilizados pela indústria de alimentos. Consistem em mistura, dispersão ou suspensão de dois ou mais líquidos imiscíveis, geralmente, óleo e água, estando um deles disperso no outro na forma de pequenas gotículas esféricas cujos diâmetros variam de 0,1µm a 100µm (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015). Um sistema que consiste em gotículas de óleo dispersas em uma fase aquosa é chamado de emulsão óleo-em-água (O/A), enquanto um sistema

que consiste em gotículas de água dispersa em uma fase oleosa é chamado de emulsão água em óleo (A/O). Outros tipos são as múltiplas emulsões, como emulsões óleo-em-água-em-óleo (O/A/O) ou água-em-óleo-em-água (A/O/A) (BAKRY et al., 2016; TAN; MCCLEMENTS, 2021).

As emulsões são preparadas homogeneizando óleo, água e emulsificante em conjunto usando um dispositivo mecânico conhecido como homogeneizador (misturador de alto cisalhamento, homogeneizador de alta pressão, moinho coloidal, sonicador ou homogeneizador de membrana) (BAKRY et al., 2016).

Homogeneização é o processo de produção das emulsões e esta é alcançada pela aplicação de energia suficiente na interface óleo/água fracionando o óleo em gotículas menores. O tamanho das gotículas é inversamente proporcional à energia aplicada no processo, ou seja, quanto menor o tamanho a ser alcançado, maior a entrada de energia necessária (HU et al., 2017).

Para obter uma solução cineticamente estável, emulsificantes ou modificadores de textura são comumente adicionados ao sistema de emulsão (BAKRY et al., 2016). A seleção do surfactante (emulsionante) pode determinar não apenas o menor tamanho alcançável, mas também a conservação e as características da superfície das gotículas da emulsão (HU et al., 2017).

Os emulsificantes são moléculas tensoativas que consistem em partes hidrofílicas e hidrofóbicas, o que os torna capazes de adsorver na interface óleo-água. Existem duas categorias principais de emulsificantes alimentares: emulsificantes de baixo peso molecular (*low molecular weight emulsifiers* – LMWEs) – lecitinas, polissorbatos, ou monoglicerídeos e diglicerídeos – e biopolímeros anfifílicos, dos quais o principal exemplo são as proteínas (por exemplo, proteínas do soro do leite, caseínas) (BERTON-CARABIN; SCHROËN, 2019).

As emulsões são divididas em dois grupos principais: emulsões simples e emulsões múltiplas, conforme a distribuição relativa das diferentes fases que compõem o sistema. As emulsões simples óleo/água (O/A) têm como exemplo o leite, o iogurte, os cremes, os molhos para saladas, a maionese, o sorvete e as sopas. Menos frequentes, as emulsões simples água/óleo (A/O), têm como exemplo a margarina e a manteiga. Já as emulsões múltiplas, como por exemplo as emulsões A/O/A, têm sido frequentemente empregadas no preparo de micro e nanoencapsulados hidrofílicos e lipofílicos, na forma sólida ou semi-sólida, tais como

fármacos, corantes, minerais, probióticos, antioxidantes, vitaminas, entre outros (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015).

A tecnologia de emulsões é comumente empregada na indústria alimentícia para criar uma ampla variedade de produtos alimentícios com atributos funcionais distintos como aparência, textura, paladar e perfil de sabor desejáveis. Além disso, as emulsões têm sido amplamente utilizadas juntamente da tecnologia de encapsulamento e entrega de agentes bioativos, como vitaminas e nutraceuticos (TAN; MCCLEMENTS, 2021).

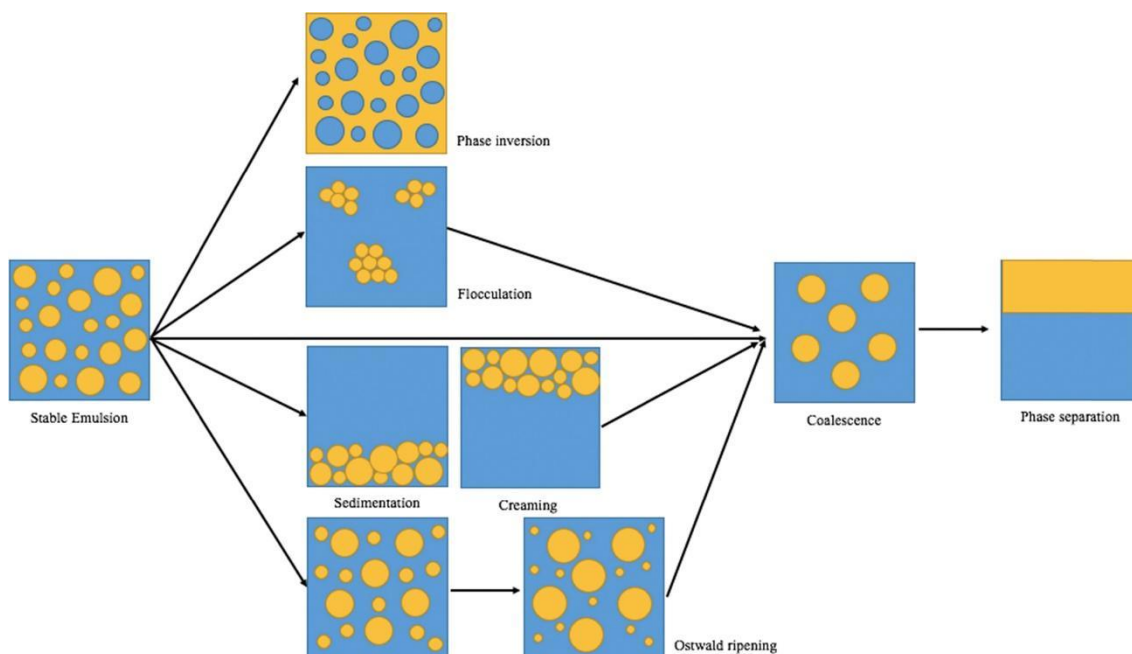
As emulsões são termodinamicamente instáveis (metaestáveis), devido à positiva e elevada energia livre – tensão interfacial – existente entre as duas fases. Entretanto, quanto menor o tamanho das gotas dispersas e maior a densidade e a viscosidade da fase contínua, maior e melhor será a estabilidade cinética da emulsão (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015).

A preservação das emulsões pode ser melhorada adicionando-se emulsificante ao sistema. A escolha de diferentes tipos de óleo ou emulsificante, a incorporação de diferentes aditivos – agentes espessantes ou gelificantes, a variação de tamanho das gotículas ou a manipulação da proporção óleo-água podem impactar nas propriedades das emulsões e resultar em diferentes atributos físico-químicos, sensoriais e nutricionais. Contudo, as emulsões convencionais apresentam algumas limitações no tocante às aplicações na indústria alimentícia, pois são suscetíveis à quebra por meio de mecanismos de instabilidade física, como separação gravitacional e agregação de gotículas. Além disso, eles têm uma capacidade limitada de controlar o perfil de liberação de ingredientes encapsulados (TAN; MCCLEMENTS, 2021).

Assim, a estabilidade da emulsão refere-se à capacidade das emulsões de resistir a mudanças em suas propriedades físico-químicas ao longo do tempo. Porém, todas as emulsões são instáveis por natureza, e as duas fases eventualmente se separarão quando forem deixadas em repouso por tempo suficiente. A instabilidade das emulsões pode resultar em alguns efeitos indesejáveis nos produtos, incluindo oleosidade e sedimentação, que diminuem a qualidade e encurtam a vida útil (HU et al., 2017).

Os mecanismos que levam à instabilidade física da emulsão incluem separação gravitacional (creme/sedimentação), floculação, coalescência, amadurecimento de *Ostwald* e inversão de fase conforme figura 1 (HU et al., 2017; BERTON-CARABIN; SCHROËN, 2019).

Figura 1 – Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade no sistema de emulsão.



Fonte: Hu et al. (2017).

Embora alguns desses fenômenos às vezes possam ser usados propositalmente para induzir estruturas específicas, eles geralmente são indesejados, pois levam a defeitos na textura e na aparência dos produtos (BERTON-CARABIN; SCHROËN, 2019).

A instabilidade da emulsão pode ser observada diretamente a olho nu, assim, a observação visual é provavelmente o método mais simples, barato e rápido para avaliar a separação gravitacional da emulsão sem instrumentos analíticos caros. A separação gravitacional pode ser classificada em dois mecanismos: formação de creme e sedimentação (HU et al., 2017).

O processo pelo qual as gotículas das emulsões se movem para baixo (sedimentação) ou para cima (formação de creme ou cremação) devido à sua densidade superior ou inferior à do líquido que a envolve, é conhecido como separação gravitacional. A água tende a se mover para baixo, enquanto o óleo migra para cima, uma vez que a maioria dos óleos líquidos é menos densa que a água em estado líquido (LIU et al., 2019).

A extensão da formação de creme ou sedimentação pode ser avaliada observando-se a espessura da camada a olho nu e, em seguida, realizando-se a medida a ser registrada instrumentalmente (HU et al., 2017). Assim, a estabilidade pode ser medida em função da porcentagem de separação e expressa segundo o índice de cremação descrito pela equação: $IC (\%) = (H/H_0) \times 100$, em que: H_0 representa a altura inicial da fase inferior e H representa a altura inicial da fase superior após 24 horas (CARNEIRO et al., 2013).

É sabidamente uma tendência o crescente interesse em alimentos promotores de saúde e funcionais, o que influencia o design de emulsões alimentares com composição controlada para atuar como reservatório de moléculas bioativas, promotoras da saúde, como é o caso dos AGPI. Outro ponto de destaque é a adoção de rótulos limpos e a atual transição para alimentos e ingredientes mais sustentáveis, que, para emulsões, se resume principalmente à origem dos emulsificantes. Embora as proteínas de origem animal como as lácteas sejam conhecidas por sua alta funcionalidade, é desejável considerar alternativas derivadas de plantas, como é o caso das lecitinas (BERTON-CARABIN; SCHROËN, 2019).

2.4 Microcápsulas

Há menção na literatura científica que a pesquisa sobre microencapsulação começou no final da década de 1930 e 20 anos mais tarde o processo foi aplicado pela primeira vez na indústria. Atualmente, diferentes setores industriais como o farmacêutico, o cosmético, o agrícola, o têxtil e o alimentício utilizam o processo de microencapsulação para diversos fins (CORRÊA-FILHO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019; SHARMA; BORAH, 2021).

Na tentativa de aproveitar todo o potencial dos óleos marinhos, vegetais e essenciais estudos nesse sentido têm ganhado notoriedade. Por serem quimicamente instáveis e suscetível à deterioração oxidativa e perda de compostos voláteis, especialmente quando expostos ao oxigênio, luz, umidade e calor, um produto fortificado com esses óleos pode se deteriorar por degradação oxidativa culminando na formação de gostos e sabores desagradáveis e na geração de radicais livres, o que interfere negativamente na qualidade do produto, na vida útil e aceitabilidade geral. Nesse sentido, a tecnologia de microencapsulação pode ser uma opção viável para melhora ou manutenção dessas características funcionais e os óleos

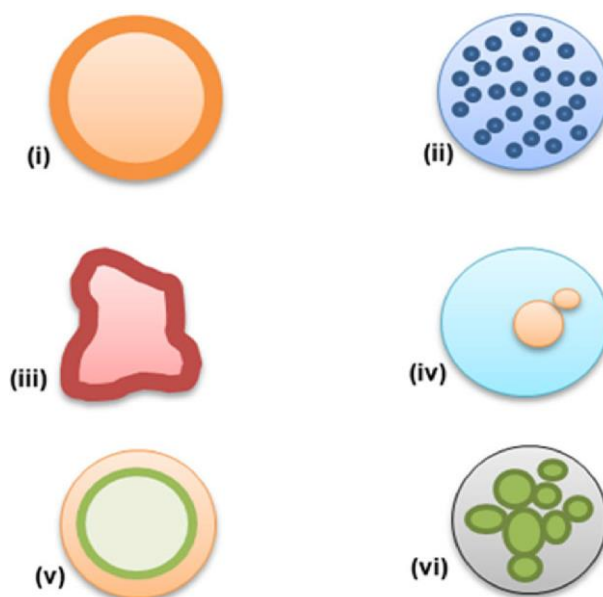
microencapsulados encontraram várias aplicações nas áreas de alimentos, pesticidas, têxteis e produtos farmacêuticos (BAKRY et al., 2016).

De modo simplificado, a microencapsulação pode ser definida como a tecnologia de embalagem de materiais sólidos, líquidos ou gasosos com finos revestimentos poliméricos, formando pequenas partículas, as microcápsulas. O polímero de revestimento atua como uma película protetora, isolando o núcleo e evitando o efeito de sua exposição inadequada. Essa membrana se dissolve por meio de um estímulo específico, liberando o núcleo no local e/ou no momento ideal (SILVA et al., 2014).

A técnica de microencapsulação permite a conversão de líquidos em sólidos, a alteração de propriedades coloidais e superficiais, além de fornecer proteção ambiental, liberação controlada e/ou melhor disponibilidade de materiais revestidos (BANSODE et al., 2010). O diâmetro do produto microencapsulado varia entre 1-1000 μm (SHARMA; BORAH, 2021).

As cápsulas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho, forma e construção. As macrocápsulas apresentam tamanho superior a 5.000 μm . Já as microcápsulas atingem de 0,2 a 5.000 μm . As nanocápsulas medem menos que 0,2 μm . Em termos de forma e construção, as cápsulas podem ser divididas em dois grupos: microcápsulas e microesferas. A diferença entre eles decorre de sua estrutura interna e morfologia: as microcápsulas são ocas possuindo internamente um sistema de reservatório, enquanto as microesferas são sistemas de matriz densa (CORRÊA-FILHO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019; SHARMA; BORAH, 2021). A figura 2 apresenta diferentes tipos de microcápsulas.

Figura 2 – Diferentes tipos de microcápsulas.



Fonte: BAKRY et al. (2016). (i) microcápsula simples, (ii) matriz (microesfera), (iii) microcápsula irregular, (iv) microcápsula de vários núcleos, (v) microcápsula de múltiplas paredes, e (vi) conjunto de microcápsulas.

Geralmente, o tamanho e a forma das microcápsulas dependem dos materiais de parede e dos métodos usados para prepará-las e podem determinar propriedades funcionais e potenciais aplicações de componentes encapsulados (BAKRY et al., 2016).

Em suma, as microcápsulas consistem em um material do núcleo, referido como fase interna ou de preenchimento, e uma parede referida como revestimento, invólucro ou membrana. O material do núcleo consiste no material específico a ser revestido e pode ser de natureza líquida e/ou sólida. O núcleo líquido pode incluir materiais dispersos e/ou dissolvidos. O núcleo sólido pode incluir ativos, estabilizadores, diluentes, excipientes e retardadores ou aceleradores de taxa de liberação. Essa possibilidade de variação da composição do material do núcleo garante flexibilidade no desenvolvimento e uso da microcápsula. Já o material da parede determina a estabilidade das micropartículas, a eficiência do processo, e o grau de proteção para o núcleo. Os materiais de parede usados comumente para a microencapsulação de óleos incluem polímeros sintéticos e biomateriais naturais, geralmente carboidratos e proteínas (BANSODE et al., 2010; BAKRY et al., 2016).

A escolha correta do material de parede é muito importante, pois influencia na eficiência de encapsulamento e na estabilidade da microcápsula. O material de parede

ideal deve ser capaz de formar uma película coesa com o material do núcleo, ser quimicamente compatível e não reativo com o núcleo, ter a capacidade de selar e manter o núcleo dentro da cápsula, assim como a capacidade de fornecer proteção máxima ao núcleo contra condições adversas, apresentar resistência, flexibilidade, impermeabilidade, propriedades ópticas e estabilidade, viabilidade econômica e ainda, não possuir sabor desagradável no caso de aplicabilidade alimentar (BANSODE et al., 2010; SILVA et al., 2014).

A maioria dos materiais de parede não possui todas as propriedades desejadas, por isso, uma prática comum envolve a mistura de dois ou mais materiais que podem ser selecionados a partir de uma ampla variedade de polímeros naturais e sintéticos (SILVA et al., 2014). Vários tipos de materiais de parede têm sido usados para a produção de microcápsulas, como os polissacarídeos como amido, carragenina, maltodextrina e goma arábica, lipídios como o ácido esteárico, mono e diglicerídeos, além de proteínas como albuminas, proteína de ervilha, gelatina e caseína. A maltodextrina e a goma arábica são dois dos mais comumente aplicados. Neste sentido, cabe salientar que as microcápsulas destinadas à incorporação em produtos alimentícios devem ser formadas por polímeros comestíveis como maltodextrina, inulina, goma arábica, amido, entre outros (CORRÊA-FILHO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

A maltodextrina tem sido amplamente utilizada na microencapsulação de compostos bioativos devido ao seu desempenho satisfatório, baixo custo relativo e sabor e aroma neutros. Caracteriza-se pela alta solubilidade em água, baixa viscosidade em altas concentrações, capacidade de formação de filme e boa proteção contra a oxidação dos materiais do núcleo. Por outro lado, a principal desvantagem do uso da maltodextrina no processo de microencapsulação é a baixa capacidade emulsificante. Assim, para formar emulsões estáveis, é encorajada a mistura com outros materiais de parede, como goma arábica, amido modificado e proteínas (CORRÊA-FILHO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

O amido é outro tipo de carboidrato constituído por duas frações polissacarídicas distintas, a amilose, fração linear, e a amilopectina, fração ramificada. Esse polímero de carboidratos é abundante na natureza, apresenta baixo custo, é biocompatível, biodegradável, atóxico e é naturalmente renovável, além de apresentar propriedades físicas como a capacidade de reter vários materiais sensíveis, como compostos organolépticos, o que justifica o aumento do interesse em seu uso nos

últimos anos, na indústria de tecnologia de alimentos, indústria farmacêutica e de nanotecnologia (ANDRADE; CAMILLOTO; CRUZ, 2020).

Neste sentido, Yue et al. (2020) e Charles et al. (2021) tratam da incorporação do amido como material de revestimento das microcápsulas. Os autores referem melhora da vida útil e estabilidade oxidativa justificando a utilização de amido como material de parede, em diferentes concentrações ou em associação à maltodextrina, por exemplo.

Outros materiais de parede são referidos na literatura científica. Porém, carboidratos, como é o caso da maltodextrina e do amido, são materiais de parede amplamente usados na indústria de alimentos para proteger os materiais do núcleo da oxidação, interação química e volatilização, bem como para maximizar a eficiência de encapsulamento, conforme foi evidenciado no trabalho de Zhu et al. (2021).

O encapsulamento deve permitir que o núcleo, isolado do ambiente externo, seja liberado no momento e local adequados. Essa propriedade melhora a eficácia, reduz a dose necessária de aditivos e amplia as aplicações dos compostos de interesse. Além disso, as taxas de liberação do material do núcleo dependem da sua interação com o material de revestimento, da volatilidade do núcleo, do tamanho da partícula e do grau de viscosidade do material da parede (SHARMA; BORAH, 2021).

Existe uma variedade de métodos de microencapsulação descritos na literatura. A escolha do método mais adequado depende do tipo de material ativo a ser encapsulado, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado. A diferença básica entre os métodos existentes está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante e essa combinação pode ser de natureza física, química ou físico-química conforme quadro 2 (SUAVE et al., 2006).

Quadro 2 – Métodos para Microencapsulação.

Métodos Físicos	Métodos Químicos	Métodos Físico-Químicos
<i>Spray drying</i> <i>Spray cooling</i> Leito fluidizado Extrusão centrífuga Co-cristalização Liofilização	Inclusão molecular Polimerização interfacial	Coacervação Separação por fase orgânica Lipossomas Lipoesferas (nanopartículas) Evaporação de solvente

Fonte: Autoria própria. Baseado em Suave et al. (2006); Bansode et al. (2010).

A microencapsulação por liofilização é um processo no qual a solução ou emulsão contendo os materiais da parede e do núcleo é congelada a temperaturas abaixo de -40°C e seca por sublimação sob baixa pressão. Trata-se de uma técnica simples e adequada para a microencapsulação de materiais biológicos sensíveis ao calor e oxigênio devido à aplicação de baixas temperaturas e remoção de oxigênio durante o processo de secagem (CORRÊA-FILHO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

A liofilização é usada para a desidratação de quase todos os materiais e aromas sensíveis ao calor, como óleos e tem sido utilizada com sucesso para microencapsular óleos de peixe, linhaça, noz e azeite (BAKRY et al., 2016). Um exemplo da utilização dessa técnica é descrito por Calvo et al. (2012) ao microencapsular óleo vegetal – azeite extravirgem – na presença de maltodextrina, carboximetilcelulose e lecitina, demonstrando que o óleo permaneceu inalterado por 9 a 11 meses, o que aumentou a vida útil do produto.

A liofilização, por ser um método que envolve a desidratação do material congelado por sublimação a vácuo, promove a remoção da água do composto sem submeter a amostra a altas temperaturas. Desta forma, fornece produtos de excelente qualidade e minimiza as alterações associadas à alta temperatura, sendo amplamente utilizado em essências ou aromatizantes (SILVA et al., 2014).

No entanto, esta técnica apresenta algumas restrições, como alto consumo de energia e custo operacional devido ao longo tempo de processamento (acima de 20

h). Em comparação com a secagem por pulverização, o método de liofilização pode ser até 50 vezes mais caro. Além disso, o material seco possui uma estrutura porosa que expõe o ingrediente ativo encapsulado à atmosfera, oferecendo assim baixa proteção para uma vida útil prolongada desse composto. Esses fatores prejudicam sua aplicabilidade comercial (SILVA et al., 2014; CORRÊA-FILHO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

A tecnologia de emulsificação é um passo fundamental na microencapsulação de óleos. É geralmente aplicado para o encapsulamento de bioativos em soluções aquosas, que podem ser usadas diretamente no estado líquido ou podem ser secas por pulverização ou liofilização para formar pós após a emulsificação. Portanto, faz parte do processo de microencapsulação (BAKRY et al., 2016).

A escolha do material de parede e do ativo revestido, assim como as técnicas de microencapsulação variam conforme os objetivos e aplicabilidade do produto. O apêndice 1 traz exemplos de materiais, análises e técnicas aplicadas no processo de microencapsulação de óleos conforme literatura científica.

Para avaliar a eficiência de um sistema baseado em emulsão ao encapsular compostos bioativos, parâmetros como eficiência de encapsulamento, conservação no armazenamento e perfil de liberação são de interesse específico entre os pesquisadores. Para determinar esses parâmetros, é necessário quantificar a quantidade de compostos alvo que permanecem no sistema de emulsão logo após o processamento, em um momento específico de armazenamento e durante a digestão. Alguns métodos possíveis de serem utilizados nesse sentido são a espectrofotometria UV-visível e a cromatografia. Entre todos os instrumentos de cromatografia disponíveis, a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC) são mais comumente usados para análises quantitativas e qualitativas de compostos encapsulados (HU et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e testar microcápsulas contendo ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 para adição em leite humano destinados à alimentação de recém-nascidos pré-termo.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar emulsões lipídicas contendo ácidos graxos poli-insaturados ômega-3;
- Realizar a secagem das emulsões para obtenção de pó contendo microcápsulas de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3;
- Estabelecer as características e propriedades das microcápsulas;
- Observar a capacidade de dissolução do pó das microcápsulas quando incorporadas ao leite humano;
- Observar o comportamento o leite humano acrescido do pó das microcápsulas em sistema de simulação de nutrição enteral em comparação com o leite humano puro e aquele acrescido de óleo de peixe livre.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de pesquisa

Trata-se de uma pesquisa aplicada, com abordagem quantitativa, descritiva com enfoque experimental.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Estudo Piloto

Inicialmente, realizou-se um pré-teste em microescala para ajuste da técnica e definição dos métodos. A metodologia foi adaptada de Jiménez-Martín et al. (2015).

O óleo utilizado como ativo era proveniente de suplemento alimentar à base de óleo de peixe em cápsulas gelatinosas vendido comercialmente, contendo 540 mg de EPA e 360 mg de DHA. Cada cápsula contém 1.000 mg de óleo de peixe. A informação nutricional consta na tabela 3.

Tabela 3 – Informação nutricional das cápsulas gelatinosas contendo óleo de peixe, segundo informações do fabricante.

Informação Nutricional	Porção 4,2g*	Porção 2,0g**
Valor energético	32 kcal	15,24 kcal
Proteínas	0,6 g	0,29 g
Gorduras Totais	3,2 g	1,52 g
Gorduras Saturadas	0,8 g	0,38 g
Gorduras <i>Trans</i>	0 g	0 g
Gorduras Monoinsaturadas	0,6 g	0,29 g
Gorduras Poli-insaturadas	0,9 g	0,43 g
Ômega 3		
EPA	540 mg	257,14 mg
DHA	360 mg	171,43 mg

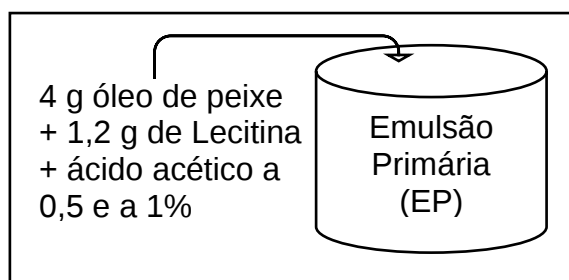
Fonte: Drogasil®. * Porção de 4,2g (3 cápsulas – recomendação do fabricante); ** Porção de 2g (experimento).

Foram pesados 4,0 g de óleo de peixe e 1,2 g de lecitina de soja em pó em balança analítica *Adventurer Ohaus* (máx.= 210g – mín.= 0,01g) e acrescentados à

solução de ácido acético em 2 concentrações diferentes – 0,5% e 1% – até obtenção de 40 mL.

A mistura foi colocada em agitador magnético Nova Ética® por 10 minutos para homogeneização, resultando na obtenção da Emulsão Primária conforme figura 3.

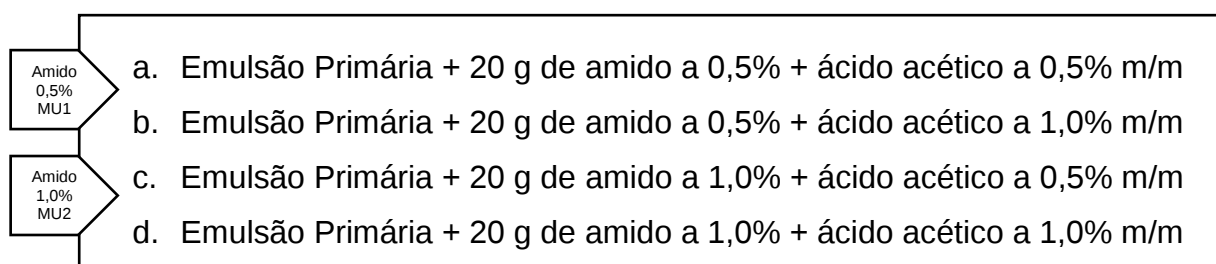
Figura 3 – Emulsão Monocamada.



Fonte: autoria própria (2022).

A emulsão primária (MO) foi acrescida de 20 mL de solução de amido em duas concentrações distintas, 0,5% e 1%, respectivamente, e solubilizadas em duas concentrações de ácido acético (0,5 e 1%), conforme esquema a seguir (figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática das Emulsões Multicamada.

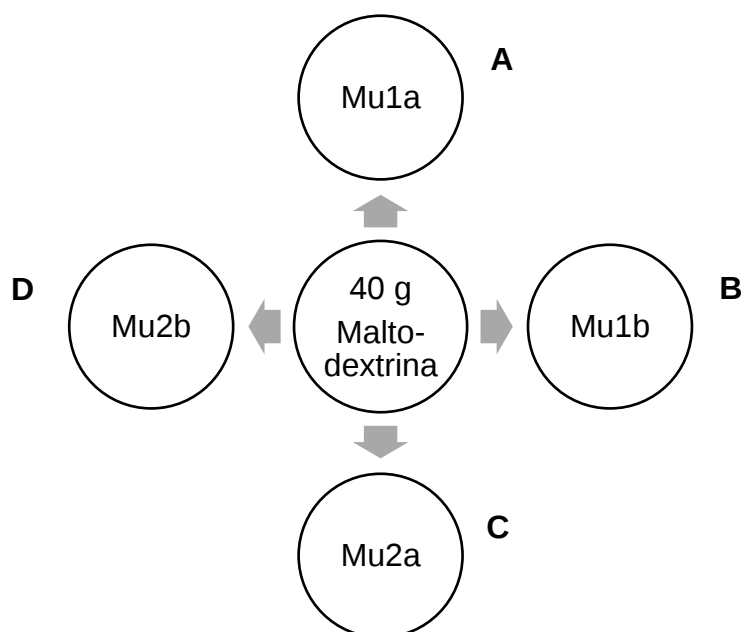


Fonte: autoria própria (2022).

Na sequência foi produzida a solução mãe de maltodextrina contendo 30% p/p em ácido acético a 1% (70 mL), ou seja, 30 g de maltodextrina adicionados a 1 mL de ácido acético em 69 mL de água miliQ.

As emulsões multicamada (MU1_(a,b) e MU2_(c,d)) foram adicionadas de 40 mL dessa solução de maltodextrina, resultando em 4 soluções distintas (figura 5).

Figura 5 – Representação esquemática das Emulsões de Alimentação.



Onde:

- A. MO + 20 g de solução de amido a 0,5% + 0,5% de ácido acético (Mu1)_a
- B. MO + 20 g de solução de amido a 0,5% + 1% de ácido acético (Mu1)_b
- C. MO + 20 g de solução de amido a 1% + 0,5% de ácido acético (Mu2)_a
- D. MO + 20 g de solução de amido a 1% + 1% de ácido acético (Mu2)_b

Fonte: autoria própria (2022).

4.2.2 Experimento

Fase I: Preparo das emulsões lipídicas

Após estudo piloto houve ajuste da técnica e as emulsões lipídicas que dariam origem às microcápsulas contendo ácidos graxos ômega 3 foram preparadas no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação – LDTI da UFMS.

Para a preparação das emulsões utilizou-se óleo de peixe comercial em cápsulas gelatinosas – fonte de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3, lecitina de soja, amido de milho, maltodextrina e ácido acético glacial de qualidade alimentar, conforme referido anteriormente.

Para a composição das emulsões primárias, a fonte lipídica foi emulsionada em lecitina na proporção de 3:1 p/v por agitação magnética e, em seguida, adicionada à

solução de ácido acético a 1% no volume de 100 vezes o volume do óleo de peixe. A homogeneização foi realizada a 18.000 rpm por 10 min utilizando-se um homogeneizador/ triturador Turrtec® TE-102, formando a primeira camada denominada monocamada (MO).

A partir das emulsões primárias, foram preparados dois tipos de emulsões secundárias segundo a concentração do revestimento de amido, identificadas como emulsões multicamadas (Mu1 e Mu2) nas concentrações de 0,5% e 1% (m/m), respectivamente, em solução de ácido acético a 1%.

Em separado, ao conteúdo da Mu1 e da Mu2 foi adicionada a solução de maltodextrina a 30% p/p, diluída em ácido acético 1%, para composição das emulsões de alimentação.

Fase II: Preparação de pós de óleo de peixe microencapsulado.

As emulsões foram separadas em volumes fixos de 20 mL, acomodadas em tubos Falcon com capacidade de 50 mL e armazenadas em ultrafreezer Panasonic® a -80°C. Posteriormente, foram submetidas à secagem por liofilização em parceria com o Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB) da UFMS, utilizando-se o aparelho Vacuum Pump RZ 2.5.

Fase III: Simulação das condições de nutrição enteral e observação do comportamento das microcápsulas adicionadas ao leite humano.

A fase de testes com leite humano para simular as condições de nutrição enteral de RN pré-termo de alto risco internado em unidades neonatais foi desenvolvida conforme trabalho de Muller (2017).

As amostras de leite humano proveniente de doação apresentaram crematócrito de 60% e acidez Dornic ≤ 8 . O leite foi descongelado em banho-maria à 40°C e utilizado na simulação de um sistema de nutrição enteral para testar o comportamento de três grupos: Grupo controle (GC) = leite humano puro; Grupo positivo (GP) = leite humano acrescido de óleo de peixe; Grupo teste (GT1 – amido a 0,5% e GT2 – amido a 1,0%) = leite humano acrescido de microcápsulas de óleo de peixe.

Um volume de 20ml dos GC, GP e GT foi acondicionado em frascos de plástico transparente (polietileno), graduados com escala de 10 ml, estéreis e com capacidade para 100mL (Biobase®).

Os frascos foram colocados na posição vertical em suporte para soro, anexados ao equipo de nutrição enteral com ponta perfurante para adaptação do equipo ao frasco (NBR 14041/1998 - ABNT, 2008) e acionado o dispositivo gotejador controlado manualmente para descida das amostras de leite dos distintos grupos. O mesmo procedimento foi realizado com cada uma das amostras pertencentes a cada grupo em triplicata.

Foram avaliados a capacidade de se dissolver do pó, o tempo de descida do leite, o volume final após passagem pelo sistema de nutrição enteral e o volume retido no mesmo.

4.3 Caracterização das emulsões lipídicas e análise estatística

Imediatamente após a produção, as emulsões foram mantidas sob agitação suave para manter a homogeneidade, e, em seguida, com pipeta Pasteur foram coletadas gotículas e dispersas em lâmina de microscópio coberta por uma lamínula, preparadas em triplicata para cada solução, nas diferentes concentrações de amido (0,5% e 1,0%).

As lâminas foram devidamente identificadas e observadas em microscópio óptico para a avaliação das microestruturas por meio de uma objetiva de imersão em óleo 10 × 100. As imagens foram capturadas utilizando-se câmera digital com grande-angular de 12 MP, grande-angular: abertura $f/1.8$ e Zoom digital até 5x, com o objetivo de obter boa resolução espacial.

As imagens foram agrupadas aleatoriamente segundo as concentrações de amido e processadas pelas macros disponíveis no *software* livre ImageJ® que pode ser obtido gratuitamente no site <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Foi feita a conversão de pixel para dpi (inc) (conversão interna do *software*) para quantificação da área de cada gotícula formada expressas em μm , para comparação aos padrões de literatura e validação estatística. O tamanho das partículas que serviram de base no cálculo das médias das áreas das microcápsulas assim como o passo-a-passo das análises está demonstrado no apêndice 2.

Os dados provenientes das imagens obtidas em microscópio óptico e tratadas em software livre ImageJ® foram submetidas à estatística descritiva, teste de hipóteses (*t test*) e análise de variância – ANOVA ao nível de significância de 5% utilizando o software RStudio.

O pH nas triplicatas de cada emulsão foi verificado logo após a produção e após 15 dias em armazenamento em temperatura ambiente utilizando um medidor de pH de bancada (Hanna Instrumentos® mod. pH21).

Um volume fixo de 20 ml das emulsões nas diferentes concentrações de amido foi transferido para provetas graduadas de vidro, devidamente seladas e armazenadas por 15 dias em temperatura ambiente. As emulsões foram avaliadas quanto à separação de fases do dia 1 até o décimo quinto dia.

O índice de cremação foi medido em função da porcentagem de separação de fases e expresso segundo equação: $IC (\%) = (H/H_0) \times 100$, em que: H_0 representa a altura inicial da fase inferior e H representa a altura inicial da fase superior após 24 horas (CARNEIRO et al., 2013).

Os dados referentes às observações das microcápsulas e leite humano foram analisados por meio da estatística descritiva por meio de medidas de tendência central e medidas de variabilidade ou dispersão, quando apropriado.

4.4 Aspectos Éticos

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS mediante parecer nº 5.833.192.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o estudo piloto, avaliou-se o pH no decorrer de 7 dias consecutivos e observou-se que a adição de amido, independentemente da concentração (0,5 ou 1,0%), elevou o pH de 3 para 5 e esse valor se manteve. A maltodextrina não interferiu no pH, independente da concentração do ácido acético. Com isso, foi padronizado o uso do ácido acético a 1%.

Outros trabalhos referem utilização de ácido acético a 1%, seja para ajuste de pH ou para melhorar a solubilidade dos reagentes (PULIDO; BERISTAIN, 2010; RENDÓN et al., 2010). Além disso, um estudo referiu que o fenômeno de coalescência foi mais lento nas amostras com pH mais ácido (pH = 2) e que a lecitina é um bom tensoativo em soluções aquosas se o pH da amostra for ácido (entre 2 e 3) (PELAEZ; MORTIMER, 2011).

Houve separação de fase em todas as amostras durante o estudo piloto, independente da concentração do amido, assim, o uso do agitador magnético foi desconsiderado por não garantir a homogeneidade das soluções e a preservação das emulsões.

A separação gravitacional que ocasiona essa observação de fases distintas representa a instabilidade física da emulsão caracterizada pela formação de creme ou sedimentação (HU et al., 2017; BERTON-CARABIN; SCHROËN, 2019). Esse fenômeno pode ser retardado pela diminuição do tamanho da gota e/ou aumento da viscosidade da fase contínua. Nesse sentido, dispositivos de emulsificação como homogeneizadores de alta pressão e sistemas rotor-estator podem ser úteis (BERTON-CARABIN; SAGIS; SCHROËN, 2018).

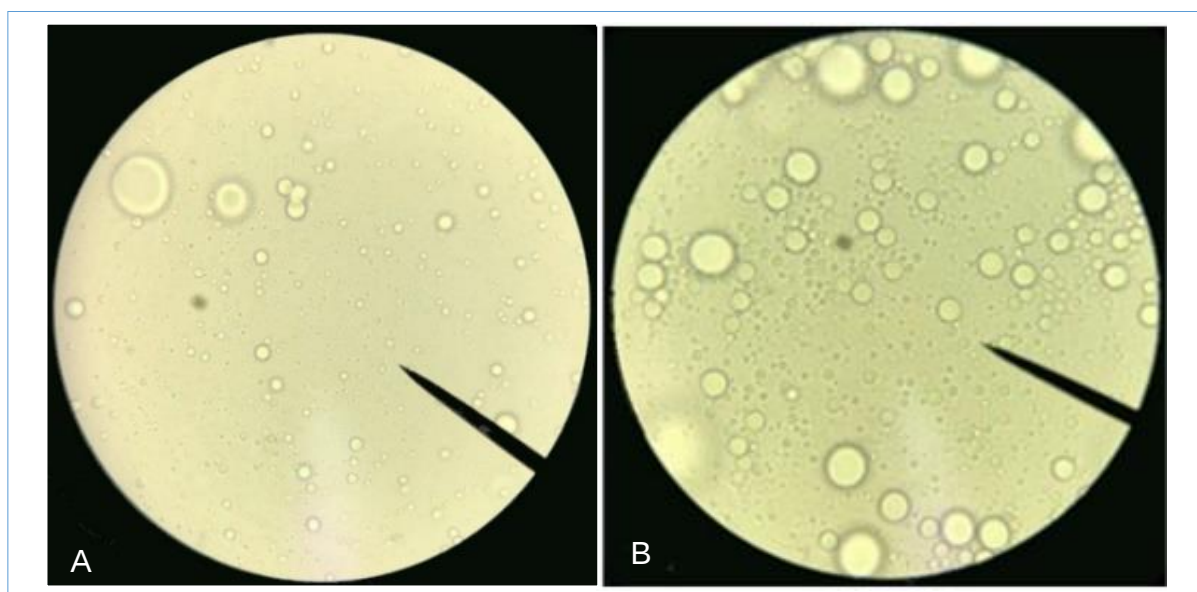
Visando retardar ou impedir a separação de fases optou-se pelo uso do homogeneizador/ triturador Turrax® TE-102 a 18.000 rpm por 10 minutos. Jiménez-Martín et al. (2015) utilizou um Ultraturax T-18 básico a 20.000 rpm por 10 minutos. Li et al. (2018) optaram pela rotação a 4.000 rpm por 3 minutos e Carneiro et al. (2013) utilizaram um Ultraturax MA-102 a 18.000 rpm por 5 minutos. A velocidade e o tempo variam conforme o material de parede e o ativo a ser revestido.

Padronizadas as técnicas por meio do estudo piloto, foi então realizado o experimento de produção das emulsões lipídicas, seguido da etapa de avaliação da estabilidade das emulsões e das microcápsulas formadas. As análises das emulsões

cujos resultados serão apresentados a seguir se deram conforme trabalho de Jiménez-Martín et al. (2015).

A figura 6 apresenta as imagens obtidas em microscópio óptico para observação das microestruturas nas diferentes concentrações de amido.

Figura 6 – Imagens obtidas em microscópio óptico em objetiva de imersão em óleo $\times 100$ de emulsões com diferentes concentrações de amido (0,5% e 1,0%).

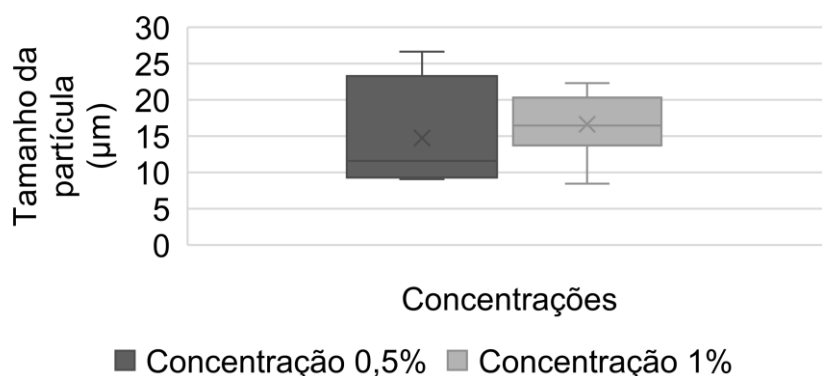


Fonte: autoria própria (2022). A: emulsão com amido a 0,5%; B: emulsão com amido a 1%.

Nota: Análise realizada em parceria com o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN) da UFMS.

As imagens das lâminas obtidas em triplicata foram analisadas após conversão de pixel para dpi (inc), utilizando a conversão interna do software ImageJ® para quantificar a área de cada gotícula formada expressa em μm , para comparação aos padrões da literatura e validação estatística. Em seguida, realizou-se a comparação dos tamanhos das gotículas nos dois produtos obtidos a partir das emulsões com amido a 0,5% e 1% respectivamente, a qual está representada no gráfico de *boxplot* a seguir (figura 7).

Figura 7 – *Boxplot* relacionado a área média das partículas nas concentrações a 0,5 e 1,0 % de amido.



Fonte: autoria própria (2022).

Com base nas imagens e no gráfico acima é possível verificar que a concentração a 1% apresentou menor variação entre seus dados, ainda que conte com pontos de variação mais evidentes de mínimos e máximos. Sua distribuição quartil foi mais homogênea, e o desvio se manteve muito próximo da mediana.

Em relação ao tamanho das microcápsulas, na concentração de amido a 0,5%, a média $\pm$ DP foi de $14,71 \pm 8,12$ (mín.=9,05 e máx.=26,6), com uma variância de 65,96 e um erro padrão de 4,06. Na concentração de amido a 1,0% a média $\pm$ DP foi de $16,61 \pm 4,64$ (mín.=8,44 e máx.=22,3), com variância de 21,52 e erro padrão de 1,75.

Ao comparar as médias dos tamanhos das partículas sob diferentes concentrações de amido conclui-se que não há diferença estatisticamente significativa entre elas ($t = 2,26$ e $p=0,63$ – $\mu_1 - \mu_2 \neq 0$ – rejeitado; $t = -1,83$ e $p=0,68$ – $\mu_1 - \mu_2 < 0$ – rejeitado; $t = 1,83$ e $p=0,31$ – $\mu_1 - \mu_2 > 0$ – rejeitado). Na análise de variâncias também não houve diferença com $F=3,06$.

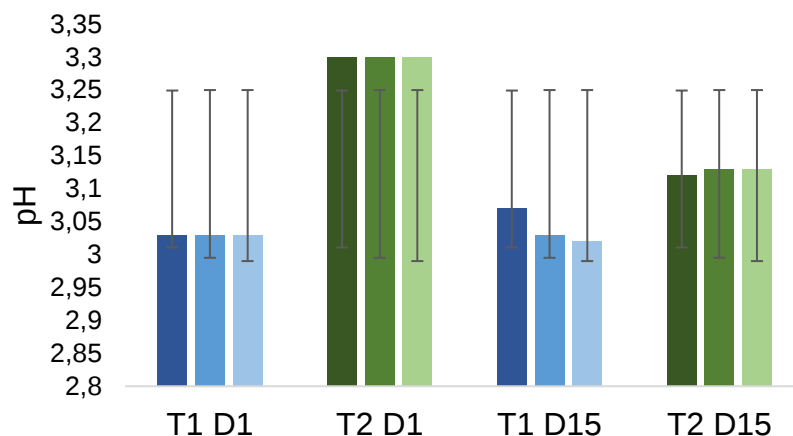
Carneiro et al. (2013) obtiveram emulsões com diâmetro de gotícula variando de 0,6 μm a 26 μm . Os autores utilizaram óleo de linhaça e observaram que o uso de diferentes materiais de parede teve influência significativa no tamanho das gotas nas emulsões. Os autores discutem que a emulsão preparada a partir da mistura de maltodextrina e goma arábica apresentou as menores gotículas e que este resultado pode estar relacionado à maior viscosidade apresentada pela emulsão, o que implica em maior resistência ao movimento das gotas, evitando coalescência e resultando em diâmetros menores.

Os valores encontrados no presente trabalho variaram entre 9,05 μm e 26,6 μm para a emulsão a 0,5%, e de 8,4 μm a 22,3 μm para a emulsão a 1%, atendendo aos padrões estabelecidos para o diâmetro das gotículas em emulsão em sistemas alimentares, que variam de 0,1 μm a 100 μm , segundo Bakry et al. (2016). O tamanho e a forma das microcápsulas dependem dos materiais da parede e dos métodos utilizados em seu preparo.

Outro ponto de análise foi o rendimento das emulsões nas diferentes concentrações do presente estudo (0,5% e 1,0% de amido) que foi, respectivamente, de 572,5 ml e 565,0 ml, com um total de sólidos de 90 g (0,15 g/ml ou 15%) e 94 g (0,17 g/ml ou 17%). Ambas as concentrações continham 2,57 g de EPA e 1,71 g de DHA. No trabalho de Carneiro et al. (2013), a concentração total de sólidos (material da parede + óleo) foi fixada em 30%.

Parâmetro importante na avaliação da estabilidade das emulsões, o pH foi medido nos dias 1 e 15, e os resultados são apresentados na figura 8.

Figura 8 – Evolução do pH avaliado em triplicata nos dias 1 e 15 nas emulsões com diferentes concentrações de amido (T1=0,5% e T2=1,0%) armazenadas à temperatura ambiente.



Fonte: autoria própria (2022).

Em azul: amostras em triplicata com concentração de amido a 0,5% nos tempos 1 e após 15 dias; Em verde: amostras em triplicata com concentração de amido a 1,0% nos tempos 1 e após 15 dias T1: amido a 0,5%; T2: amido a 1%; D1: dia 1; D15: após 15 dias armazenado a temperatura ambiente.

No trabalho de Jiménez-Martín et al. (2015), o pH de todas as emulsões primárias foi próximo de 6,54. Nas emulsões secundárias, de alimentação e reconstituída, foram encontradas diferenças significativas nos valores de pH (3,38 a 4,64). Os autores discutem que essas diferenças podem estar relacionadas com a

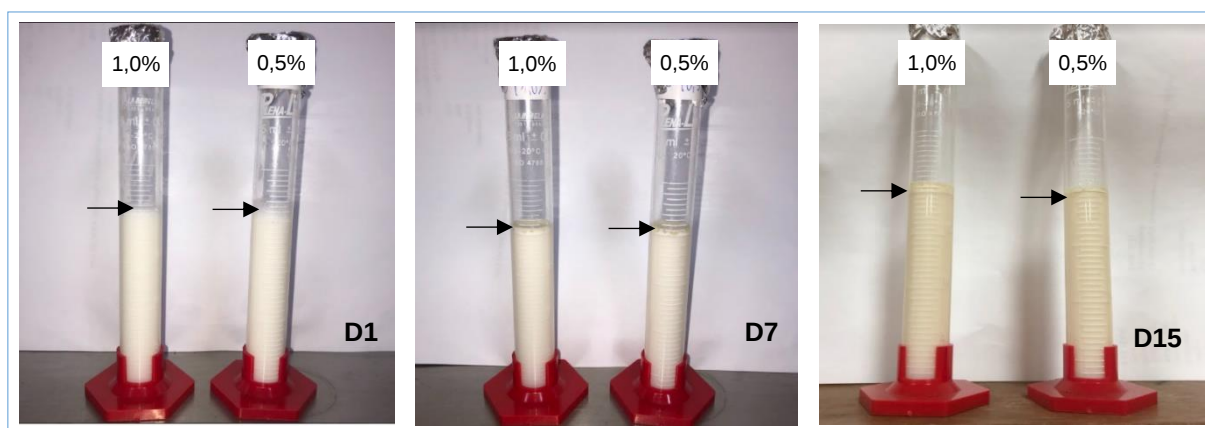
composição da emulsão, especificamente com a concentração de quitosana, pois os maiores valores de pH foram observados na emulsão com maior concentração de quitosana. A adição de quitosana pode ter ocasionado um efeito de desacidificação por meio do aumento da quantidade de grupos amino.

No presente trabalho, independentemente da concentração de amido (T1 a 0,5% ou T2 a 1,0%), o pH das soluções se manteve nas faixas de 3,02 a 3,3, e o tempo de armazenamento (D1 e D15) em temperatura ambiente não ocasionou grandes variações. Acredita-se que essa faixa de pH foi favorável à manutenção da estabilidade das emulsões.

Bakry et al. (2016) discutem que emulsões óleo-água apresentam como vantagens a relativa facilidade de preparação e baixo custo, mas têm como desvantagens a instabilidade física quando expostos a aquecimento, resfriamento, congelamento, secagem e pH extremos. Os autores revisaram estudos que trabalharam com pH variando de 2,5 a 5,9 a depender do material microencapsulado, constituintes de parede e método de encapsulação. O pH observado no presente estudo se encontra nessa faixa de pH, o que, provavelmente, foi um fator positivo.

O fenômeno de separação de fases não foi visualmente observado durante o armazenamento das emulsões sob temperatura ambiente por 15 dias. A estabilidade foi medida em função da porcentagem de separação (índice de creme – IC) e pôde-se observar estabilidade das emulsões, conforme figura 9.

Figura 9 – Avaliação da separação de fases e índice de cremeação para estudo da estabilidade das emulsões em diferentes concentrações de amido.



Fonte: autoria própria (2022). D1= 1º dia de armazenamento; D7= 7º dia de armazenamento; D15= 15º dia de armazenamento. 1,0% e 0,5% = concentração de amido. Camada de espuma na ponta da seta – se manteve constante durante o armazenamento.

No trabalho de Jiménez-Martín et al. (2015) o índice de formação de creme determinado nas emulsões de alimentação apresentou os mesmos valores entre os dias 1 e 7 e houve efeito significativo do tipo de emulsão sobre o IC com maior estabilidade para emulsões multicamadas produzidas com a combinação lecitina-quitosana. Os autores discutem que o IC está inversamente relacionado com a estabilidade das emulsões.

Carneiro et al. (2013), durante o estudo de estabilidade, observaram que as emulsões preparadas com proteína do soro do leite e maltodextrina apresentaram a formação de uma pequena camada de separação e uma fase de espuma, 24h após sua homogeneização. No presente trabalho observou-se uma pequena camada superficial de espuma (indicação na imagem – seta) imediatamente após a homogeneização e ela se manteve durante os dias subsequentes de armazenamento e não houve separação de fases. Algumas hipóteses para esse resultado positivo seria a rotação do homogeneizador em função do tempo (18.000 rpm por 10 minutos), o uso de reagentes como a lecitina e o amido e o pH ácido das emulsões.

Após coleta das amostras utilizadas nas fases citadas anteriormente, o volume resultante das emulsões nas duas concentrações de amido foi liofilizado conforme metodologia descrita na Fase II: Preparação de pós de óleo de peixe microencapsulado. De posse dos pós contendo as microcápsulas, realizou-se o experimento para simulação de um sistema de nutrição enteral e o estudo do tempo de corrida e volumes residuais do leite humano em 3 grupos distintos: Grupo controle (GC) = leite humano puro; Grupo positivo (GP) = leite humano acrescido de óleo de peixe; Grupo teste (GT) = leite humano acrescido de microcápsulas de óleo de peixe, onde GT1 continha amido a 0,5% e GT2 continha amido a 1%.

Utilizou-se 370mL de leite humano proveniente de doadora e os sistemas de alimentação foram montados com as referidas designações. Foi adicionado um volume inicial de 20mL em cada frasco correspondente aos grupos. Observou-se que um volume de 2mL sempre permanecia retido no frasco de dieta e que, efetivamente, o volume infundido era de 18 mL. O teste foi realizado em triplicata (A, B e C) e os resultados do controle de volume pós corrida no sistema e tempo estão apresentados nas tabelas 4 a 6.

Tabela 4 – Controle do volume de leite humano puro, acrescido de óleo de peixe e óleo de peixe microencapsulado em simulação de sistema de nutrição enteral.

Grupo	Rodada	Volume Final (mL)	Vol. final médio (média+DP)	Volume Retido (mL)	Vol. retido médio (média+DP)
GC	1	17	16,33±0,47	1	1,67±0,47
	2	16		2	
	3	16		2	
GP	1	12	13,33±0,94	6	4,67±0,94
	2	14		4	
	3	14		4	
GT1	1	14	15,33±1,24	4	2,67±1,24
	2	15		3	
	3	17		1	
GT2	1	15	16,00±0,81	3	2,00±0,81
	2	16		2	
	3	17		1	

Fonte: autoria própria (2022). GC: grupo controle – leite humano puro; GP: grupo positivo – leite humano adicionado de óleo de peixe; GT1: leite humano adicionado das microcápsulas com amido a 0,5%; GT2: leite humano adicionado das microcápsulas com amido a 1,0%.

Tabela 5 – Comparação entre os volumes médios após simulação em sistema de nutrição enteral.

Comparação entre grupos	Diferença de médias	P
GC x GP	3.000	0.045*
GC x GT1	1.000	0.702
GC x GT2	0.333	0.982
GT2 x GP	2.667	0.074
GT2 x GT1	0.667	0.882
GT1 x GP	2.000	0.205

Fonte: autoria própria (2022). GC: grupo controle – leite humano puro; GP: grupo positivo – leite humano adicionado de óleo de peixe; GT1: leite humano adicionado das microcápsulas com amido a 0,5%; GT2: leite humano adicionado das microcápsulas com amido a 1,0%. (*) indica diferença estatística significativa.

Tabela 6 – Avaliação do tempo médio de descida de leite humano puro, acrescido de óleo de peixe e óleo de peixe microencapsulado em simulação de sistema de nutrição enteral sem controle de gotejamento.

Grupo	Média de tempo (s)	Desvio Padrão (DP)	%CV	p
GC	19,31	10,34	65,54	p=0,977
GP	21,87	10,12	46,27	
GT1	21,52	5,25	24,44	
GT2	21,44	3,70	16,49	

Fonte: autoria própria (2022). GC: grupo controle – leite humano puro; GP: grupo positivo – leite humano adicionado de óleo de peixe; GT1: leite humano adicionado das microcápsulas com amido a 0,5%; GT2: leite humano adicionado das microcápsulas com amido a 1,0%.

A análise estatística evidenciou uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,043$) nos valores médios entre os grupos e essa diferença foi maior do que seria esperado ao acaso.

Ao se comparar os volumes médios dos grupos após simulação em sistema de nutrição enteral observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e positivo ($p=0.045$), o que sugere que a adição de óleo de peixe diretamente ao leite humano interfere no escoamento do mesmo pelo sistema e ocasiona perdas devido à retenção de maiores volumes nos tubos de alimentação.

Por outro lado, não houve diferença entre o grupo controle e aqueles adicionados das microcápsulas (T1 e T2, $p=0.702$ e $p=0.982$, respectivamente) em relação aos volumes médios após simulação no sistema de nutrição enteral, o que sugere que o pó das microcápsulas melhora a solubilidade do óleo de peixe. O comportamento dos grupos teste no sistema se assemelha ao do grupo controle, com ênfase ao GT2.

Também não houve diferença entre os grupos teste T1 e T2 ($p=0.882$) o que sugere que a concentração de amido não impactou significativamente na solubilidade do pó e no seu comportamento no sistema de nutrição enteral.

Em relação ao tempo de escoamento do leite humano no sistema de nutrição nos diferentes grupos, comparativamente, a mistura leite humano + óleo de peixe no GP apresentou maior tempo residual para corrida em equipo de alimentação enteral, com uma média de 21'87" e um coeficiente de variação superior a 40% em relação aos demais grupos.

Esses valores são sugestivos de que a presença do óleo de peixe aumentou a densidade do leite e consequentemente afetou o escoamento no sistema de nutrição, com volumes de 6mL, 4mL e 4mL retidos no sistema, após as baterias de testes consecutivas. Corroborando aos achados de Muller (2017) que atribuiu a presença do óleo em sua conformação original como elemento que retardou o tempo de corrida na sonda de alimentação.

Conforme era esperado, os grupos com adição de componentes ao leite humano (GP e GT) apresentaram um tempo diferente quando comparados ao grupo controle (leite puro). Assim como o GP, os grupos teste (T1 e T2) apresentaram uma maior média de tempo de descida em comparação ao grupo controle, o que era esperado em decorrência da adição do pó. Entretanto, o desvio padrão da média de tempo foi inferior ao grupo controle e o coeficiente de variação entre as amostras foi

inferior a 25%. Isso sugere que o pó contendo microcápsulas do óleo peixe melhora a sua solubilidade, o que também pode ser inferido ao se observar que os volumes residuais nestes grupos são inferiores ao grupo positivo. Porém, a análise estatística dos tempos médios de escoamento não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,977$).

Houve dificuldade para comparar os resultados obtidos na fase de simulação das condições de nutrição enteral com a literatura científica. Baack et al. (2016) administrou DHA por meio de seringas e tubos de gavagem ou diretamente por via oral. Gould et al. (2017) administraram uma emulsão enteral contendo 60 mg de DHA por kg de peso corporal por dia através do tubo de alimentação imediatamente antes da alimentação com leite. Já Robinson et al. (2016) trabalharam com a administração bucal de AGPI como método de suplementação em uma população de prematuros que dependia de emulsões lipídicas intravenosas.

Os referidos estudos objetivavam avaliar o impacto da suplementação com um ou mais AGPI sobre parâmetros de crescimento e neurodesenvolvimento das crianças suplementadas e não avaliaram possíveis perdas no sistema de administração do suplemento. Dando sequência ao trabalho de Muller (2017), um dos objetivos deste trabalho foi propor um método de administração de lipídios que melhorasse a entrega dos AGPI aos recém-nascido pré-termo em uso de dispositivos para nutrição enteral, especialmente daqueles da série ômega 3.

Baack et al. (2016) discute que os benefícios da suplementação lipídica parecem promissores, mas não são conclusivos dada a ampla variabilidade no desenho dos estudos e nos métodos de suplementação. Segundo Robinson et al. (2016) o melhor mecanismo de fornecer AGPI para prematuros precisa ser determinado e os suplementos devem ser fornecidos com relativa facilidade de administração, boa tolerabilidade e, idealmente, permanecer independentes do estado fisiológico do lactente e da capacidade de tolerar alimentação enteral.

Acredita-se que essa proposta seja inovadora no sentido de sugerir uma alternativa de incorporação de lipídeos ao leite humano, com ênfase aos AGPI ômega 3, seja de modo individual – nutriente único – ou compondo um aditivo multinutriente quando incorporado a aditivos homólogos do leite humano.

Fases subsequentes da pesquisa poderão quantificar e identificar o perfil de ácidos graxos incorporados nas microcápsulas, evidenciar a eficiência de encapsulação e o rendimento de microencapsulação, observar a atividade

antioxidante total assim como a estabilidade oxidativa e a estabilidade de armazenamento das microcápsulas com base nos valores de acidez e peróxido, além da observação da digestão *in vitro* de modo a permitir um conhecimento amplo que subsidie a correta dosagem e prescrição do aditivo (AGHBASHLO et al., 2012; CALVO et al., 2012; CARNEIRO et al., 2013; JIMÉNEZ-MARTÍN et al., 2015; LI et al., 2018; KANWAL et al., 2021).

Além disso, é importante evidenciar as principais limitações deste estudo como o acionamento manual do sistema de nutrição enteral; a utilização de cronômetro digital para determinação do tempo; o experimento não foi realizado às cegas; a necessidade de ajustes no cronograma e metodologia da pesquisa relacionados aos atrasos em decorrência da pandemia de COVID-19; às dificuldades relacionadas ao financiamento próprio da pesquisa e às limitações relacionadas a espaço físico e disponibilidade de equipamentos.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho desenvolveu e testou emulsões lipídicas que deram origem à microcápsulas contendo ácidos graxos poli-insaturados ômega-3.

As análises relacionadas à estabilidade das emulsões apresentaram resultados positivos. A concentração de amido a 1% parece ocasionar menor variação do tamanho das microcápsulas. O pH se manteve entre 3,02 a 3,3, independente da concentração de amido. A homogeneização a 18.000 rpm/ 10 min garantiu a mistura uniforme consistente.

A liofilização permitiu a secagem das emulsões e a obtenção de pó contendo as microcápsulas de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 e nas condições simuladas de nutrição enteral, o pó contendo microcápsulas parece melhorar a solubilidade do óleo de peixe.

Os resultados são promissores e abrem possibilidades de testes adicionais e estudos subsequentes para quantificação do óleo de peixe das microcápsulas e seu perfil de ácidos graxos.

O experimento se mostrou viável e exequível como uma alternativa para adição de lipídeos ao leite humano, em especial de ácidos graxos essenciais da série ômega 3. A tecnologia das microcápsulas poderá melhorar a oferta e a biodisponibilidade desses lipídeos aos recém-nascidos prematuros de baixo peso, permitindo seu acesso ao leite humano fortificado o que poderá impactar positivamente nas taxas de crescimento e desenvolvimento e interferir na morbimortalidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHBASHLO, M.; MOBLI, H.; RAFIEE, S.; MADADLOU, A. Optimization of emulsification procedure for mutual maximizing the encapsulation and exergy efficiencies of fish oil microencapsulation. **Powder Technology**. v.225, p.107-117, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2012.03.040>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591012002082>>. Acesso em: 22/11/2022.
- AMÂNCIO, O.M.S.; FISBERG, R.M.; MARCHIONI, D.M.L. Nutrição no primeiro ano de vida. In: SILVA, S.M.C.S.; MURA, J.D.P. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2013. c.20, p.371-399.
- ANDRADE, I. H. P.; CAMILLOTO, G. P.; CRUZ, R. S. Estudo prospectivo relativo à nanopartículas de amido. **Brazilian Applied Science**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 529-46, mar./abr. 2020. DOI: 10.34115/basrv4n2-010. Disponível em: <<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BASR/article/view/8251>>. Acesso em: 09/11/2021.
- ANDREAS, N.J.; KAMPMANN, B.; LE-DOARE, KM. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Human Development**. v.91, n.11, p.629-635, nov. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378378215001772>>. Acesso em: 02/11/2022.
- ANNAMALAI, J.; DUSHYANT C, K.; GUDIPATI, V. Oxidative Stability of Microencapsulated Fish Oil during Refrigerated Storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, Medford, v. 39, n.6, p. 1944–1955, dec. 2015. DOI: 10.1111/jfpp.12433. Disponível em: <<https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jfpp.12433>>. Acesso em: 02/11/2022.
- ARSLANOGLU, S.; BOQUIEN, C.Y.; KING, C.; LAMIREAU, D.; TONETTO, P.; BARNETT, D. et al. Fortification of Human Milk for Preterm Infants: Update and Recommendations of the European Milk Bank Association (EMBA) Working Group on Human Milk Fortification. **Frontiers in Pediatrics**. v.7, n.76, 2019. DOI: 10.3389/fped.2019.00076. ISSN=2296-2360. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2019.00076>>. Acesso em: 01/11/2022.
- BAACK, M.L.; PUUMALA, S.E.; MESSIER, S.E.; PRITCHETT, D.K.; W.S. Daily Enteral DHA Supplementation Alleviates Deficiency in Premature Infants. **Lipids**. v.51, n.4, p.423-433, Apr. 2016. DOI: 10.1007/s11745-016-4130-4. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4818658/>>. Acesso em: 01/11/2022.
- BAKRY, A. M.; ABBAS, S.; ALI, B.; MAJEED, H.; ABOUELWAFI, M.Y.; MOUSA, A.; LIANG, L. Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Medford, v.15, n. 1, p. 143–182, jan. 2016. DOI: 10.1111/1541-4337.12179. Disponível em: <<https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.12179>>. Acesso em: 09/11/2021.

BANSODE, S.S.; BANARJEE, S. K.; GAIKWAD, D. D.; JADHAV, S. L.; THORAT, R. M. Microencapsulation: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**. v.1, n.2, p.38-43, March – April 2010; Article 008. ISSN 0976 – 044X. Disponível em:

<<https://www.globalresearchonline.net/volume1issue2/Article%20008.pdf>>. Acesso em: 04/10/2022.

BASSO, R. Bioquímica e Metabolismo dos Lipídios. In: SILVA, S.M.C.S.; MURA, J.D.P. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2013. cap.3, p.55-74.

BERTON-CARABIN, C.C.; SAGIS, L.; SCHROËN, K. Formation, Structure, and Functionality of Interfacial Layers in Food Emulsions. **Annual Review of Food Science and Technology**. v.9, n.1, p. 551-587, 2018. DOI:

<https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012405>. Disponível em:

<<https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-food-030117-012405>>. Acesso em: 18/10/2022.

BERTON-CARABIN, C.; SCHROËN, K. Towards new food emulsions: designing the interface and beyond. **Current Opinion in Food Science**. v.27, p.74-81, Jun. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.06.006>. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221479931930013X>>. Acesso em: 18/10/2022.

BOQUIEN, C.Y. Human Milk: An Ideal Food for Nutrition of Preterm Newborn. **Frontiers in Pediatrics**. v.6, n.295, p.1-9, 2018. DOI:10.3389/fped.2018.00295.

Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2018.00295>>. Acesso em: 08/11/2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. Brasília, 2006. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2006/res0171_04_09_2006.html>. Acesso em: 09/11/2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Brasília: Anvisa, 2008. 160 p.

CALVO, P.; CASTAÑO, A.L.; LOZANO, M.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, D. Influence of the microencapsulation on the quality parameters and shelf-life of extra-virgin olive oil encapsulated in the presence of BHT and different capsule wall components. **Food Research International**. v.45, n.1, p.256-261, Jan. 2012. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.036>. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096399691100617X>>. Acesso em: 05/10/2022.

CALVO, P.; CASTAÑO, Á. L.; HERNÁNDEZ, M. T.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, D. Effects of microcapsule constitution on the quality of microencapsulated walnut oil.

European Journal of Lipid Science and Technology, Medford, v.113, n.10, p. 1273–1280, jun. 2011. DOI: 10.1002/ejlt.201100039. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ejlt.201100039>>. Acesso em: 05/10/2022.

CARNEIRO, H.C.F.; TONON, R.V.; GROSSO, C.R.F.; HUBINGER, M.D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v.115, n.4, p.443-451, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877412001756>>. Acesso em 18/11/2022.

CHARLES, A. L.; ABDILLAH, A. A.; SARASWATI, Y. R.; SRIDHAR, K.; BALDERAMOS, C.; MASITHAH, E. D.; ALAMSJAH, M. A. Characterization of freeze-dried microencapsulation tuna fish oil with arrowroot starch and maltodextrin. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 112, p. 106281, mar. 2021. DOI: doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106281. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X20313643>>. Acesso em 13/10/2022.

CORRÊA-FILHO, L.C.; MOLDÃO-MARTINS, M.; ALVES, V.D. Advances in the Application of Microcapsules as Carriers of Functional Compounds for Food Products. **Applied Sciences**, v.9, n.3, p.571, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/app9030571>. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3417/9/3/571/htm>>. Acesso em 12/10/2022.

DAEL, P.V. Role of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in human nutrition and health: review of recent studies and recommendations. **Nutr Res Pract**. v.15, n.2, p.137-159, apr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.4162/nrp.2021.15.2.137>. Disponível em: <<https://e-nrp.org/DOIx.php?id=10.4162/nrp.2021.15.2.137>>. Acesso em 16/11/2021.

DUTTA, S.; SINGH, B.; CHESSELL, L.; WILSON, J.; JANES, M.; MCDONALD, K.; SHAHID, S.; GARDNER, V.A.; HJARTARSON, A.; PURCHA, M.; WATSON, J.; BOER, C.; GAAL, B.; FUSCH, C. Guidelines for Feeding Very Low Birth Weight Infants. **Nutrients**, Basel, v.7, n.1, p.423-442, jan. 2015. DOI:10.3390/nu7010423. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25580815/>>. Acesso em 09/10/2022.

FANG, M.T.; CHATZIXIROU, E.; GRUMMER-STRAWN, L.; ENGMANN, C.; ISRAEL-BALLARD, K.; MANSEN, K.; O'CONNOR, D.L.; UNGER, S.; HERSON, M.; WEAVER, G.; BILLER-ANDORNO, N. Developing global guidance on human milk banking. **Bull World Health Organ**. v.99, n.12, p.892-900, Dec. 2021. DOI: 10.2471/BLT.21.286943. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8640695/>>. Acesso em: 09/11/2022.

FEFERBAUM, R.; FALCÃO, M.C.; ZAMBERLAN, P. Uso das recomendações nutricionais em recém-nascidos pré-termo. In: PHILIPPI, S.T.; AQUINO, R.C. **Recomendações nutricionais nos estágios de vida e nas doenças crônicas não transmissíveis**. Barueri: Manole, 2017. 1.ed. [Série Sban]. cap.11, p.209-222.

GAO, C.; MILLER, J.; MIDDLETON, P.F.; HUANG, Y.C.; MCPHEE, A.J.; GIBSON, R.A. Changes to breast milk fatty acid composition during storage, handling and processing: A systematic review. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v.146, p.1-10, jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2019.04.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952327819300146?via%3Dihub> >. Acesso em 16/11/2021.

GARWOLIŃSKA, D.; NAMIEŚNIK, J.; KOT-WASIK, A.; HEWELT-BELKA, W. Chemistry of Human Breast Milk—A Comprehensive Review of the Composition and Role of Milk Metabolites in Child Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.66, n.45, p.11881-11896, 2018. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b04031. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jafc.8b04031#>>. Acesso em: 02/11/2022.

GATES, A.; MARIN, T.; LEO, G.D.; STANSFIELD, B.K. Review of Preterm Human-Milk Nutrient Composition. **Nutrition in Clinical Practice**, v.36, n.6, p.1163-1172, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/ncp.10570>. Disponível em: <https://aspenjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ncp.10570>>. Acesso em 01/11/2022.

GEDDES, DT; GRIDNEVA, Z.; PERRELLA, SL; MITOULAS, LR; KENT, JC; STINSON, LF; LEI, CT; SAKALIDIS, V.; TWIGGER, A.-J.; HARTMANN, P.E. 25 Years of Research in Human Lactation: From Discovery to Translation. **Nutrients**, v.13, n.9, p.3071-3117, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13093071>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/9/3071/htm>>. Acesso em 03/11/2022.

GOULD, J.F.; COLOMBO, J.; COLLINS, C.T.; MAKRIDES, M.; HEWAWASAM, E.; SMITHERS, L.G. Assessing whether early attention of very preterm infants can be improved by an omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid intervention: a follow-up of a randomised controlled trial. **BMJ Open**. v.8, n.5, e020043, 2018. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-020043. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5988071/>>. Acesso em: 03/11/2022.

GRANCE, T. R. S.; SERAFIN, P. O.; THOMAZ, D. M. C.; PALHARES, D. B. Aditivo homólogo para a alimentação do recém-nascido pré-termo de muito baixo peso. **Revista Paulista de Pediatria**. São Paulo, v. 33, n. 1, jan./mar. 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rpp/a/9HHMFsnMzLHX4PJ7v3yYK/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em: 29/12/2021.

HAIR, A.B.; FERGUSON, J.; GROGAN, C.; KIM, J.H.; TAYLOR, S.N. Human milk fortification: the clinician and parent perspectives. **Pediatr Res**. v.88 (Suppl 1), p.25-29, Aug. 2020. DOI: 10.1038/s41390-020-1076-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32855509/>>. Acesso em: 29/12/2021.

HU, Y.T.; TING, Y.; HU, J.Y.; HSIEH, S.C. Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. **Journal of Food and Drug Analysis**. v.25, n.1, p.16-26, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.021>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949816301831>>. Acesso em 19/10/2022.

IRANPOUR, R.; KELISHADI, R.; BABAIE, S.; KHOSRAVI-DARANI, K.; FARAJIAN, S. Comparison of long chain polyunsaturated fatty acid content in human milk in preterm and term deliveries and its correlation with mothers' diet. **Journal of research in medical sciences**, Mumbai, v.18, n.1, p. 1–5, jan. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23901333/>>. Acesso em 02/11/2022.

JIMÉNEZ-MARTÍN, E.; GHARSALLAOUI, A.; PÉREZ-PALACIOS, T.; CARRASCAL, J.R.; ROJAS, T.A. Suitability of Using Monolayered and Multilayered Emulsions for Microencapsulation of ω -3 Fatty Acids by Spray Drying: Effect of Storage at Different Temperatures. **Food Bioprocess Technol.** v.8, p.100–111, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1382-y>. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-014-1382-y>>. Acesso em: 02/11/2022.

KANWAL, S.; REHMAN, MH-UR; HUSSAIN, A.; NADEEM, M.; ABBAS, F.; AKRAM, M. et al. Development of chitosan based microencapsulated spray dried powder of tuna fish oil: oil load impact and oxidative stability. **Brazilian Journal of Biology**. São Carlos, v. 84, p. 1-8, oct. 2021. DOI: 10.1590/1519-6984.254010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/bjb/a/4kN7qDzT8mD5NNwn6YbvccH/>>. Acesso em 02/11/2021.

KIM, J.H.; CHAN, C.S.; VAUCHER, Y.E.; STELLWAGEN, L.M. Challenges in the practice of human milk nutrition in the neonatal intensive care unit. **Early Human Development**. v.89, Sup.2, p.S35-S38, Oct. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2013.08.002>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378378213001916>>. Acesso em: 02/11/2021.

KIM, S.Y.; YI, D.Y. Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. **Clin Exp Pediatr**. v.63, n.8, p.301-309, Aug. 2020. DOI: 10.3345/cep.2020.00059. Disponível em: <<https://bwww.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7402982/>>. Acesso em: 08/11/2022.

KUS-YAMASHITA, M.M.M.; MANCINI-FILHO, J. Ácidos graxos. 2. ed. São Paulo: ILSI Brasil-International Life Sciences Institute do Brasil, 2017. v. 17. 40.p.

LI, X.; CAO, J.; BAI, X.; JIANG, Z.; SHEN, X. Optimization of Microencapsulation of Human Milk Fat Substitute by Response Surface Methodology. **J Oleo Sci.** v.67, n.4, p.407-417, Apr. 2018. DOI: 10.5650/jos.ess17226. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29526879/>>. Acesso em 25/10/2022.

LIU, Q.; HUANG, H.; CHEN, H.; LIN, J.; WANG, Q. Food-Grade Nanoemulsions: Preparation, Stability and Application in Encapsulation of Bioactive Compounds. **Molecules**. v.24, n.23, p.4242-4279, nov. 2019. DOI: 10.3390/molecules24234242. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6930561/>>. Acesso em 25/10/2022.

LUNA, M.S.; MARTIN, S.C.; GÓMEZ-DE-ORGAS, C.S. Human milk bank and personalized nutrition in the NICU: a narrative review. **Eur J Pediatr**. v.180, p.1327–1333, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00431-020-03887-y>. Disponível em: <

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00431-020-03887-y>>. Acesso em: 09/11/2022.

MALATAINS, A.; JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Structured biopolymerbased delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.25, n.8, p.1865-1880, dec. 2011. DOI:10.1016/j.foodhyd.2011.04.014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X11001263>>. Acesso em: 09/11/2022.

MENA, P.N. Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPICL): seus efeitos no recém-nascido pré-termo. In: PEREIRA et al. **Nutrição do recém-nascido pré-termo**. 1.ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2008. cap.6, p.69-79.

MULLER, KTC. Avaliação da suplementação de óleo de peixe (série ω -3) na alimentação de recém-nascidos pré-termo de muito-baixo-peso. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul [tese], 2017. 95p.

PARKER, M.G.; STELLWAGEN, L.M.; NOBLE, L.; KIM, J.H.; POINDEXTER, B.B.; PUOPOLO, K.M. Promoting Human Milk and Breastfeeding for the Very Low Birth Weight Infant. **Pediatrics**. v.148, n.5, p. e2021054272, nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.2021-054272>. Disponível em: <<https://publications.aap.org/pediatrics/article/148/5/e2021054272/181366/Promoting-Human-Milk-and-Breastfeeding-for-the>>. Acesso em 09/11/2022.

PELAEZ, N.; MORTIMER, F. Estudo da estabilidade de espuma com aplicação gastronômica elaborada a partir da Lecitina de Soja. **Food Ingredients Brasil**, n. 17, p. 55-56, 2011. Disponível em: <https://revista-fi.com/upload_arquivos/201606/2016060118060001465309044.pdf>. Acesso em: 22 set. 2021

PEREIRA, L.J.B.; GARCIA-ROJAS, E.E. Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos. **Ciência Rural** [online]. 2015, v. 45, n. 01, p. 155-162. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140315>. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140315>>. Acesso em: 14/10/2022. ISSN 1678-4596.

PREMKUMAR, M.H.; MASSIEU, L.A.; ANDERSON, D.M.; GOKULAKRISHNAN, G. Human Milk Supplements: Principles, Practices, and Current Controversies. **Clinics in Perinatology**. v.47, n.2, p.355-368, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clp.2020.02.001>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0095510820300130>>. Acesso em 15/10/2022.

PULIDO, A.; BERISTAIN, C. I. Encapsulación de ácido ascórbico mediante secado por aspersión, utilizando quitosano como material de pared. **Rev. Mex. Ing. Quím.** v. 9, n. 2, p. 189-195, México, ago. 2010. ISSN 1665-2738. Disponível em: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382010000200007&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 22/09/2021.

RAYYAN, M; ROMMEL, N; ALLEGAERT, K. The Fate of Fat: Pre-Exposure Fat Losses during Nasogastric Tube Feeding in Preterm Newborns. **Nutrients**, Basel,

v.7, n.8, p. 6213-6223. jul. 2015. DOI: 10.3390/nu7085279. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4555118/>>. Acesso em: 11/11/2022.

RENDÓN, G.M.; BÁEZ-GONZÁLEZ, J.; ALANÍS, G.; REGALADO, A.; GALINDO, S.; VERNON-CARTER, E.J. Eficiencia de encapsulación del aceite de linaza utilizando goma de Mezquite y quitosano como materiales de pared. In: **Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, 12., may. 2010, Guanajuato, Gto. Anais [...]. Guanajuato, 2010. Disponível em: <<https://www.academia.edu/25244344>>. Acesso em: 22/09/2021.

ROBINSON, D.T.; CAPLAN, M.; CARLSON, S.E.; YODER, R.; MURTHY, K.; FROST, B. Early docosahexaenoic and arachidonic acid supplementation in extremely-low-birth-weight infants. **Pediatr Res**. v.80, p.505–510, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/pr.2016.118>. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/pr2016118>>. Acesso em: 12/10/2022.

SANTORO, K.; MARTIN, C.R. Lipids and Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Preterm Infants. **Clin Perinatol**. v.49, p.381–391, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clp.2022.02.007>. Disponível em: <[https://www.perinatology.theclinics.com/article/S0095-5108\(22\)00021-5/fulltext#articleInformation](https://www.perinatology.theclinics.com/article/S0095-5108(22)00021-5/fulltext#articleInformation)>. Acesso em: 05/01/2023.

SHARMA, R.; BORAH, A. Prospect of microcapsules as a delivery system in food technology: A review. **The Pharma Innovation Journal**. v.10, n.5, p.182-191, 2021. DOI: <https://doi.org/10.22271/tpi.2021.v10.i5c.6195>. Disponível em: <<https://www.thepharmajournal.com/archives/2021/vol10issue5/PartC/10-4-160-839.pdf>>. Acesso em 12/10/2022.

SILVA, P.T.; FRIES, L.L.M.; MENEZES, C.R.; HOLKEM, A.T.; SCHWAN, C.L.; WIGMANN, É.F. et al. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural** [online]. v. 44, n. 7, p. 1304-1311, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>>. Acesso em 05/10/2022.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**. v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/71409126-Microencapsulacao-inovacao-em-diferentes-areas.html>>. Acesso em 10/10/2022.

TAN, C.; MCCLEMENTS, D.J. Application of Advanced Emulsion Technology in the Food Industry: A Review and Critical Evaluation. **Foods**. v.10, n.4. p. 812-837, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10040812>. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2304-8158/10/4/812/htm>>. Acesso em 13/10/2022.

TAYLOR, S.N. Solely human milk diets for preterm infants. **Seminars in Perinatology**. v.43, n.7, p.151-158, nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2019.06.006>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0146000519300849>>. Acesso em 13/10/2022.

THOMAZ, D. M. C.; SERAFIM, P. O.; PALHARES, D. B.; MELNIKOV, P.; VENHOFEN, L.; VARGAS, M. O. F. Comparação entre suplementos homólogos do

leite humano e um suplemento comercial para recém-nascidos de muito baixo peso. **J Pediatr.**, v. 88, n. 2, p. 119-124, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2223/JPED.2166>. Disponível em: < <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-623456> >. Acesso em 13/10/2022.

WENDEL, K.; PFEIFFER, H.C.V.; FUGELSETH, D.M.; NESTAAS, E.; DOMELLÖF, M.; SKÅLHEGG, B.S. et al. Effects of nutrition therapy on growth, inflammation and metabolism in immature infants: a study protocol of a double-blind randomized controlled trial (ImNuT). **BMC Pediatr.** v.21, n.19, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12887-020-02425-x>. Disponível em: <<https://bmcpediatr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12887-020-02425-x>>. Acesso em: 16/11/2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO recommendations on newborn health: guidelines approved by the WHO Guidelines Review Committee. Geneva: World Health Organization, 2017.

YUE, H.; QIU, B.; JIA, M.; LIU, J.; WANG, J.; HUANG, F.; XU, T. Development and optimization of spray-dried functional oil microcapsules: oxidation stability and release kinetics. **Food Science & Nutrition**, [s.l.], v. 8, n. 9, p. 4730-738, sep. 2020. DOI: 10.1002/fsn3.1684. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fsn3.1684>>. Acesso em 02/11/2022.

ZHU J.; LI, X.; LIU, L.; LI, Y.; QI, B.; JIANG, L. Preparation of spray-dried soybean oil body microcapsules using maltodextrin: effects of dextrose equivalence. **LWT – Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 154, [s.p.], jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112874>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643821020272>>. Acesso em: 27 dez. 2021.

ZIMMERMANN, P.; CURTIS, N. Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. **Journal of Infection**. v.81, n.1, p.17-47, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.01.023>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445320300633>>. Acesso em 02/11/2022.

APÊNDICE 1

Tabela 7: Exemplos de análises e técnicas aplicadas no processo de microencapsulação de óleos conforme literatura científica.

Título	Autoria	Revista	Local	Material	Técnicas	Análises
<i>Optimization of emulsification procedure for mutual maximizing the encapsulation and exergy efficiencies of fish oil microencapsulation</i>	Aghbashlo et al. (2012)	<i>Powder Technology</i>	Faculdade de Engenharia e Tecnologia Agrícola, Universidade de Teerã, Karaj, Irã; Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologias Químicas, Organização de Pesquisa Iraniana para Ciência e Tecnologia (IROST), Teerã, Irã.	Óleo de peixe; leite em pó desnatado.	<i>Spray drying</i>	1) Umidade 2) Tamanho de partícula: dispersão de luz estática 3) Densidade aparente 4) Eficiência de encapsulamento 5) Valor de peróxido 6) Microscopia eletrônica de varredura
<i>Influence of the microencapsulation on the quality parameters and shelf-life of extra-virgin olive oil encapsulated in the presence of BHT and different capsule wall components</i>	Calvo et al. (2012)	<i>Food Research International</i>	Instituto Tecnológico de Alimentação e Agricultura (INTAEX), Badajoz, Espanha.	Azeite extravirgem; Caseinato de sódio; BHT; Carboximetilcelulose; Maltodextrina; Lecitina.	Emulsificação + liofilização	1) Teor de óleo de superfície 2) Eficiência de microencapsulação 3) Extração de óleo a frio 4) Cromatografia gasosa 5) Atividade antioxidante total (método ABTS)

						6) Determinação cromatográfica de tocoferóis 7) Estabilidade oxidativa (Rancimat 743) 8) Umidade 9) Espectrofotometria de ultravioleta
<i>Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials</i>	Carneiro et al. (2013)	<i>Journal of Food Engineering</i>	UNICAMP	Óleo de linhaça; Maltodextrina; proteína do soro do leite; goma arábica; amidos modificados.	<i>Spray drying</i>	Emulsões: 1) Estabilidade: % de separação de fases 2) Viscosidade: curvas de fluxo de cisalhamento (reogramas) 3) Tamanho das gotículas: difração de luz a laser Pó: 1) Eficiência de encapsulamento (EE) 2) Umidade: gravimetria por secagem em estufa 3) Densidade aparente 4) Diâmetro médio: difração de luz laser

						5) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 6) Estabilidade oxidativa: valor de peróxido e cromatografia gasosa headspace
<i>Suitability of Using Monolayered and Multilayered Emulsions for Microencapsulation of ω-3 Fatty Acids by Spray Drying: Effect of Storage at Different Temperatures</i>	Jiménez-Martín et al. (2015)	<i>Food and Bioprocess Technology</i>	Faculdade de Ciências Veterinárias, Cáceres, Espanha; Universidade de Lyon, França; Universidade de Copenhagen, Dinamarca.	Óleo de peixe; Lecitina de soja; Quitosana; Maltodextrina.	<i>Spray drying</i>	Emulsões: 1) Observações microscópicas: microscópio óptico 2) Medição de pH 3) Índice de creme Pó: 1) Rendimento de Microencapsulação 2) Eficiência de microencapsulação 3) Umidade 4) Morfologia: Microscopia Eletrônica de Varredura 5) Ensaio de Oxidação Acelerada
<i>Optimization of Microencapsulation of Human Milk Fat Substitute by</i>	Li et al. (2018)	<i>Journal of Oleo Science</i>	Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos,	Óleo de soja, óleo de coco, óleo de milho, óleo de	<i>Spray drying</i>	1) Metodologia de superfície de resposta 2) eficiência de microencapsulação 3) Rendimento

<i>Response Surface Methodology</i>			Universidade de Hainan, China	girassol e óleo de peixe; Soro do leite; Maltodextrina; Lecitina de soja;		4) Conteúdo de umidade e cinzas 5) Solubilidade 6) Microscopia eletrônica de varredura 7) Espectroscopia infravermelha 8) Estabilidade de armazenamento de microcápsulas: valor de acidez; valor de peróxido 9) Digestão <i>in vitro</i>
<i>Development of chitosan based microencapsulated spray dried powder of tuna fish oil: oil load impact and oxidative stability</i>	Kanwal et al. (2021)	<i>Brazilian Journal of Biology</i>	Universidade de Ciências Veterinárias e Animais, Paquistão.	Óleo de peixe; Quitosana; Maltodextrina.	<i>Spray drying</i>	Emulsões: 1) Porcentagem de separação Pó: 1) Teor de umidade: gravimetria 2) Molhabilidade 3) Solubilidade 4) Higrscopicidade 5) Densidade compactada em massa 6) Óleo total e retenção de óleo 7) Estabilidade oxidativa: Valor de

						peróxido (PV); valor de anisidina; teor de tocoferol
--	--	--	--	--	--	--

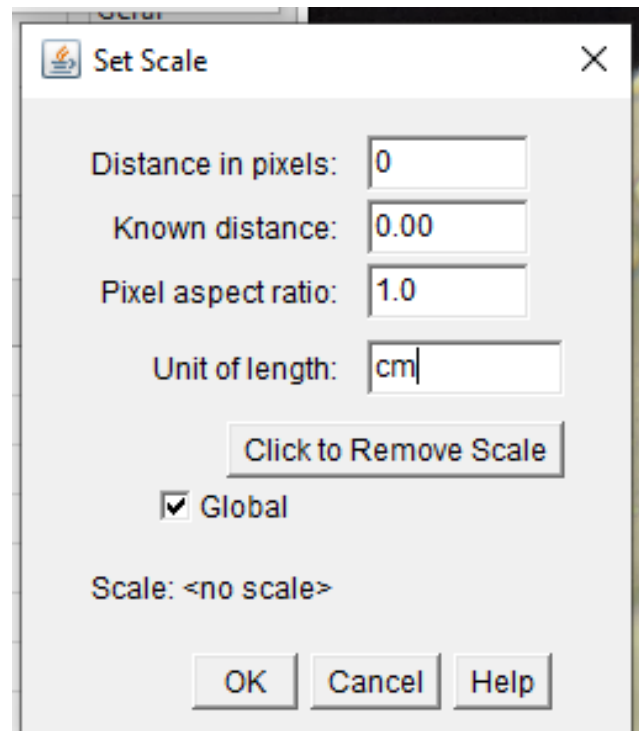
Fonte: autoria própria (2023).

APEÊNDICE 2

Fluxograma: Tratamento das Imagens obtidas na Microscópicas óptica utilizando o Image J ®

Escala (dpi >> cm)

Analyze > set scale > cm > global



Escala de cinza

Image > type > 8 bits

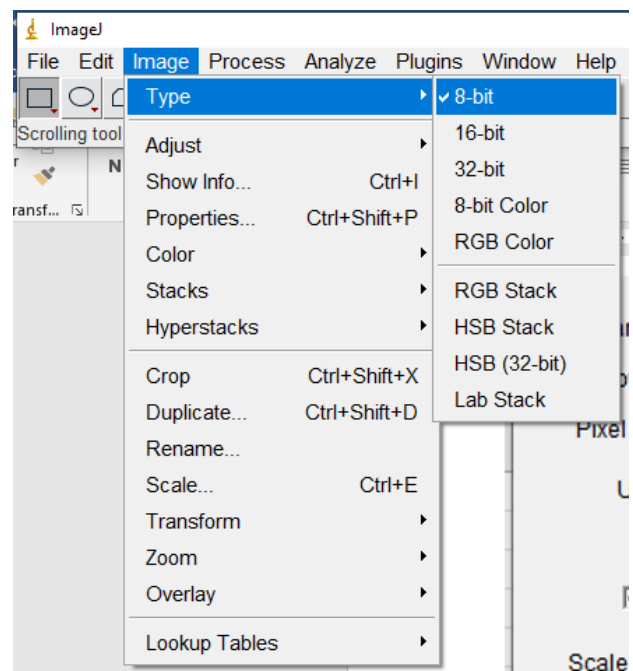
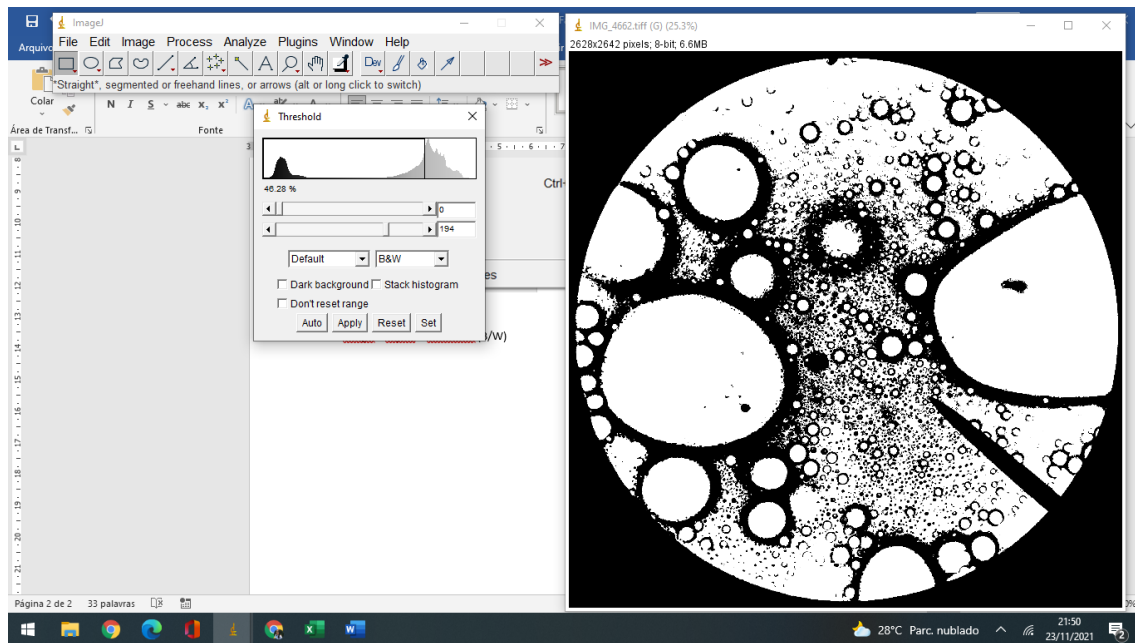


Image > adjust > threshold (B/W)



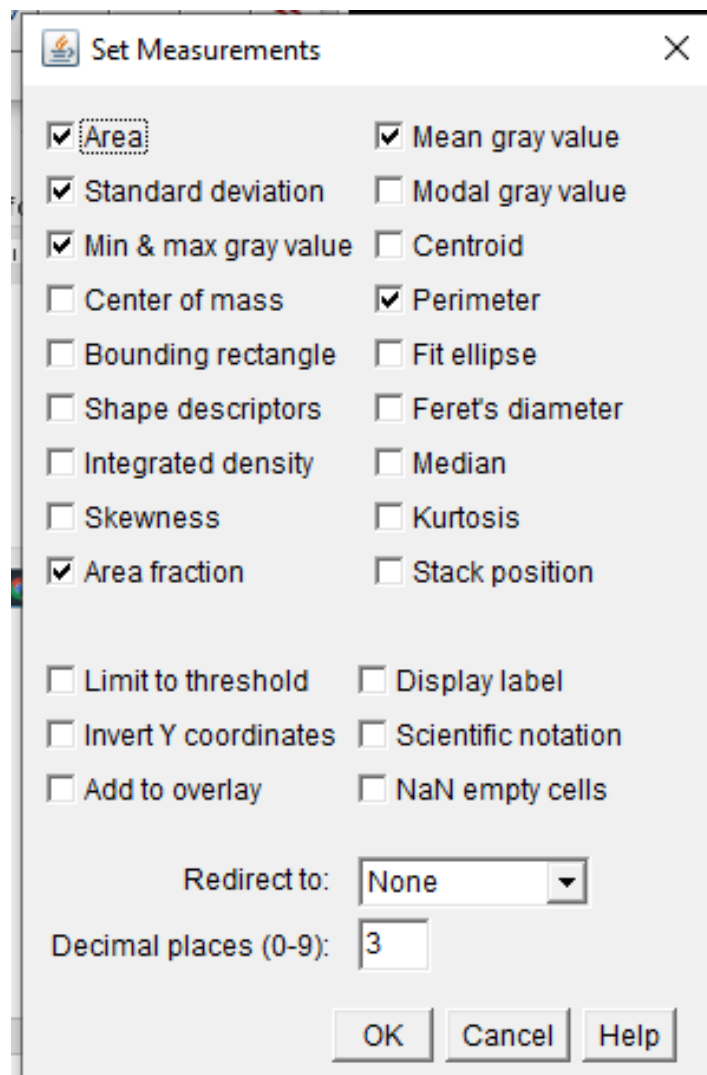
*camadas

Definição de medidas

Analyze > set measurement
> escolha opções

Redirect to: none

Decimal place: 3



Marcação das Imagens

Analyze > tool > ROI manage (deixar janela aberta)

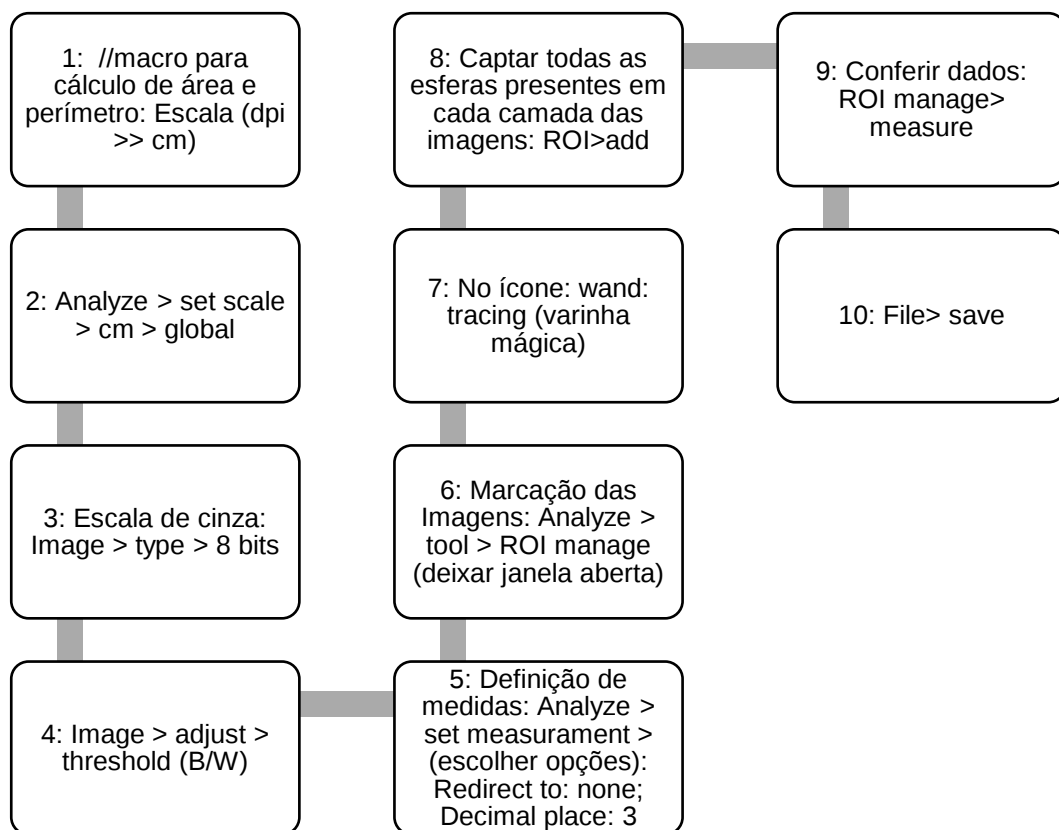
- Ícone: wand: tracing (varinha mágica)

Captar todas as esferas presentes em cada camada das imagens: ROI>add

Conferir dados: ROI manage> measure

File> save

Passo-a-passo para análise do tamanho das partículas:



Fonte: autoria própria (2023).

APÊNDICE 3

DOI: <http://dx.doi.org/10.20435/multi.v27i66.3618>

Recebido em: 18/01/2022; aprovado para publicação em: 02/05/2022

Estabilidade de emulsões lipídicas ricas em ômega-3 para preparo de microcápsulas para aditivo de leite humano para recém-nascidos prematuros

Stability of omega-3 rich lipid emulsions for preparing microcapsules for human milk additive for premature newborns

Estabilidad de emulsiones lipídicas ricas en omega-3 para la preparación de microcápsulas de aditivo de leche materna para recién nacidos prematuros

Teresa Cristina Abranches Rosa¹

Karla Rejane de Andrade Porto²

Márcio Olívio Figueiredo Vargas³

Durval Batista Palhares⁴

¹ Mestrado em Metabolismo e Nutrição pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Especialização pelo Programa de Residência Multiprofissional em Saúde da UFMS. Graduação em Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Nutricionista na UFMS. E-mail: teresacristinaar@yahoo.com.br, Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-9990-6560>

² Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade pela Rede Pró-Centro-Oeste (UFMS/UnB/UFMG/UCDB). Mestrado em Química e Biotecnologia, e graduação em Nutrição pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Pesquisador e orientador de PIBIC e pós-graduação. Coordena o curso de Nutrição da Faculdade Mato Grosso do Sul (FACSUL). E-mail: portokra@gmail.com, Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-6309-8696>

³ Graduação em Química pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Lotado na Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública (UTASP), na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), na UFMS. E-mail: marcio.vargas@ufms.br, Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-5861-3198>

⁴ Pós-Doutoramento na Case Western Reserve University (RBCH). Doutorado e mestrado em Pediatria pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto na Universidade de São Paulo (USP). Graduação em Medicina pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Professor titular da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), e da Faculdade de Medicina (FAMED). Orientador de mestrado e doutorado na UFMS. E-mail: dbpalhares@hotmail.com, Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-4300-6125>

Teresa Cristina Abranches ROSA; Karla Rejane de Andrade PORTO; Márcio Olívio Figueiredo
VARGAS; Durval Batista PALHARES

Resumo: Leite humano é o alimento de escolha para prematuros de baixo peso, mas seu processamento e administração ocasiona perdas nutricionais. Estudos vêm propondo aditivos do leite humano, e o desafio é buscar técnicas para uma eficaz suplementação de lipídeos, com ênfase no ômega-3, devido a sua importância no desenvolvimento neurológico e integridade celular. O objetivo foi desenvolver e testar emulsões contendo óleo fonte de ômega-3 para fabricação de microcápsulas para adição em leite humano. O estudo experimental utilizou óleo de peixe, lecitina de soja como emulsificante e amido e maltodextrina como materiais de parede com posterior liofilização para produção de pós das microcápsulas. As análises da estabilidade e das características do produto apresentaram resultados positivos, sendo alternativa viável de adição de lipídeos ao leite humano. Futuras análises permitirão o estudo do comportamento do produto acrescido ao leite humano e subsidiarão pesquisas sobre aditivos ao leite humano para crianças em vulnerabilidade.

Palavras-chave: prematuridade neonatal; cápsulas; nutrição do lactente; baixo peso ao nascer; tecnologia de alimentos.

Abstract: Human milk is the food of choice for low birth weight preterms, but its processing and administration lead to nutritional losses. Studies have been proposing human milk additives, and the challenge is to seek techniques for effective lipid supplementation, with emphasis on omega-3, due to its importance in neurological development and cell integrity. The objective was to develop and test emulsions containing omega-3 source oil to microcapsules manufacture for addition to human milk. The experimental study used fish oil, soy lecithin as emulsifier, and starch and maltodextrin as wall materials with subsequent lyophilization for the production of powders from the microcapsules. The stability and characteristics analyzes of the product showed positive results, being a viable alternative for the addition of lipids to human milk. Future analyzes will allow the study of the behavior of the product added to human milk and will subsidize research on human milk additives for vulnerable children.

Keywords: neonatal prematurity; capsules; nursing nutrition; low birth weight; food technology.

Resumen: La leche materna es el alimento de elección para prematuros de bajo peso, pero su procesamiento y administración provocan pérdidas nutricionales. Estudios vienen proponiendo aditivos para la leche materna, y el desafío es buscar técnicas para la suplementación lipídica eficaz, con énfasis en el omega-3, debido a su importancia en el desarrollo neurológico e integridad celular. El objetivo era desarrollar y probar emulsiones que contienen omega-3 para la fabricación de microcápsulas para adición a la leche materna. El estudio experimental utilizó aceite de pescado, lecitina de soja como emulsionante y almidón y maltodextrina como materiales de pared con posterior liofilización para la producción de las microcápsulas. Los análisis de estabilidad y características del producto arrojaron resultados positivos, siendo alternativa viable para la adición de lípidos a la leche materna. Los análisis futuros permitirán estudiar el comportamiento del producto agregado a la leche materna y subsidiarán la investigación sobre aditivos para niños vulnerables.

Palabras clave: recién nacido prematuro; cápsulas; nutrición del lactante; recién nacido de bajo peso; tecnología de alimentos.

Estabilidade de emulsões lipídicas ricas em ômega-3 para preparo de microcápsulas para aditivo de leite humano para recém-nascidos prematuros

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que mais de 20 milhões de crianças nasçam com baixo peso a cada ano e que esta condição esteja relacionada ao parto prematuro, aquele que ocorre antes de 37 semanas completas de gestação e acomete cerca de 340 mil neonatos por ano no Brasil. Tais situações colocam os lactentes em maior risco de atraso ou prejuízos no crescimento e desenvolvimento, maior propensão a doenças infecciosas e até mesmo risco de morte durante a infância. Desta forma, a implementação de cuidados apropriados, incluindo a alimentação, pode reduzir substancialmente a morbimortalidade neste grupo altamente vulnerável.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que esses lactentes, incluindo aqueles com muito baixo peso ao nascer (<1500 g), sejam alimentados preferencialmente com o próprio leite materno. Diante da impossibilidade, recomenda-se que sejam alimentados com leite humano proveniente de bancos de leite.

Os bancos de leite humano desempenham um papel fundamental na captação, no manejo e na distribuição do leite humano. Contudo, os procedimentos necessários realizados durante o processamento até a distribuição do leite humano pasteurizado às crianças não são isentos de perdas.

Embora estudos venham sendo desenvolvidos visando propor aditivos do leite humano, como é o caso do suplemento comercial FM85®, de suplementos homólogos ao leite humano e da adição de ácidos graxos da série ômega-3 diretamente ao leite humano, a técnica da nutrição enteral e os dispositivos utilizados na administração estão relacionados a uma diminuição do conteúdo final de lipídeos, devido à interação química e adesão ao equipo e à sonda nasogástrica e aos processos de oxidação.

O desafio agora é buscar técnicas que permitam uma eficaz suplementação de lipídeos, com ênfase nos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), em especial nos componentes da série ômega-3, devido a sua importância no desenvolvimento neurológico e na integridade celular dessas crianças.

Neste sentido, surgem como alternativa os processos de encapsulação de lipídeos, visando melhorar sua estabilidade em solução e biodisponibilidade. A microencapsulação de óleos ricos em ômega-3 apresenta-se como uma alternativa para aumentar sua estabilidade físico-química, principalmente

Teresa Cristina Abranches ROSA; Karla Rejane de Andrade PORTO; Márcio Olívio Figueiredo
VARGAS; Durval Batista PALHARES

a fim de evitar reações de oxidação, bem como facilitar sua incorporação em diversos tipos de preparações alimentares e, ainda, com potencial para melhorar a biodisponibilidade.

Assim, surge a presente proposta com o objetivo de desenvolver e testar emulsões lipídicas contendo óleo de peixe, fonte de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, para fabricação de microcápsulas para adição em leite humano a ser utilizado, posteriormente, na alimentação de recém-nascidos prematuros.

Espera-se, com a presente proposta, fornecer uma metodologia viável, de baixo custo e exequível para enriquecimento do leite humano com lipídeos, dando ênfase nos ácidos graxos ômega-3, de modo a garantir biodisponibilidade e reduzindo perdas mediante processo de microencapsulação.

2 METODOLOGIA

Trata-se de estudo experimental para fabricação de microcápsulas contendo fonte de ácidos graxos ômega-3 sob a forma de óleo. Anteriormente à execução das preparações das microcápsulas, foram estimadas as necessidades energéticas, tendo como base um neonato de 1,5 kg e a demanda energética média de 75 kcal/kg/dia, totalizando 112,5 kcal/dia, contemplando de 1,5 a 5,25 g/dia de lipídeos (1,0 a 3,5 g/kg/dia), dos quais 10% sob a forma de ácidos graxos poli-insaturados. Consideraram-se ainda as *Dietary reference intakes* (DRIs) para o ômega-3, prevendo-se 0,5 g/dia (AMÂNCIO; FISBERG; MARCHIONI, 2013), e que o suplemento de óleo de peixe em cápsulas adquirido no comércio local fornecia 540 mg de ácido eicosapentaenoico (EPA) e 360 mg de ácido docosahexaenoico (DHA), na porção de 4,2 g (3 cápsulas), ou seja, 0,12 g de EPA e 0,086 g de DHA por grama de produto.

O preparado das emulsões, base das microcápsulas, envolveu a incorporação de óleo de peixe em lecitina de soja como emulsificante para aumento do perfil hidrofílico do óleo, e do amido e da maltodextrina como material de parede. Após a obtenção da solução final, foram realizados estudos sobre a estabilidade das emulsões contendo ácidos graxos ômega-3 e das características das microcápsulas formadas. A metodologia foi adaptada de Jiménez-Martín *et al.* (2015), e cada etapa do preparo dos pós será descrita a seguir:

Estabilidade de emulsões lipídicas ricas em ômega-3 para preparo de microcápsulas para aditivo de leite humano para recém-nascidos prematuros

3 FASE I: PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES CONTENDO ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3

2.1 Emulsões Primárias

As emulsões foram preparadas no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (LDTI) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Conforme mencionado anteriormente, a fonte lipídica foi emulsionada em lecitina na proporção de 3:1 p/v por agitação magnética. Em seguida, adicionada à solução de ácido acético a 1%, no volume de 100 vezes o volume do óleo de peixe; então, homogeneizada a 18.000 rpm por 10 minutos, utilizando-se um homogeneizador/triturador Turrtec® TE-102 conforme Figura 1, formando a primeira camada denominada monocamada (MO).

Figura 1 – Aparelho homogeneizador/triturador e processo de homogeneização de óleo de peixe rico em ômega-3 com lecitina de soja como emulsificante na presença de ácido acético a 1%



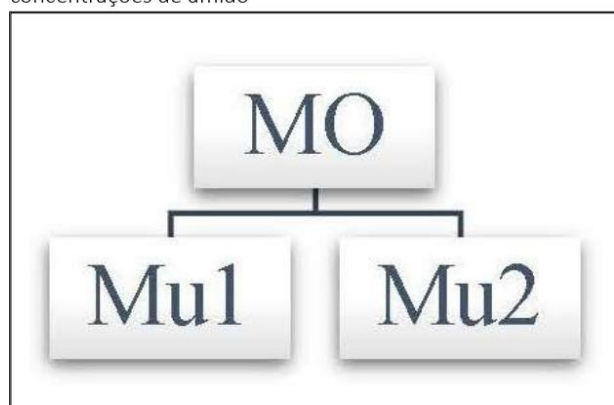
Fonte: Autoria própria.

Teresa Cristina Abranches ROSA; Karla Rejane de Andrade PORTO; Márcio Olívio Figueiredo
VARGAS; Durval Batista PALHARES

2.2 Emulsões Secundárias (Mu):

A partir das emulsões primárias, foram preparados dois tipos de emulsões secundárias segundo a concentração do revestimento de amido, identificadas como emulsões multicamadas (Mu1 e Mu2) nas concentrações de 0,5% e 1% (m/m), em solução de ácido acético a 1% (Figura 2).

Figura 2 – Preparo das emulsões multicamadas com diferentes concentrações de amido



Mo: Emulsões Monocamadas; Mu1 – Emulsão Multicamada com 0,5% de amido; Mu2 – Emulsão Multicamada com 1,0% de amido.

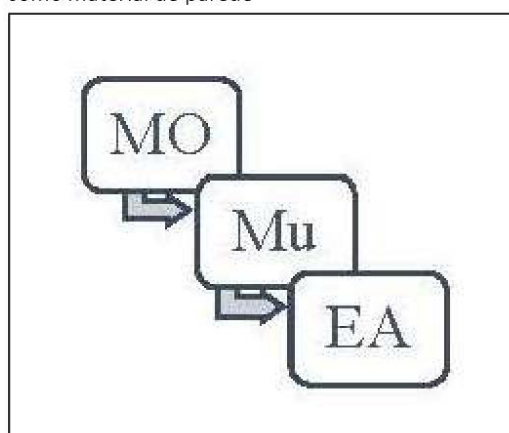
Fonte: Autoria própria.

2.3 Emulsões de Alimentação (EA):

Em separado, ao conteúdo da Mu1 e da Mu2 foi adicionada a solução de maltodextrina a 30% p/p, diluída em ácido acético 1% (Figura 3).

Estabilidade de emulsões lipídicas ricas em ômega-3 para preparo de microcápsulas para aditivo de leite humano para recém-nascidos prematuros

Figura 3 – Representação da etapa sequencial do preparo da emulsão de alimentação com maltodextrina como material de parede



MO – Emulsão Monocamada; Mu – Emulsões Multicamadas;
EA – Emulsões de Alimentação.

Fonte: Autoria própria.

2.4 Caracterização e avaliação da estabilidade das emulsões:

Imediatamente após a produção, as emulsões foram mantidas sob agitação suave para manter a homogeneidade, e, em seguida, uma gota de amostra foi coletada com uma pipeta Pasteur, colocada em uma lâmina de microscópio e coberta por uma lamínula. As lâminas foram preparadas em triplicata para cada solução, nas diferentes concentrações de amido (0,5% e 1,0%), e observadas em microscópio óptico para a avaliação das microestruturas e emulsões reconstituídas por meio de uma objetiva de imersão em óleo 10 × 100. As imagens foram capturadas utilizando-se uma câmera digital.

Posteriormente, as imagens foram analisadas utilizando-se o *software* livre ImageJ® para estudo da morfologia e quantificação da área das microcápsulas. As análises das médias obtidas nas diferentes concentrações

Teresa Cristina Abranches ROSA; Karla Rejane de Andrade PORTO; Márcio Olívio Figueiredo
VARGAS; Durval Batista PALHARES

foram submetidas à análise de variância – ANOVA e pós-teste de Tukey ao nível de significância de 5% utilizando o *software* RStudio.

Utilizando um medidor de pH de bancada (Hanna Instrumentos® mod. pH21) (Figura 4), foi realizada a verificação do pH nas triplicatas de cada emulsão preparada logo após a produção e passados 15 dias em armazenamento em temperatura ambiente.

Figura 4: Medidor de pH de bancada (Hanna Instrumentos® mod. pH 21)



Fonte: Autoria própria.

Para teste da estabilidade das emulsões nas diferentes concentrações de amido, um volume fixo de 20 ml foi transferido para provetas graduadas de vidro, devidamente seladas e armazenadas por 15 dias em temperatura ambiente.

Estabilidade de emulsões lipídicas ricas em ômega-3 para preparo de microcápsulas para aditivo de leite humano para recém-nascidos prematuros

As emulsões armazenadas foram avaliadas quanto à separação de fases do dia 1 até o décimo quinto dia. A estabilidade foi medida em função da porcentagem de separação e expressa segundo o índice de cremeação descrito pela equação: $IC (\%) = (H/H_0) \times 100$, em que: H_0 representa a altura inicial da fase inferior e H representa a altura inicial da fase superior após 24 horas (CARNEIRO *et al.*, 2013).

3 FASE II: PREPARAÇÃO DE PÓS DE MICROCÁPSULAS CONTENDO ÓLEO DE PEIXE RICO EM ÔMEGA-3

As emulsões foram separadas em volumes fixos, acomodadas em tubos Falcon com capacidade de 50 ml e armazenadas em ultrafreezer a -80°C . Posteriormente, foram submetidas à secagem por liofilização em parceria com o Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB) da UFMS, utilizando-se o aparelho *Vacuum Pump* RZ 2.5 (VACUUBRAND®) para produção dos pós.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dada a prevalência de prematuridade e baixo peso ao nascer (CARVALHO *et al.*, 2021) e a necessidade frequente de oferta de leite humano oriundo de bancos, vários estudos vêm sendo desenvolvidos visando propor aditivos do leite humano, como é o caso do suplemento comercial FM85®, de suplementos homólogos ao leite humano e adição de ácidos graxos da série ômega-3 (PALHARES *et al.*, 2012; THOMAZ *et al.*, 2012; GRANCE *et al.*, 2015; MULLER, 2017); contudo, a técnica da nutrição enteral e os dispositivos utilizados na administração estão relacionados a uma diminuição do conteúdo final de lipídeos, devido à interação química e adesão ao equipo e à sonda nasogástrica e aos processos de oxidação (RAYYAN; ROMMEL; ALLEGAERT, 2015; MULLER, 2017).

Neste sentido, recentemente, as atenções têm sido voltadas para o desenvolvimento de substitutos lipídicos para o leite materno, a fim de garantir e melhorar a saúde infantil. Estes substitutos da gordura do leite humano podem ser feitos de várias fontes, e os experimentos têm utilizado óleo de soja, óleo de palma, óleo de canola e outros óleos básicos. No

Teresa Cristina Abranches ROSA; Karla Rejane de Andrade PORTO; Márcio Olívio Figueiredo
VARGAS; Durval Batista PALHARES

entanto, os substitutos de lipídeos são, na verdade, derivados de óleos e, portanto, sujeitos à oxidação, à baixa palatabilidade, à dificuldade de se armazenar e transportar; portanto, sua preparação deve ser idealmente entregue na forma microencapsulada (LI *et al.*, 2018).

Os lipídeos são quimicamente instáveis e suscetíveis à deterioração oxidativa e perda de compostos voláteis, especialmente quando expostos a oxigênio, luz e umidade, o que acaba por afetar a qualidade de produtos fortificados com óleos, exercendo um efeito negativo na estabilidade de prateleira, nas propriedades sensoriais e na aceitabilidade geral dos produtos desenvolvidos. Assim, para desenvolver produtos contendo óleos marinhos, vegetais ou essenciais, a tecnologia de microencapsulação pode ser uma opção viável para manter suas características biológicas e funcionais (BAKRY *et al.*, 2016).

A tecnologia da microencapsulação é um processo em que minúsculas esferas de materiais bioativos, como os lipídios, são rodeadas por um revestimento ou parede de filme solúvel para formar microcápsulas (LI *et al.*, 2018). Pode ser utilizado para envolver substância sólida, líquida ou gasosa em uma cápsula selada muito pequena – microcápsula. O material do núcleo é gradualmente difundido por meio das paredes da cápsula, oferecendo propriedades de liberação controlada sob as condições desejadas, o que faz com que a tecnologia de microencapsulação seja utilizada com componentes bioativos, melhorando suas propriedades de manuseio (BAKRY *et al.*, 2016).

A seleção do material de revestimento para microencapsulação é uma etapa crucial. Polissacarídeos, proteínas e lipídeos são comumente usados na formação de camadas ao redor de óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados (KANWAL *et al.*, 2021), como é o caso do óleo de peixe, fonte de ômega-3, escolhido no presente trabalho.

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura sobre microencapsulação de óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados usa óleo de peixe como material ativo (CARNEIRO *et al.*, 2013). A escolha do óleo de peixe, no presente estudo, justifica-se pelo fato de ele ser fonte de ácidos graxos essenciais, incluindo o ômega-3, cujos benefícios à saúde estão bem documentados na literatura. Eles desempenham um possível papel

Estabilidade de emulsões lipídicas ricas em ômega-3 para preparo de microcápsulas para aditivo de leite humano para recém-nascidos prematuros

no desenvolvimento fetal, na primeira infância e na melhora da cognição; têm efeitos anti-inflamatórios e fornecem proteção contra vários cânceres; têm função estrutural no tecido sensorial e da retina vascular, dentre outros. Porém, os principais obstáculos associados à incorporação de óleo de peixe em produtos alimentícios são a insolubilidade na água, a suscetibilidade dos ácidos graxos poli-insaturados à deterioração oxidativa e o desenvolvimento de odor e sabor rançosos indesejáveis. Assim, a utilização de óleo de peixe em sistemas alimentares aquosos pode ser melhorada usando tecnologia de encapsulamento, objeto do presente trabalho (BAKRY *et al.*, 2016).

A microencapsulação de lipídios requer uma base aquosa como material de parede, e, como os lipídios e a água são imiscíveis, um emulsificante apropriado precisa ser adicionado para que a fase lipídica possa ser distribuída de maneira estável e uniforme no filme aquoso. A lecitina de soja é um emulsificante amplamente utilizado, com efeito notável, e foi o agente emulsificante de escolha no presente estudo, assim como na pesquisa de Li *et al.* (2018), a qual mostrou outros óleos para teste, além do óleo de peixe. Porém, outras substâncias podem ser empregadas como agente emulsificante, a depender do interesse e da aplicabilidade do produto.

As emulsões são utilizadas em uma ampla variedade de produtos alimentícios e farmacêuticos, e a tecnologia de emulsificação é uma etapa fundamental na microencapsulação de óleos. Geralmente, são preparadas utilizando-se um dispositivo mecânico conhecido como homogeneizador (misturador de alto cisalhamento, homogeneizador de alta pressão, moinho coloidal, sonicador ou homogeneizador de membrana) (BAKRY *et al.*, 2016). No presente estudo, foi utilizado um homogeneizador/triturador Turrtec® TE-102 a 18.000 rpm por 10 min. Li *et al.* (2018) utilizaram uma rotação de 4.000 rpm/min. em alta velocidade, durante 3 min. Já Carneiro *et al.* (2013) utilizaram um homogeneizador Ultra-Turrax MA-102 operando a 18.000 rpm, por 5 min.

A emulsão óleo-água consiste em pequenas gotículas de óleo dispersas em um meio aquoso, com as gotículas de óleo sendo envolvidas por uma fina camada interfacial, consistindo de moléculas de emulsificante. As vantagens desses sistemas são relativa facilidade de preparação e baixo custo, mas têm as desvantagens de instabilidade física quando expostos a

Teresa Cristina Abranches ROSA; Karla Rejane de Andrade PORTO; Márcio Olívio Figueiredo
VARGAS; Durval Batista PALHARES

aquecimento, resfriamento, congelamento, secagem, pH extremos e altas concentrações de minerais. Neste sentido, a eficiência da microencapsulação pode ser ampliada com o aumento da concentração de sólidos (materiais da parede) na solução, o que pode estar relacionado à formação de uma casca ao redor do material do núcleo. Dependendo do material do núcleo e das características desejadas no produto final, os materiais da parede podem ser selecionados a partir de uma ampla variedade de polímeros naturais (por exemplo, amido e celulose) e sintéticos (por exemplo, náilon, polietileno e poliéster) (BAKRY *et al.*, 2016). No presente estudo, optou-se por amido e maltodextrina como materiais de parede.

O amido é um tipo de carboidrato constituído por duas frações polissacarídicas distintas, a amilose, fração linear, e a amilopectina, fração ramificada. Esse polímero de carboidratos é abundante na natureza, apresenta baixo custo, é biocompatível, biodegradável, atóxico e é naturalmente renovável, além de apresentar propriedades físicas como a capacidade de reter vários materiais sensíveis, como compostos organolépticos, o que justifica o aumento do interesse em seu uso nos últimos anos, na indústria e tecnologia de alimentos, indústria farmacêutica e de nanotecnologia (ANDRADE; CAMILLOTO; CRUZ, 2020), assim como sua escolha como material de parede no presente estudo.

Charles *et al.* (2021) optaram por utilizar combinações de proteína de soro de leite como material de parede, com amido de araruta e maltodextrina para encapsular óleo de atum, e observaram melhora da vida útil e estabilidade oxidativa, justificando sua utilização como material de parede, assim como o uso e a aplicação na fortificação de alimentos.

No estudo de Yue *et al.* (2020) que tinha por objetivo otimizar o método de microencapsulação de um óleo funcional utilizando-se amido de milho com alto teor de amilose (*high amylose corn starch* – HACS), os autores evidenciaram que a estabilidade das microcápsulas aumentava quando este tipo de amido era usado como material de parede e que sua adição não afetou a uniformidade e a morfologia da superfície das partículas. Os autores referem que o processo de encapsulação não só melhorou a estabilidade oxidativa dos óleos, mas também aumentou o valor nutricional das microcápsulas e que estas, ao utilizarem este amido como material

Estabilidade de emulsões lipídicas ricas em ômega-3 para preparo de microcápsulas para aditivo de leite humano para recém-nascidos prematuros

de parede, eram altamente aconselháveis para controlar a condição de pacientes diabéticos.

Outros materiais de parede são referidos na literatura científica. A gelatina é um biopolímero frequentemente utilizado na indústria alimentícia e tem papel importante na microencapsulação de ômega-3, uma vez que possui propriedades adequadas para o uso em várias técnicas de encapsulamento, como secagem por pulverização e coacervação complexa (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016). A quitosana também costuma ser mencionada nos estudos científicos de encapsulação de óleos. Esse polissacarídeo derivado da quitina é amplamente aplicado na indústria de alimentos para microencapsulação, devido a sua natureza comestível, biodegradabilidade, não tóxica, barata, antioxidante e antimicrobiana. É um agente espessante que atribui alta viscosidade, além de ser um bom agente encapsulante, ocasionando baixos valores de separação de fases (KANWAL *et al.*, 2021).

Porém, a quitosana não é eficiente em produzir emulsão estável quando está sozinha, e este problema é solucionado quando este polímero é misturado em concentrações adequadas, por exemplo, à maltodextrina (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016). A maltodextrina é um amido hidrolisado comumente usado como material de parede na microencapsulação de ingredientes alimentícios (LI *et al.*, 2018). Esse polissacarídeo neutro oferece vantagens como custo relativamente baixo, aroma e sabor neutros, baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos e boa proteção contra oxidação (CARNEIRO *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2018).

Os carboidratos, como é o caso da maltodextrina e do amido, são os materiais de parede mais amplamente usados na indústria de alimentos para proteger os materiais do núcleo da oxidação, interação química e volatilização, bem como para maximizar a eficiência de encapsulamento, conforme foi evidenciado no trabalho de Zhu *et al.* (2021).

Os critérios para selecionar um material de parede devem basear-se, principalmente, em suas propriedades físico-químicas, dentre as quais a solubilidade e as propriedades de emulsificação. Além disso, o custo também deve ser considerado. A seleção de materiais de parede para microencapsulação pode envolver procedimentos de tentativa e erro até que as

Teresa Cristina Abranches ROSA; Karla Rejane de Andrade PORTO; Márcio Olívio Figueiredo
VARGAS; Durval Batista PALHARES

microcápsulas sejam formadas. As cápsulas devem ser então submetidas a várias avaliações, por exemplo, eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, estabilidade sob diferentes condições de armazenamento, grau de proteção fornecido ao material do núcleo e morfologia das microcápsulas por microscopia de varredura, dentre outros (BAKRY *et al.*, 2016).

Outro ponto de análise é o rendimento das emulsões e dos pós das microcápsulas após secagem. O rendimento total das emulsões nas diferentes concentrações do presente estudo (0,5% de amido e 1,0% de amido) foi, respectivamente, de 572,5 ml e 565,0 ml em ambas, com 2,57 g de EPA e 1,71 g de DHA, porém com um total de sólidos de 90 g (0,15 g/ml ou 15%) e 94 g (0,17 g/ml ou 17%), respectivamente. No trabalho de Carneiro e colaboradores (2013), a concentração total de sólidos (material da parede + óleo) foi fixada em 30%.

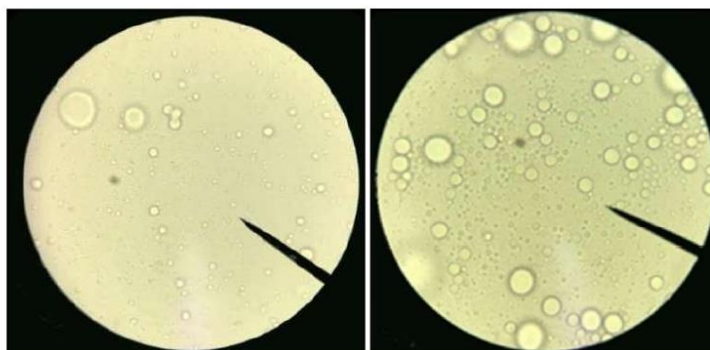
O tamanho e a forma das microcápsulas dependem dos materiais da parede e dos métodos em seu preparo. As técnicas de microencapsulação comumente usadas são emulsificação, secagem por pulverização, homogeneização de alta pressão, liofilização, sistema de *eletrospray* coaxial, secagem por congelamento, coacervação, polimerização *in situ*, extrusão, revestimento em leito fluidizado e tecnologia de fluido supercrítico (BAKRY *et al.*, 2016; COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016). No presente estudo, adotou-se a técnica de emulsificação, seguida de liofilização, para obtenção das microcápsulas.

Para caracterização das emulsões e avaliação da sua estabilidade, foram utilizados critérios como observações microscópicas, análise de pH e observação da separação de fases comumente empregadas para emulsões, o índice de creme ou cremeação (CARNEIRO *et al.*, 2013).

Para a microscopia, as lâminas foram preparadas em triplicata para cada solução nas diferentes concentrações de amido (0,5% e 1,0%) (Figura 5). As imagens obtidas foram, então, convertidas de pixel para dpi (inc), utilizando a conversão interna do *software* para quantificar a área de cada gotícula formada expressa em μm , para comparação aos padrões da literatura e validação estatística. O tamanho das partículas que serviram de base no cálculo das médias das áreas das microcápsulas está demonstrado na Figura 5.

Estabilidade de emulsões lipídicas ricas em ômega-3 para preparo de microcápsulas para aditivo de leite humano para recém-nascidos prematuros

Figura 5 – Observações microscópicas com auxílio de objetiva de imersão em óleo $\times 100$ de emulsões com diferentes concentrações de amido (0,5% e 1,0%)

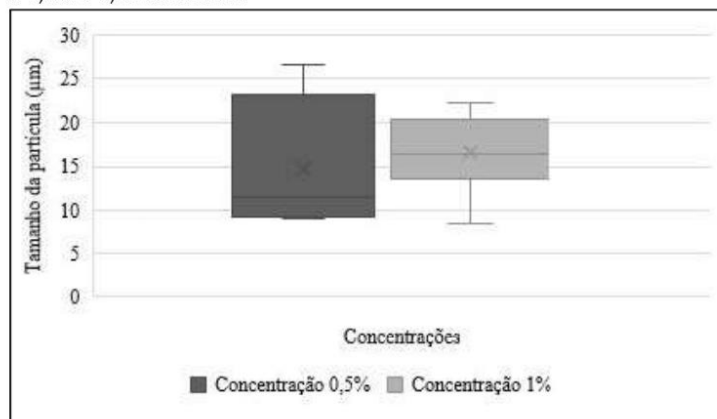


Fonte: Autoria própria.

A comparação dos dois produtos obtidos a partir das emulsões identificadas como 0,5% e 1% está representada no gráfico de *boxplot*, em que é possível verificar que a concentração a 1% apresentou menor variação entre seus dados, ainda que conte com pontos de variação mais evidentes de mínimos e máximos. Sua distribuição quartil foi mais homogênea, e o desvio se manteve muito próximo da mediana e com valor médio de $16,61 \pm 4,64 \mu\text{m}$, sendo a diferença significativa (*p value* 0,67) e nível de confiança de 95%.

Teresa Cristina Abranches ROSA; Karla Rejane de Andrade PORTO; Márcio Olívio Figueiredo
VARGAS; Durval Batista PALHARES

Figura 6: *Boxplot* relacionado à área média das partículas nas concentrações a 0,5% e 1,0 % de amido



Fonte: Autoria própria.

Carneiro *et al.* (2013) obtiveram em seu estudo emulsões com diâmetro de gotícula variando de 0,6 μm a 26 μm . Os autores utilizaram óleo de linhaça e observaram que o uso de diferentes materiais de parede teve influência significativa no tamanho das gotas das emulsões. Os autores discutem que a emulsão preparada a partir da mistura maltodextrina e goma arábica apresentou as menores gotículas e que este resultado pode estar relacionado à maior viscosidade apresentada pela emulsão, o que implica maior resistência ao movimento das gotas, evitando coalescência e resultando em diâmetros menores.

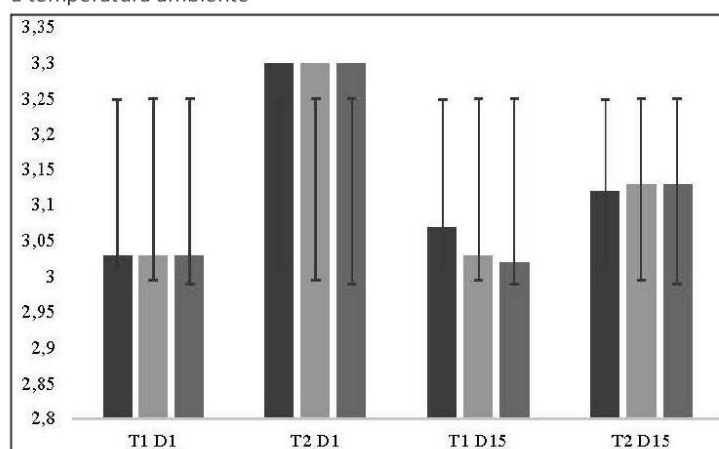
Os valores encontrados neste trabalho variaram entre 9,05 μm e 26,6 μm , para a emulsão a 0,5%, e de 8,4 μm a 22,3 μm , para a emulsão a 1%. Também atendem aos padrões estabelecidos para o diâmetro das gotículas de emulsão em sistemas alimentares, que variam de 0,1 μm a 100 μm , segundo Bakry *et al.* (2016), e para as microcápsulas obtidas por Zhu *et al.* (2021), que variaram de 16,16 μm a 48,43 μm em tamanho.

Outro ponto de análise importante na avaliação da estabilidade das emulsões foi a medição de pH. O pH das duas amostras de emulsão de

Estabilidade de emulsões lipídicas ricas em ômega-3 para preparo de microcápsulas para aditivo de leite humano para recém-nascidos prematuros

alimentação foi medido nos dias 1 e 15, e os resultados são apresentados na Figura 7.

Figura 7 – Evolução do pH avaliado em triplicata nos dias 1 e 15 nas emulsões com diferentes concentrações de amido (T1=0,5% e T2=1,0%) armazenadas à temperatura ambiente



Fonte: Autoria própria.

Independentemente da concentração de amido (0,5% ou 1,0%), o pH das soluções se manteve nas faixas de 3,02 a 3,3, e o tempo de armazenamento em temperatura ambiente não ocasionou grandes variações. Acredita-se que essa faixa de pH foi favorável à manutenção da estabilidade das emulsões. Bakry *et al.* (2016) discutem que emulsões óleo-água apresentam como vantagens a relativa facilidade de preparação e baixo custo, mas têm como desvantagens a instabilidade física quando expostos a aquecimento, resfriamento, congelamento, secagem e pH extremos. Neste sentido, os autores apresentam uma série de estudos que trabalharam com pH variando de 2,5 a 5,9 a depender do material a ser microencapsulado, constituintes de parede e método de encapsulação.

Teresa Cristina Abranches ROSA; Karla Rejane de Andrade PORTO; Márcio Olívio Figueiredo
VARGAS; Durval Batista PALHARES

Outro parâmetro analisado para caracterizar a estabilidade das emulsões foi a separação de fases durante armazenamento. Para isso, as emulsões foram armazenadas por 15 dias em provetas de vidro, devidamente seladas e avaliadas quanto à separação de fases, não tendo sido observada decantação durante esse período. A estabilidade foi medida em função da porcentagem de separação e pôde-se observar estabilidade das emulsões, visto que não houve separação de fases, conforme Figura 8.

Figura 8: Avaliação da separação de fases e índice de cremeação para estudo da estabilidade das emulsões em diferentes concentrações de amido



Fonte: Autoria própria.

Carneiro *et al.* (2013), durante o estudo de estabilidade, observaram que as emulsões preparadas com proteína do soro do leite e maltodextrina apresentaram a formação de uma pequena camada de separação e uma fase de espuma, 24h após sua homogeneização. No presente estudo, embora tenha sido observada uma pequena camada superficial de espuma imediatamente após a homogeneização, ela se manteve durante os dias subsequentes de armazenamento e não houve separação de fases. Algumas hipóteses para esse resultado positivo seria a rotação do homogeneizador em função do tempo (18.000 rpm por 10 minutos), os reagentes utilizados e o pH ácido das emulsões.

Nas fases subsequentes do trabalho, outras análises serão realizadas visando averiguar parâmetros físico-químicos de estabilidade das microcápsulas, sua morfologia, dimensões e capacidade de retenção dos lipídeos e proteção do óleo de peixe contra a oxidação. Diante de resultados positivos

Estabilidade de emulsões lipídicas ricas em ômega-3 para preparo de microcápsulas para aditivo de leite humano para recém-nascidos prematuros

como os obtidos nesta fase, o produto poderá ser proposto como alternativa para enriquecimento de leite humano destinado a recém-nascidos prematuros, após ser submetido a testes *in vitro* e de comportamento quando acrescido ao leite humano.

Bakry *et al.* (2016), em sua revisão, apresentam estudos a partir de 2008 que tratam da microencapsulação de lipídeos e sua utilização em formulações destinadas ao público infantil. A microencapsulação de óleo de peixe pode fornecer muitos benefícios quando incorporada nessas formulações, como fornecer uma barreira ao oxigênio resultando em uma vida útil estendida, mascarando o sabor e odor do óleo de peixe e aumentando a densidade e disponibilidade de nutrientes.

Finalmente, é de conhecimento que os óleos microencapsulados encontraram várias aplicações nas áreas de alimentos, pesticidas, têxteis e farmacêuticos (BAKRY *et al.*, 2016; COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016) e, portanto, este estudo experimental vem corroborar esses achados ao sugerir uma nova metodologia de incorporação de lipídeos, com ênfase nos ácidos graxos essenciais, como é caso do ômega-3, ao leite humano. Acredita-se que o presente estudo subsidiará novas pesquisas no contexto da garantia e promoção do aleitamento materno, incentivo às políticas públicas de amamentação e fortalecimento de políticas e ações no contexto da saúde pública.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo oferece uma alternativa viável e exequível de adição de lipídeos ao leite humano, com ênfase nos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, visto que as emulsões produzidas demonstraram estabilidade e houve formação de microcápsulas. Essa técnica garante biodisponibilidade, melhora da palatabilidade e proteção dos lipídeos contra a oxidação e agregação nos tubos de alimentação, evitando perdas.

Trata-se da primeira fase da pesquisa e as futuras análises dos pós permitirão avanços, como o estudo do comportamento do produto quando acrescido ao leite humano. Desta forma, acredita-se que o presente trabalho subsidiará novas pesquisas visando expandir as oportunidades e melhorar as

Teresa Cristina Abranches ROSA; Karla Rejane de Andrade PORTO; Márcio Olívio Figueiredo
VARGAS; Durval Batista PALHARES

técnicas de fortificação e proposição de aditivos ao leite humano destinado ao uso em bancos de leite para crianças em situação de vulnerabilidade.

REFERÊNCIAS

AMÂNCIO, O. M. S.; FISBERG, R. M.; MARCHIONI, D. M. L. Nutrição no primeiro ano de vida. In: SILVA, S. M. C. S.; MURA, J. D. P. *Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2013. p. 371-99.

ANDRADE, I. H. P.; CAMILLOTO, G. P.; CRUZ, R. S. Estudo prospectivo relativo à nanopartículas de amido. *Brazilian Applied Science*, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 529-46, mar./abr. 2020. DOI: 10.34115/basrv4n2-010

BAKRY, A. M.; ABBAS, S.; ALI, B.; MAJEED, H.; ABOUELWAF, M. Y.; MOUSA, A.; LIANG, L. Microencapsulation of oils: a comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Chicago, v. 15, n. 1, p. 143-82, jan. 2016. DOI: 10.1111/1541-4337.12179

CARNEIRO, H. C. F.; TONON, R. V.; GROSSO, C. R. F.; HUBINGE, M. D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, Amsterdam, v. 115, n. 4, p. 443-51, apr. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877412001756>. Acesso em: 9 dez. 2021.

CARVALHO, F. C.; ROCHA, A. M.; CALIL, L. F.; OLIVEIRA, S. M.; PIRES, C. A. B.; PASCOAL, C. K. P. Fatores de risco maternos mais prevalentes relacionados à ocorrência de partos prematuros: revisão de literatura. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, Cianorte, v. 36, n. 1, p. 112-23, set./nov. 2021. Disponível em: https://www.mastereditora.com.br/periodico/20210906_133301.pdf. Acesso em: 28 dez. 2021.

CHARLES, A. L.; ABDILLAH, A. A.; SARASWATI, Y. R.; SRIDHAR, K.; BALDERAMOS, C.; MASITHAH, E. D.; ALAMSJAH, M. A. Characterization of freeze-dried microencapsulation tuna fish oil with arrowroot starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, Amsterdam, v. 112, mar. 2021. DOI: doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106281

COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: a review. *Food Hydrocolloids*, Amsterdam, v. 61, p. 442-57, dec. 2016. DOI: doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.003

Estabilidade de emulsões lipídicas ricas em ômega-3 para preparo de microcápsulas para aditivo de leite humano para recém-nascidos prematuros

GRANCE, T. R. S.; SERAFIN, P. O.; THOMAZ, D. M. C.; PALHARES, D. B. Aditivo homólogo para a alimentação do recém-nascido pré-termo de muito baixo peso. *Revista Paulista de Pediatria*, São Paulo, v. 33, n. 1, jan./mar. 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rpp/a/9HHMFsnMzLHX4PJ7v3ydyjYK/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 29 dez. 2021.

JIMÉNEZ-MARTÍN, E.; GHARSALLAOUI, A.; PÉREZ-PALACIOS, T.; CARRASCAL, J. R.; ROJAS, T. A. Suitability of Using Monolayered and Multilayered Emulsions for Microencapsulation of ω -3 Fatty Acids by Spray Drying: effect of Storage at Different Temperatures. *Food and Bioprocess Technology*, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 100-11, 2015. DOI: doi.org/10.1007/s11947-014-1382-y

KANWAL, S. *et al.* Development of chitosan based microencapsulated spray dried powder of tuna fish oil: oil load impact and oxidative stability. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, v. 84, p. 1-8, oct. 2021. DOI: [10.1590/1519-6984.254010](https://doi.org/10.1590/1519-6984.254010)

LI, X.; CAO, J.; BAI, X.; JIANG, Z.; SHEN, X. Optimization of microencapsulation of human milk fat substitute by response surface methodology. *Journal of Oleo Science*, Tokyo, v. 67, n. 4, p. 407-17, 2018. DOI: [10.5650/jos.ess17226](https://doi.org/10.5650/jos.ess17226)

MULLER, K. T. C. *Avaliação da suplementação de óleo de peixe (série ω -3) na alimentação de recém-nascidos pré-termo de muito-baixo-peso*. 2017. 95p. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2017.

PALHARES, D. B.; THOMAZ, D. M.; TAVARES, L. V. M.; SERAFIN, P. O. Effect of diet on serum amino acid profile in very-low-birthweight neonates. *In: BERHARDT, L. V. Advances in medicine*. [volume 4]. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2012.

RAYYAN, M.; ROMMEL, N.; ALLEGAERT, K. The Fate of Fat: Pre-Exposure Fat Losses during Nasogastric Tube Feeding in Preterm Newborns. *Nutrients*, Basel, v. 7, n. 8, p. 6213-223. jul. 2015. DOI: [10.3390/nu7085279](https://doi.org/10.3390/nu7085279).

THOMAZ, D. M. C.; SERAFIM, P. O.; PALHARES, D. B.; MELNIKOV, P.; VENHOFEN, L.; VARGAS, M. O. F. Comparação entre suplementos homólogos do leite humano e um suplemento comercial para recém-nascidos de muito baixo peso. *Jornal de Pediatria*, Porto Alegre, v. 88, n. 2, p. 119-24, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jped/a/CQgHvTBkqPyTD8YghP77FhB/?lang=pt>. Acesso em: 27 dez. 2021.

YUE, H.; QIU, B.; JIA, M.; LIU, J.; WANG, J.; HUANG, F.; XU, T. Development and optimization of spray-dried functional oil microcapsules: oxidation stability and

Teresa Cristina Abranches ROSA; Karla Rejane de Andrade PORTO; Márcio Olívio Figueiredo
VARGAS; Durval Batista PALHARES

release kinetics. *Food Science & Nutrition*, [s.l.], v. 8, n. 9, p. 4730-738, sep. 2020.
DOI: 10.1002/fsn3.1684

ZHU J.; LI, X.; LIU, L.; LI, Y.; QI, B.; JIANG, L. Preparation of spray-dried soybean oil
body microcapsules using maltodextrin: effects of dextrose equivalence. *LWT –
Food Science and Technology*, Amsterdam, v. 154, [s.p.], jan. 2022. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643821020272>. Acesso
em: 27 dez. 2021.