



Leilane Costa de Conto

**“PRODUCTION OF MICROCAPSULES CONTAINING FISH
OIL OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACID ETHYL
ESTERS”**

***“PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS CONTENDO ÉSTER
ETÍLICO DE ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS
ÔMEGA-3 DE ÓLEO DE PEIXE”***

Campinas

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Leilane Costa de Conto

**“PRODUCTION OF MICROCAPSULES CONTAINING FISH OIL
OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACID ETHYL ESTERS”**

Orientadora: Prof^a Dr^a Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

***“PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS CONTENDO ÉSTER ETÍLICO
DE ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS ÔMEGA-3 DE ÓLEO DE
PEIXE”***

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção de título de Doutora em Tecnologia de Alimentos

Doctorate thesis presented to the of Food Technology Postgraduation Programme of the School of Food Engineering of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Food Technology.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA LEILANE COSTA
DE CONTO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. LIRENY
APARECIDA GUARALDO GONÇALVES

Campinas
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

C768p Conto, Leilane Costa de, 1984-
Produção de microcápsulas contendo éster etílico de
ácidos graxos polinsaturados ômega-3 de óleo de peixe /
Leilane Costa de Conto. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ácido eicosapentaenóico. 2. Ácido
docosahexaenóico. 3. Isolado protéico de soja. 4.
Gelificação enzimática. 5. Coacervação complexa. I.
Gonçalves, Lireny Aparecida Guaraldo. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Production of microcapsules containing fish oil omega-3
polyunsaturated fatty acid ethyl esters

Palavras-chave em inglês:

Eicosapentaenoic acid

Docosahexaenoic acid

Soy protein isolate

Enzymatic gelation

Complex coacervation

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutora em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves [Orientador]

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Carmen Sílvia Fávaro Trindade

Chiu Chi Ming

Izabela Dutra Alvim

Data da defesa: 09-11-2012

Programa de Pós Graduação: Tecnologia de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida em 09/11/2012 por
Leilane Costa de Conto aprovada pela comissão julgadora em 09/11/2012.

Prof^a. Dr^a. Lirenny Aparecida Guaraldo Gonçalves
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
(orientadora)

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

Prof^a. Dr^a. Carmen Sílvia Fávaro Trindade
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP
(membro)

Dr. Chiu Chih Ming
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
(membro)

Dr^a. Izabela Dutra Alvim
Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL
(membro)

Prof^a. Dr^a. Ana Silvia Prata Soares
Faculdade de Ciências Aplicadas - UNICAMP
(membro)

Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Tessaro
Escola de Engenharia – Departamento de Engenharia Química - UFRGS
(membro)

Prof^a. Dr^a. Maria Helena Andrade Santana
Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP
(membro)

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

Albert Einstein

*Dedico este trabalho aos meus pais e ao
meu namorado que tanto contribuíram
para sua realização*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Espiritualidade por ter me dado a chance de passar por esta experiência e me dar saúde, força e criatividade para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, pelo apoio incondicional e ao Gustavo pelas inúmeras horas de paciência, amor e ajuda com os vários imprevistos ocorridos no decorrer do trabalho.

À Professora Lireny Guaraldo Gonçalves pela orientação, pela confiança em mim, dando-me a oportunidade de desenvolver este trabalho, além do carinho e da compreensão.

Ao Professor Carlos Grosso pelas inúmeras informações e sugestões que direcionaram o trabalho, sempre com muito interesse e disponibilidade.

À equipe do DEPAN que trabalha com o prof. Carlos Grosso, em especial Yara Honório pela confiança, ajuda prestativa nas análises e realizações de testes nos laboratórios do departamento.

À Ana Koon pela ajuda na utilização do Liofilizador do departamento de Tecnologia de Alimentos.

Aos membros da banca pela disponibilidade em corrigir este trabalho dando sugestões importantes para seu enriquecimento e em participar da defesa da tese.

Aos professores das disciplinas que cursei ao longo de toda minha pós-graduação: Flavio, Caroline, Yoon, Lireny, Carlos Grosso, Helena, Marise, Carlos Anjos, Maria Isabel, Assis.

Aos colegas do Laboratório de Óleos e Gorduras, Chiu, Rita, Geórgia, Aliciane, Maria Cristina, Julice, Ingrid, Renato, Oscar, Paula, Gustavo, Julio, Willian, Walter

e em especial à Raquel, que me acompanharam nas horas difíceis e me ajudaram nas horas necessárias.

Às meninas do laboratório, Katrina, Priscila, Alaíde, Rosana, Tatiane e especialmente Marcela, que me auxiliaram muito na realização das análises.

Aos meus amigos Dani, Milena, Bebel, Rafaela, Simone, Vera, Adriano, Thiago, Rodrigo, Leandra, Eliza, Melissa, Adriana, Diego e Sergio pelo apoio psicológico e companherismo.

Aos colegas e amigos, Gabriel, Luiz Henrique, Márcio e Marilene que me ajudaram em análises específicas e com algumas matérias-primas.

Aos colegas do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Unicamp.

Ao laboratório Thomson e ao professor Eberlin, pela ajuda na confecção do artigo II.

À professora Hilary pelas traduções.

À empresa Vital Atman pelo fornecimento do éster etílico de óleo de peixe, The Solae Company pelo isolado protéico de soja, Croda do Brasil LTDA pelo Span 80 e Ajinomoto pela enzima transglutaminase, materiais utilizados para o desenvolvimento das pesquisas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao IFSC e aos colegas de Urupema pela oportunidade de aprendizagem como professora, pela disponibilização para as horas necessárias ao término desta tese e pelas boas risadas nas horas diárias de traslado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Universidade Estadual de Campinas e a Faculdade de Engenharia de Alimentos pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	XXIII
---------------	--------------

SUMMARY	XXV
----------------	------------

INTRODUÇÃO GERAL	1
-------------------------	----------

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
------------------------------	----------

1 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3	7
1.1 DEFINIÇÃO E NOMENCLATURA	7
1.2 METABOLISMO	8
1.3 EFICIÊNCIA NA CONVERSÃO DE ALA À EPA E DHA	10
1.4 BENEFÍCIOS À SAÚDE	11
1.5 CONSUMO E RECOMENDAÇÕES DIÁRIAS	13
1.6 PRINCIPAIS FONTES	15
1.7 ALIMENTOS ENRIQUECIDOS COM ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3	18
2 MICROENCAPSULAÇÃO	19
2.1 MICROENCAPSULAÇÃO PELO PROCESSO DE COACERVAÇÃO	22
2.2 PROCESSOS DE RETICULAÇÃO COM ENZIMAS	25
2.3 MICROENCAPSULAÇÃO PELO PROCESSO DE GELIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	27
2.4.1 Biopolímeros utilizados na coacervação complexa	28
2.4.2 Goma arábica	30
2.4.3 Materiais protéicos	32

2.4.3.1 Gelatina	32
2.4.3.2 Isolado protéico de soro	34
2.4.3.3 Isolado protéico de soja	35
2.5 MICROENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3	36
2.6 ANÁLISES RELACIONADAS ÀS MICROCÁPSULAS	39
2.6.1 Caracterização estrutural	39
2.6.2 Avaliações das condições de processos	39
2.6.3 Comportamento de liberação e aplicação	41
3. REFERÊNCIAS	43

ARTIGO I

EFEITO DO ISOLADO PROTÉICO DE SOJA E DO ISOLADO PROTÉICO DE SORO COMO MATERIAL DE PAREDE PARA MICROCÁPSULAS CONTENDO EPA E DHA OBTIDAS PELO PROCESSO DE GELIFICAÇÃO ENZIMÁTICA 63

RESUMO	65
1 INTRODUÇÃO	66
2 MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1 MATERIAL	68
2.2 MÉTODOS	69
2.2.1 Produção das microcápsulas	69
2.2.2 Avaliação do éster etílico no resíduo	70
2.2.3 Distribuição de tamanho e tamanho médio das microcápsulas	71
2.2.4 Morfologia das microcápsulas	71
2.2.5 Rendimento do processo	72
2.2.6 Eficiência de encapsulação	72
2.2.7 Teor de material lipídico superficial das microcápsulas	73
2.2.8 Análise estatística	73
3 RESULTADOS	74
3.1 AVALIAÇÃO DO ÉSTER ETÍLICO NO RESÍDUO	74

3.2 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO E TAMANHO MÉDIO DAS MICROCAPSULAS	76
3.3 MORFOLOGIA DAS MICROCAPSULAS	76
3.4 RENDIMENTO DO PROCESSO	80
3.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	80
3.6 TEOR DE MATERIAL LIPÍDICO SUPERFICIAL DAS MICROCAPSULAS	81
4 DISCUSSÃO	81
5 CONCLUSÃO	85
6 AGRADECIMENTOS	85
7 REFERÊNCIAS	85

ARTIGO II

EVALUATION OF THE FATTY MATTER CONTAINED IN MICROCAPSULES OBTAINED BY THE ENZYMATIC GELATION PROCESS

91

ABSTRACT	93
1 INTRODUCTION	95
2 MATERIAL AND METHODS	98
2.1 MATERIALS	98
2.2 METHODS	98
2.2.1 Microcapsule production	98
2.2.2 Process yield and encapsulation efficiency	99
2.2.3 Microcapsule morphology	100
2.2.4 Size distribution and average size of the microcapsules	100
2.2.5 Extraction of the free fatty matter	101
2.2.6 Extraction of the encapsulated fatty matter	101
2.2.7 Constitution of the free and encapsulated material	105
2.2.7.1 High performance size-exclusion chromatography to determine the lipid group constituents (HPSEC)	105
2.2.7.2 Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS)	105

2.2.7.3 Determination of the fatty acid constituents by gas chromatography (CG)	106
2.2.8 The encapsulated fatty matter and FOEE contents	107
2.2.9 Statistical analysis	107
3 RESULTS AND DISCUSSION	108
3.1 PROCESS YIELD AND ENCAPSULATION EFFICIENCY	108
3.2 FREE FATTY MATTER CONTENT	108
3.3 MICROCAPSULE MORPHOLOGY	109
3.4 SIZE DISTRIBUTION AND MEAN SIZE OF THE MICROCAPSULES	112
3.5 EXTRACTION OF THE ENCAPSULATED FATTY MATTER	112
3.6 CONSTITUTION OF THE ENCAPSULATED AND FREE FATTY MATTER	115
3.6.1 High performance size-exclusion chromatography of the lipid group constituents (HPSEC)	115
3.6.2 Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS)	116
3.6.3 Determination of the fatty acid constituents by gas chromatography (CG)	119
3.7 THE ENCAPSULATED FATTY MATTER AND FOEE CONTENTS	119
4 CONCLUSIONS	121
5 ACKNOWLEDGEMENTS	122
6 REFERENCES	122

ARTIGO III**CHEMOMETRY AS APPLIED TO THE PRODUCTION OF OMEGA-3
MICROCAPSULES BY COMPLEX COACERVATION WITH SOY PROTEIN
ISOLATE AND GUM ARABIC** **131**

ABSTRACT	133
2 MATERIAL AND METHODS	137
2.1 MATERIALS	137
2.2 METHODS	138
2.2.1 Microcapsule production	138

2.2.2 Process yield and encapsulation efficiency	139
2.2.3 Morphology of the microcapsules	140
2.2.4 Extraction of free FOEE	140
2.2.5 Microcapsule size distribution and mean size	141
2.2.6 Constitution of the FOEE	141
2.2.7 Amount of n-3 encapsulated	142
2.2.8 Statistical analysis	142
3 RESULTS AND DISCUSSION	143
3.1 PROCESS YIELD AND ENCAPSULATION EFFICIENCY	143
3.2 MICROCAPSULE MORPHOLOGY	148
3.3 FREE FOEE CONTENT	150
3.4 MICROCAPSULE SIZE DISTRIBUTION AND MEAN SIZE	150
3.5 CONSTITUTION OF THE FOEE	152
3.6 AMOUNT OF N-3 IN THE MICROCAPSULES	155
4 CONCLUSIONS	156
5 ACKNOWLEDGEMENTS	156
6 REFERENCES	157

ARTIGO IV

MONITORAMENTO DO POTENCIAL ZETA DAS MISTURAS DE IPS, GA E ÉSTER ETÍLICO DE ÓLEO DE PEIXE E PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA

165

RESUMO	167
1 INTRODUÇÃO	168
2 MATERIAIS E MÉTODOS	170
2.1 MATERIAIS	170
2.2 MÉTODOS	171
2.2.1 Determinação do potencial zeta	171
2.2.2 Variáveis independentes testadas	171

SUMÁRIO

2.2.3 Produção das microcápsulas	172
2.2.4 Rendimento do processo e eficiência de encapsulação	173
2.2.4 Teor de EE superficial	174
2.2.5 Morfologia das microcápsulas	175
2.2.6 Distribuição de tamanho e tamanho médio das microcápsulas	175
2.2.7 Teor de ômega-3	175
2.2.8 Análise estatística	177
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	177
3.1 POTENCIAL ZETA	177
3.2. RENDIMENTO DO PROCESSO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	183
3.3 TEOR DE EE SUPERFICIAL	184
3.4 MORFOLOGIA DAS MICROCÁPSULAS	185
3.5 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO E TAMANHO MÉDIO DAS MICROCÁPSULAS	187
3.6 TEOR DE ÔMEGA-3 ENCAPSULADOS	188
4 CONCLUSÃO	189
5 AGRADECIMENTOS	189
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	190
CONCLUSÕES GERAIS	195
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	199

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DOS PRINCIPAIS PEIXES FRESCOS FONTES DE ÔMEGA-3.	16
---	----

TABELA 2. ALIMENTOS ENRIQUECIDOS COM ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 ENCONTRADOS NO MERCADO MUNDIAL.	19
---	----

ARTIGO I

TABELA 1. TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA, RENDIMENTO DO PROCESSO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E TEOR DE MATERIAL LIPÍDICO SUPERFICIAL DAS MICROCAPSULAS DE ISOLADO PROTÉICO DE SORO E ISOLADO PROTÉICO DE SOJA OBTIDOS POR GELIFICAÇÃO ENZIMÁTICA.	75
---	----

TABELA 2. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS TIPO E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E INTERAÇÃO DESTAS PARA CADA VARIÁVEL DEPENDENTE ESTUDADA.	79
--	----

ARTIGO II

TABLE 1. PROCESS YIELD AND ENCAPSULATION EFFICIENCY, FREE AND ENCAPSULATED FATTY MATTER CONTENTS AND MEAN PARTICLE SIZE OF THE MICROCAPSULES OBTAINED BY ENZYMATIC GELATION ACCORDING TO THE PROCESS VARIABLES	110
---	-----

ARTIGO III

TABLE 1. MATRIX OF THE EXPERIMENTAL DESIGN FOR THE VARIABLES OF SPI:GA, CORE MATERIAL AND TG CONCENTRATION IN THE PRODUCTION OF OMEGA-3 FATTY ACID ETHYL ESTER MICROCAPSULES BY COMPLEX COACERVATION, WITH THE RESPECTIVE RESULTS FOR PROCESS YIELD AND ENCAPSULATION EFFICIENCY, FREE OIL CONTENT, MEAN PARTICLE SIZE AND TOTAL EPA + DHA CONTENT. 146

TABLE 2. ANALYSIS OF VARIANCE (ANOVA) OF THE MATHEMATICAL MODEL FOR PROCESS YIELD OF MICROCAPSULES PRODUCED WITH SPI AND GA BY COMPLEX COACERVATION. 147

ARTIGO IV

TABELA 1. CONCENTRAÇÕES DE IPS:GA, DE MATERIAL DE RECHEIO E DE TG E PH UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE MICROCAPSULAS DE ÉSTER ETÍLICO DE ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 POR COACERVAÇÃO COMPLEXA COM OS RESPECTIVOS RESULTADOS DE RENDIMENTO DO PROCESSO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO, TEOR DE ÓLEO LIVRE, TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA E TEOR TOTAL DE EPA + DHA. 181

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1. ESTRUTURA DO ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO E DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO.	7
FIGURA 2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 E ÔMEGA-6.	9
FIGURA 3. MODELO ESQUEMÁTICO DE MICROENCAPSULAÇÃO POR COACERVAÇÃO COMPLEXA.	23
FIGURA 4. ESTRUTURA MOLECULAR DA GOMA ARÁBICA.	31
FIGURA 5. ESQUEMA DO PROCESSO DE IONIZAÇÃO EASI-MS.	42

ARTIGO I

FIGURA 1. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS LIOFILIZADAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO ENZIMÁTICA.	77
FIGURA 2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MICROCÁPSULAS CONTENDO ÉSTER ETÍLICO DE ÓLEO DE PEIXE PRODUZIDAS POR GELIFICAÇÃO ENZIMÁTICA.	78

ARTIGO II

FIGURE 1. SCANNING ELECTRONIC MICROSCOPY OF THE FOEE MICROCAPSULES PRODUCED BY ENZYMATIC GELATION	111
FIGURE 2. SIZE DISTRIBUTION OF THE PARTICLES OBTAINED BY ENZYMATIC GELATION AND FREEZE-DRIED	113

FIGURE 3. MICROGRAPHS OF THE FISH OIL ETHYL ESTER MICROCAPSULES AFTER THE WALL DEGRADATION TESTS AND THE RESPECTIVE RESULTS FOR THE FATTY MATTER EXTRACTED 114

FIGURE 4. EASI(+)-MS FROM THE SAMPLES OF THE ORIGINAL RAW MATERIAL (ETHYL ESTER – A), EG1 (B) AND EG4 (C) SHOWING THE THE TRIACYLGLYCEROLS (TG), DIACYLGLYCEROLS (DG), EPA ETHYL ESTERS (EE EPA), DHA ETHYL ESTERS (EE DHA), AND DIMMERS. 117

FIGURE 5. EPA (C20:5) AND DHA (C22:6) ETHYL ESTER CONTENTS IN THE ENCAPSULATED FATTY MATERIAL EXTRACTED FROM THE MICROCAPSULES (A) AND IN THE TOTAL WEIGHT OF MICROCAPSULES (B) 118

ARTIGO III

FIGURE 1. RESPONSE SURFACE AND CONTOUR CURVE OBTAINED FOR THE DEPENDENT VARIABLE OF PROCESS YIELD (6.0 UA OF TG/G) 145

FIGURE 2. SCANNING ELECTRONIC MICROSCOPY OF THE FOEE MICROCAPSULES PRODUCED WITH SPI AND GA BY COMPLEX COACERVATION. 149

FIGURE 3. PARTICLE SIZE DISTRIBUTION OF THE FREEZE DRIED MICROCAPSULES OBTAINED BY COMPLEX COACERVATION. 153

FIGURE 4. CHROMATOGRAPHIC PROFILE OF THE FATTY ACID COMPOSITION OF THE FISH OIL ETHYL ESTERS IN THE MICROCAPSULES. 154

ARTIGO IV

FIGURA 1. GRÁFICOS DOS POTENCIAIS ZETA PARA SOLUÇÕES DE GA, ÉSTER ETÍLICO E IPS COM AS RESPECTIVAS LINHAS DE TENDÊNCIAS E EQUAÇÕES DAS CURVAS. 178

FIGURA 2. GRÁFICOS DOS POTENCIAIS ZETA PARA AS MISTURAS DE GA, EE E IPS. 182

FIGURA 3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MICROCÁPSULAS PRODUZIDAS COM EE, IPS E GA POR COACERVAÇÃO COMPLEXA EM DIFERENTES PHs. 186

CONTO, L. C. **Produção de microcápsulas contendo éster etílico de ácidos graxos polinsaturados ômega-3 de óleo de peixe**. 2012, 208p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

RESUMO

Óleos e gorduras são importantes na alimentação humana como fonte de energia, além de alguns serem considerados essenciais ao funcionamento dos organismos, tais como determinados ácidos graxos polinsaturados ômega-3. O ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), provenientes de fontes marinhas, são as principais formas de ingestão direta de ômega-3, porém estes são muito sensíveis à oxidação e apresentam *flavors* característicos que levam à rejeição por alguns consumidores. Uma alternativa para contornar estes problemas é a microencapsulação. Uma técnica muito difundida para este tipo de produto sensível é a coacervação, no entanto algumas novas técnicas vêm surgindo na busca de solução destas deficiências. A gelificação enzimática pode ser citada como uma nova tecnologia que objetiva reduzir algumas etapas do processo e tempo de produção, se comparado ao processo de coacervação. Neste trabalho buscou-se compreender o comportamento do material de recheio (éster etílico de óleo de peixe), visto que são encontrados poucos estudos referentes às análises da integridade dos materiais de recheio de natureza lipídica quando encapsulados, e dos materiais de parede (principalmente isolado protéico de soja e isolado protéico de soro) quando utilizados para a produção de microcápsulas por gelificação enzimática e por coacervação complexa, avaliando tanto as cargas eletrostáticas do meio pelo seu potencial zeta para a coacervação, quanto na caracterização completa das cápsulas produzidas por gelificação enzimática e coacervação. Entre os materiais de parede estudados, foram utilizados isolado protéico de soro e isolado protéico de soja, sendo que este último na concentração de 10% apresentou formação de microcápsulas com

características superiores pela técnica de gelificação enzimática. Quando estudadas mais a fundo as características das microcápsulas produzidas por gelificação enzimática, a análise do material encapsulado constatou-se que ocorreu a encapsulação de óleo de milho da segunda emulsão, reduzindo assim a eficiência real de encapsulação, mostrando-se assim uma técnica não eficaz, mesmo se obtendo cápsulas com elevada resistência mecânica. Comparando-se os métodos de degradação destas cápsulas, foi observada a total degradação da parede para a metodologia de degradação ácida, e parcial para a metodologia de degradação enzimática alcalina. Entretanto a melhor metodologia de degradação para se determinar a composição do material encapsulado foi a degradação ácida com determinação direta da composição em ácidos graxos. No estudo estatístico de microcápsulas contendo éster etílico de óleo de peixe produzidas por coacervação complexa utilizando isolado protéico de soja e goma arábica como material de parede obteve-se cápsulas contendo mais de 20 g de EPA + DHA / 100 g microcápsulas, sendo necessária a adição de menos de 0,5 g de microcápsulas em porções de 100 g ou 100 mL de alimentos para este poder ser considerado funcional. Contudo, uma grande variação no processo foi observada levando a um estudo mais aprofundado do processo de coacervação através do potencial zeta dos materiais de parede e de recheio separadamente e em diferentes misturas, onde foi constatado que o isolado protéico de soja, por possuir variação na sua constituição e baixa solubilidade, dificulta a determinação exata do potencial zeta zero das misturas, sendo a máxima eficiência de encapsulação encontrada quando as misturas de 1,5:1,0 (massa:massa) isolado protéico de soja:Goma arábica e 2,0:1,0 (massa:massa) material de parede:material de recheio em pH 4,0 foram testados.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido eicosapentaenóico; ácido docosahexaenóico; isolado protéico de soja; gelificação enzimática; coacervação complexa.

CONTO, L.C. **Production of microcapsules containing fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acid ethyl esters.** 2012, 208p. Thesis (Doctorate in Food Technology) – Faculty of Food Engineering, State University of Campinas, Campinas, 2012

SUMMARY

Fats and oils are important energy sources in human feeding, and some, such as the omega-3 polyunsaturated fatty acids, are considered essential to the functioning of the organisms. Eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids from marine sources are the principal forms used for the direct ingestion of omega-3, but are highly sensitive to oxidation and present characteristic flavors leading to their rejection by some consumers. One alternative to overcome these problems is microencapsulation, and one well known technique for this type of sensitive product is coacervation, although some new techniques are currently appearing which also attempt to overcome these deficiencies. Enzymatic gelation could be cited as a new technology which aims to reduce some of the processing steps and production time when compared to coacervation. This work aimed to understand the behavior of the core material (fish oil ethyl ester), since few studies can be found referring to analyses of the integrity of the core materials of a lipid nature when encapsulated, and of the wall materials (principally soy protein isolate and whey protein isolate), when used in the production of microcapsules by enzymatic gelation and by complex coacervation, evaluating both the electrostatic charges in the medium from their zeta potential for coacervation, and a complete characterization of the resulting capsules produced by both enzymatic gelation and coacervation. Of the wall materials studied, whey protein isolate and soy protein isolate were used, the latter, at a concentration of 10%, producing microcapsules with the best characteristics by the enzymatic gelation technique. However, when the characteristics of the microcapsules

produced by enzymatic gelation were studied at greater depth, the analysis of the core material showed that lipid material from another source had been co-encapsulated due to the processing conditions, thus reducing the true efficiency of the encapsulation, showing that this technique was not efficient, despite the elevated mechanical resistance of the microcapsules. A comparison of the methods used to degrade the capsules showed total degradation of the wall by the acid degradation methodology, and only partial degradation for the enzymatic alkaline degradation methodology. Thus the best degradation methodology to determine the composition of the encapsulated material was acid degradation with the direct determination of the fatty acid composition. In the statistical study of the production of microcapsules containing fish oil ethyl ester by complex coacervation using soy protein isolate and gum Arabic as the wall materials, capsules were obtained containing more than 20 g EPA + DHA / 100 g of microcapsules, requiring the addition of less than 0.5 g of microcapsules to 100 g or 100 mL portions of foods for the food to be considered functional. However considerable process variation was observed, leading to a study in greater depth of the coacervation process as from the zeta potential of the wall and core materials separately, and in different mixtures. Thus it was shown that the soy protein isolate presented variation in its constitution and low solubility, which made it difficult to determine the exact zero zeta potential of the mixtures, the maximum encapsulation efficiency being found with mixtures of 1.5:1.0 (w:w) soy protein isolate: gum Arabic as the wall material and a ratio of 2.0:1.0 (w:w) for the wall material: core material at pH 4.0.

KEYWORDS: Eicosapentaenoic acid; docosahexaenoic acids; soy protein isolate; enzymatic gelation; complex coacervation

INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo dos últimos anos, os consumidores vêm aumentando a procura por alimentos mais saudáveis, tais como os alimentos funcionais. As razões que os guiam nesta busca, incluem aumentar a resistência para enfrentar o estresse da vida moderna, eliminar maus hábitos alimentares, controlar o peso, prevenir doenças degenerativas (doenças cardíacas, câncer e diabetes, as quais são responsáveis por quase dois terços das mortes mundiais), compensar os efeitos da falta de exercícios físicos e retardar o envelhecimento (KAHLON; KEAGY, 2003).

Ácidos graxos polinsaturados ômega-3 se enquadram no grupo de alimentos funcionais por atuarem combatendo e prevenindo várias doenças, além de participarem da composição de vários tecidos, entretanto são altamente susceptíveis à oxidação. Este fator, associado à resistência dos diversos grupos de consumidores à ingestão de alimentos fontes de ômega-3, principalmente peixes de águas frias, tem levado ao desenvolvimento de técnicas que facilitem a incorporação destes ingredientes em formulações alimentícias, como a microencapsulação (ACKMAN, 2005).

A microencapsulação é uma tecnologia usada, principalmente com a finalidade de proteger um composto e/ou modular sua liberação. Atualmente inúmeros estudos vêm sendo realizados com a microencapsulação de óleo de peixe, testando diversos polímeros como materiais de parede (quitosana, gelatina, goma arábica, derivados de amido, proteínas de soro, proteínas de soja, caseína, entre outros), nas técnicas disponíveis, destacando-se os processos por atomização (*spray drying*, *spray cooling* ou *spray chilling*), coacervação, recobrimento por leite fluidizado e por complexação.

O processo de coacervação é uma alternativa para a microencapsulação de compostos sensíveis a temperaturas elevadas e a determinados solventes

orgânicos, visto ser um processo físico-químico que viabiliza o uso de baixas temperaturas em ausência desses solventes, bem como ser capaz de encapsular ingredientes sólidos ou líquidos insolúveis em água, sendo assim, indicado para encapsular óleos ricos em ômega-3 (GOUIN, 2004). Outra técnica interessante para compostos sensíveis a elevadas temperaturas é a gelificação enzimática, que busca encapsular compostos lipídicos através da formação de uma dupla-emulsão e utilização da enzima transglutaminase como reticulante.

Este trabalho apresenta como objetivo geral a produção de microcápsulas contendo éster etílico de óleo de peixe através dos processos de gelificação enzimática e coacervação complexa. Neste trabalho também se buscou compreender o comportamento do material de recheio (éster etílico de óleo de peixe) e dos materiais de parede (isolado protéico de soja e isolado protéico de soro) por diferentes metodologias de avaliação, avaliando tanto no momento da formação das cápsulas por coacervação complexa com uso da análise de cargas eletrostáticas do meio pelo seu potencial zeta, quanto na caracterização completa das cápsulas produzidas por gelificação enzimática e coacervação. Para tanto, os trabalhos desenvolvidos foram separados em uma revisão bibliográfica e quatro artigos conforme as descrições a seguir.

O Capítulo I apresenta uma revisão bibliográfica contendo as informações encontradas na literatura que servem de base para o desenvolvimento dos demais trabalhos, como as principais motivações da escolha dos materiais estudados e metodologias aplicadas.

Conforme estudos anteriores realizados utilizando a metodologia de gelificação enzimática, o Artigo I aborda o estudo dos materiais de parede a serem utilizados nesta técnica, sendo testados o isolado protéico de soro e o isolado protéico de soja em diferentes concentrações, avaliando seus efeitos nas características morfológicas, no rendimento do processo e na eficiência de encapsulação, no teor de material lipídico na superfície e teor de éster etílico residual de microcápsulas recheadas com éster etílico de óleo de peixe.

Na literatura são encontrados poucos estudos referentes às análises da integridade dos materiais de recheio de natureza lipídica quando encapsulados, portanto o Artigo II se refere à avaliação do material lipídico encapsulado pela técnica de gelificação enzimática em diferentes condições de processo, usando isolado protéico de soja e a enzima transglutaminase para a produção de cápsulas contendo éster etílico de óleo de peixe como material de recheio. Para isto foi realizada a extração do material lipídico por 6 metodologias diferentes, a determinação e a quantificação deste por técnicas cromatográficas (cromatografia gasosa – CG, cromatografia de alta performance por exclusão de tamanho – HPSEC e espectrometria de massa com ionização ambiente por *spray* sônico – EASI/MS). As microcápsulas foram caracterizadas morfológicamente, por eficiência de encapsulação, distribuição de tamanho de partícula, tamanho médio de partícula e rendimento do processo. Com os resultados obtidos foram escolhidas as melhores metodologias para se determinar a eficiência de encapsulação e integridade do material de recheio, além de definir as melhores condições deste processo.

O Artigo III apresenta um estudo quimiométrico visando à otimização do processo de produção de microcápsulas de isolado protéico de soja e goma arábica, contendo éster etílico de óleo de peixe pelo processo de coacervação complexa. Neste estudo foram obtidos os resultados de eficiência de encapsulação, rendimento e a caracterização das microcápsulas, onde se determinou a proporção ideal entre os materiais de parede e de recheio, bem como a concentração de transglutaminase para a reticulação das microcápsulas.

Dadas algumas dificuldades identificadas no Artigo III, os estudos realizados e expostos no Artigo IV objetivaram determinar o comportamento dos biopolímeros utilizados na produção de microcápsulas contendo éster etílico de óleo de peixe pelo processo de coacervação complexa de isolado protéico de soja e goma arábica. Para esta avaliação foram utilizados os princípios eletrostáticos através da medição do potencial zeta das dispersões, em diferentes concentrações de materiais de parede e de recheio, bem como dos biopolímeros e

recheio isolados. Com os resultados deste trabalho se compreendeu a dificuldade de otimização do processo devido às características dos materiais utilizados.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

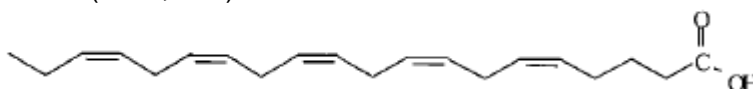
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Ácidos graxos ômega-3

1.1 Definição e nomenclatura

Os ácidos graxos são os principais constituintes dos óleos e gorduras, podendo ser classificados como saturados ou insaturados. Dentre os ácidos graxos insaturados podem ocorrer uma (monoinsaturado) ou mais insaturações (polinsaturados). Os ácidos graxos polinsaturados são nomeados conforme número e posição de suas duplas ligações e podem ser classificados como ômega-3 (n-3), por apresentarem a primeira insaturação no terceiro carbono contando a partir do grupamento final metil (CH_3), tais como o ácido α -linolênico (ALA, C18:3 n-3), o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5 n-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6, n-3) (O'KEEFE, 2002; RUXTON et al., 2004). Na Figura 1, estão apresentadas as estruturas químicas do EPA e do DHA.

Ácido eicosapentaenóico (20:5, n-3)



Ácido docosahexaenóico (22:6, n-3)

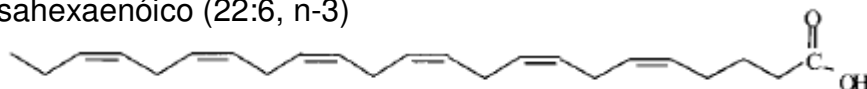


Figura 1. Estrutura do ácido eicosapentaenóico e do ácido docosahexaenóico.
(Fonte: Trautwein, 2001).

1.2 Metabolismo

Os ácidos graxos EPA e DHA podem ser biossintetizados pelo homem a partir do precursor ácido α -linolênico, entretanto as células dos mamíferos não possuem as enzimas capazes de adicionar duplas ligações nos ácidos graxos após o nono carbono da cadeia a partir do grupamento carboxila, assim sendo considerado essencial na alimentação humana (WHELAN; RUST, 2006).

Segundo Simopoulos (1991), EPA e DHA atuam no funcionamento de diversos órgãos e sistemas, convertendo-os em mediadores lipídicos farmacológicos na forma de eicosanóides (prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos, tromboxanas e lipoxinas), substâncias bioativas que têm influência em várias células e nos tecidos. Estes ácidos graxos polinsaturados são importantes componentes das membranas celulares, com influência na sua fluidez e no comportamento das proteínas que as compõem (DAS, 2006). Através de uma reação de hidrólise ocorre a liberação dos ácidos graxos da bicamada fosfolipídica das membranas, iniciando-se a síntese destes eicosanóides em resposta a lesões, inflamações e/ou outros estímulos (MARZZOCO; TORRES, 2010).

Em teoria, a habilidade de conversão de ALA em EPA e DHA tornaria desnecessária a ingestão destes últimos, porém, para tal conversão, se faz necessária a atuação das enzimas alongase e desaturase, conforme exposto na Figura 2. (NAKAMURA et al., 2004; DAS, 2006; GARÓFOLO; PETRILLI, 2006; JUMP, 2008; SCHMITZ; ECKER, 2008). A Δ -6-desaturase, quando o nível sanguíneo de ácidos graxos polinsaturados ômega-6 (n-6) encontra-se elevado, atua sobre este, tornando a conversão de ALA para EPA e DHA deficiente (RUXTON et al., 2004).

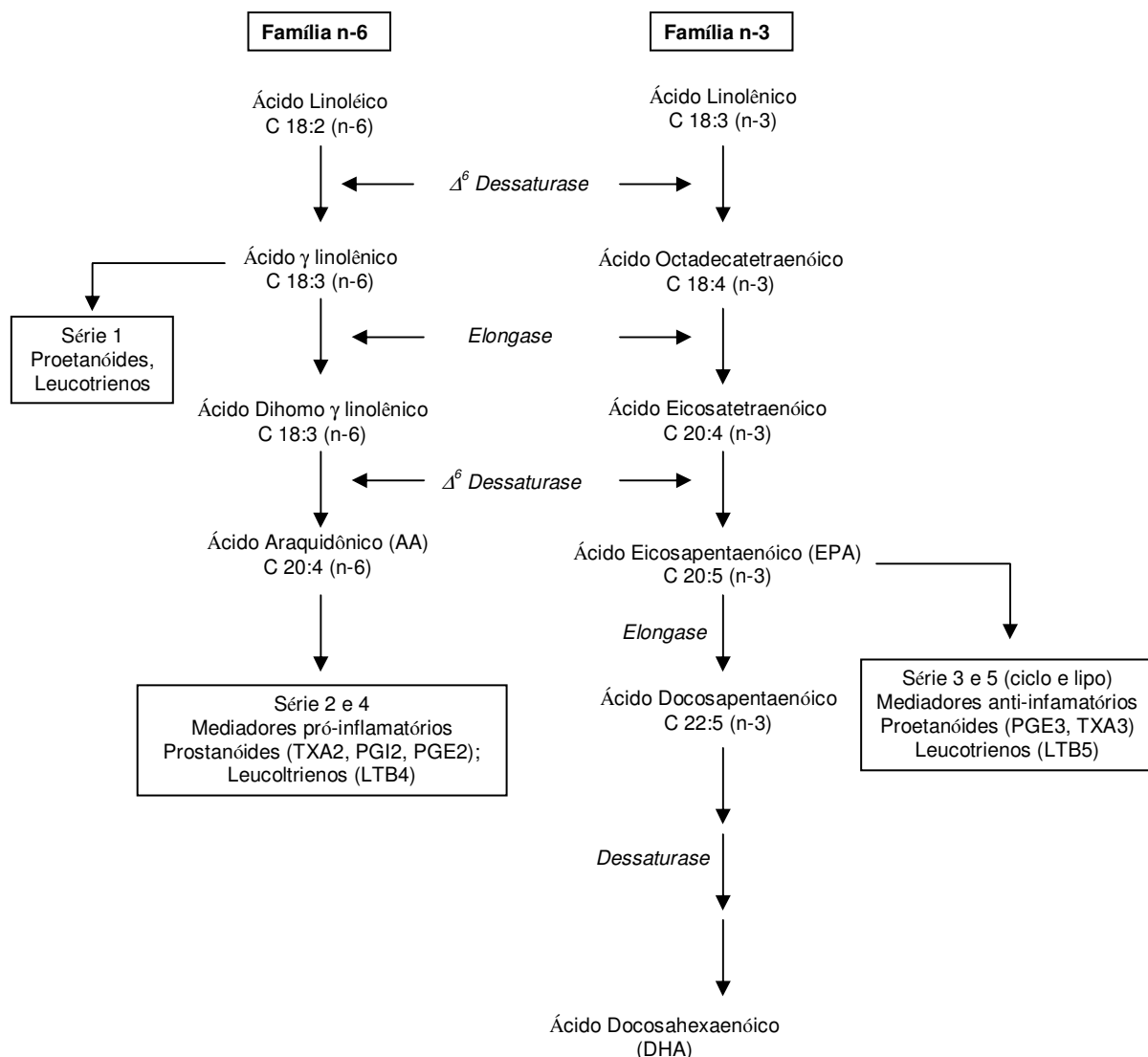


Figura 2. Metabolismo de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6.

(Fonte: GARÓFOLO; PETRILLI, 2006).

A competição entre os ácidos graxos ômega-3 e os ômega-6 (Figura 2.) ocorre na incorporação na membrana celular, sendo os ômega-3 precursores de eicosanóides de melhor atividade que os ômega-6 (KOLANOWSKI; LAUFENBERG, 2006). Os eicosanóides produzidos a partir do ácido araquidônico (n-6) têm efeitos pró-inflamatórios, crescendo a tendência de trombócitos se agregarem e agirem como vasoconstritores. Já os eicosanóides derivados do EPA têm efeito menos pronunciado e em muitos casos oposto quando comparados

com os derivados do ácido araquidônico (DAS, 2006; KOMPRDA, 2012). Com base nisto, a razão entre a ingestão de ácidos graxos n-6 e ômega-3 determina os tipos e teores de eicosanóides no organismo e influencia a intensidade da resposta inflamatória (KOLANOWSKI; LAUFENBERG, 2006; SCHMITZ; ECKER, 2008).

1.3 Eficiência na conversão de ALA à EPA e DHA

Em muitos estudos o EPA e o DHA não são administrados diretamente, mas sim na forma do precursor ALA, geralmente como derivados de linhaça (ZHAN et al., 2008). Nestes experimentos se presume uma eficiência de conversão de ALA em EPA e DHA, sendo para tanto administrados em diferentes espécies animais (KOMPRDA et al., 2005).

Um exemplo é demonstrado no trabalho realizado por Lin e Salem (2007), onde apenas 16% da dose de ALA fornecida a ratos foi depositada nos seus tecidos e somente 6% foi transformada em EPA e DHA. Outro trabalho realizado com ratos indica que em diferentes tecidos o acúmulo de EPA + DHA provenientes de ALA fornecido na dieta e a pré-formação de EPA + DHA variaram entre 0,7–2,0% e 15–25%, respectivamente (RAMAPRASAD et al., 2010).

Em estudos com seres humanos ingerindo ácidos graxos polinsaturados, apenas o DHA foi acumulado nas membranas fosfolipídicas (JUMP, 2008), e a presença deste no plasma foi superior à de EPA, sendo que uma pequena proporção de DHA foi proveniente do ALA ingerido (BRENNAN et al., 2009). Já estudos comparando a suplementação com óleo de linhaça e óleo de peixe, demonstraram um moderado aumento no teor sanguíneo de EPA, sem elevação no teor de DHA nas pessoas que consumiram o óleo de linhaça, enquanto que o óleo de peixe resultou em grande elevação de ambos ácidos graxos (SANDERS; ROSHANAI, 1983). Pesquisas indicam uma conversão variando de 5 a 15%, sendo que estas diferenças podem ser explicadas devido à atividade enzimática

intrínseca de cada indivíduo, recomendando-se a ingestão direta de EPA e DHA (TRAUTWEIN, 2001)

Tais valores baixos de conversão do ALA em EPA e DHA, segundo Komprda (2012), podem ser justificados pelos processos de degradação oxidativa a que o ALA está sujeito durante os processos metabólicos, sendo que se pode considerar uma conversão de menos de 1%. O principal destino do ALA é o catabolismo e a reciclagem de carbono para formar acetatos nas rotas metabólicas (CUNNANE et al., 2003).

1.4 Benefícios à saúde

As investigações evidenciando os benefícios à saúde de uma alimentação rica em ácidos graxos polinsaturados ômega-3 iniciaram-se há quase 40 anos, quando Bang, Dyerberg e Nielsen (1971) observaram que os esquimós da Groenlândia apresentavam baixa incidência de doenças cardiovasculares, fato explicado pela alta ingestão de ácidos graxos polinsaturados provenientes de uma dieta à base de mamíferos marinhos e peixes (BARROW; NOLAN; HOLUB, 2009). Porém, desde 1994, extensivos estudos clínicos, mais de dois mil documentados, vêm sendo desenvolvidos para comprovar os diversos benefícios de uma alimentação rica em ácidos graxos polinsaturados ômega-3 (RUXTON et al., 2004; SERNA-SALDIVAR et al., 2006).

A relação inversa entre o nível de ômega-3 presente no sangue e a ocorrência de doenças cardiovasculares vem sendo observada em estudos referentes à sua prevenção e aos seus tratamentos, em grupos de pessoas de idades e sexos variados, indicando que o consumo diário de peixes e/ou dietas ricas em ômega-3 reduzem os riscos de ataque do miocárdio e do aparecimento de doenças do coração em geral (HIGGINS et al., 1999; OOMEM et al., 2000; HU et al., 2002; BUCHER et al., 2002).

Os efeitos antiaterogênicos e antitrombóticos dos ácidos ômega-3 implicam na redução do depósito de placas ateroscleróticas, por consequência diminui o risco de trombozes, além de reduzir os níveis de triacilgliceróis séricos, pressão sanguínea e melhorar a função endotelial (SCHACKY, 2000).

Um estudo com indivíduos hipertensos observou o efeito dos ácidos graxos ômega-3 sobre a pressão arterial, buscando compreender a influência destes na incidência de acidentes vasculares cerebrais. Tal trabalho sugeriu um efeito de redução na pressão arterial quando consumido 2–3 g de ácidos graxos polinsaturados ao dia e também considerou que mesmo um baixo consumo de DHA poderia ser efetivo e uma forma não farmacológica de proteger homens contra doenças cardiovasculares (GUILLLOT et al., 2009).

Também existem inúmeros indícios da atuação dos ácidos graxos ômega-3 em doenças inflamatórias, como artrite, fibrose cística, lúpus, psoríase, asma, doença de Cronh e doenças renais (RUXTON et al., 2004). O EPA e o DHA apresentam sucesso neste sentido por terem a capacidade de se converter em prostaglandinas e leucotrienos anti-inflamatórios, que ajudam a diminuir a inflamação e a dor (BELCH; MUIR, 1998).

A associação destes ácidos graxos com o desenvolvimento e funções do cérebro é conhecida. Os mesmos participam das membranas neurais e auxiliam a atividade dos neurotransmissores, influenciando no desenvolvimento cognitivo de crianças em fases iniciais de vida. O DHA representa em torno de 15% dos ácidos graxos totais nos tecidos cerebrais sendo considerado o ácido graxo polinsaturado de cadeia longa predominante nestes tecidos (TEHRANY et al., 2011).

O maior acúmulo do DHA nas membranas fosfolipídicas que constituem as membranas neurais ocorre durante a fase final pré-natal e desenvolvimento pós-natal, coincidindo com a formação das sinapses, sendo essencial o adequado consumo de DHA para o desenvolvimento e funcionamento ótimo do sistema nervoso central (LARRIEU et al., 2004). Assim, Connor, Lowensohn e Hatcher (1996), observaram que um aumento no consumo de ácidos graxos ômega-3 por

mulheres durante a gravidez pode aumentar o nível de DHA materno que será transmitido através da placenta ao feto. O leite materno é uma fonte importante de DHA para crianças nos primeiros meses de vida, beneficiando principalmente prematuros (RUXTON et al., 2004).

Estudos epidemiológicos de larga escala têm identificado que o consumo de peixe representa um fator protetor potencial contra demência, reduzindo o risco de defeito cognitivo, declínio cognitivo e Mal de Alzheimer (RUXTON et al., 2004). Schram et al. (2007) sugeriram que os ácidos graxos polinsaturados ômega-3 podem ter efeito positivo no tratamento da depressão e da esquizofrenia.

Outros estudos indicam ainda que os ácidos graxos polinsaturados, em especial o DHA, atuam na prevenção nos estágios de promoção e progressão de alguns tipos de câncer (TEHRANY et al., 2011; SCHRAM et al., 2007).

Além disto, sabe-se da sua importância para a visão e o sistema reprodutivo. Isto se dá pelo fato do DHA ser um componente da retina dos olhos, das glândulas mamárias, dos testículos e dos espermatozoides (KIM; MENDIS, 2006).

1.5 Consumo e recomendações diárias

Na antiguidade, há 100-150 anos, as dietas das populações ocidentais possuíam uma relação de ômega-6:ômega-3 de aproximadamente 1. Nas últimas décadas esta relação se alterou para 10:1 e até 25:1, em alguns países, mostrando que em um período relativamente curto houve uma mudança drástica no perfil do consumo de ácidos graxos polinsaturados (SIMOPOULOS, 1991).

Dados levantados por Kris-Etherton et al. (2000) apontam um consumo diário individual de 1,6 g de ácidos graxos polinsaturados nos Estados Unidos da América, destes apenas 0,1-0,2 g é proveniente de EPA e DHA. Na União Européia e Austrália o consumo de ômega-3 foi estimado entre 0,10 a 0,15 g/dia (BARROW; NOLAN; HOLUD, 2009). Segundo Fürst (2002) e Garófolo e Petrilli

(2006), entre as civilizações modernas do Ocidente, as dietas baseadas em ácido linoléico, proveniente de óleos de soja, milho e girassol, apresentam em média uma relação ômega-6:ômega-3 de 16,7:1,0.

Outros estudos indicam que o consumo de ácidos graxos ômega-3 nos países ocidentais é de aproximadamente de 0,15 g/dia por pessoa (KOLANOWSKI et al., 2007). Estes valores estão muito aquém dos balanços ideais indicados na literatura entre ácidos graxos ômega-6 e ômega-3, que podem variar de 5:1 a 1:1 (GARÓFOLO; PETRILLI, 2006).

A recomendação de ingestão diária de ácidos graxos ômega-3 varia conforme país e entre diferentes instituições regulamentadoras, estando ainda em discussão. As doses diárias recomendadas de EPA e DHA para adultos varia de 180 a 500 mg para a prevenção de doenças cardíacas, podendo chegar até 1000 mg para a redução de problemas mentais e uma recomendação especial para mulheres grávidas é de no mínimo 300 mg de DHA por dia (KOLANOWSKI; LAUFENBERG, 2006).

A Organização Mundial de Saúde, em 2003, recomendou que 1 a 2% das calorias ingeridas diariamente sejam de ácidos graxos ômega-3. No ano de 2000, a *Food and Drug Administration* (FDA) indicou que o consumo de EPA e DHA não deve exceder 3 g/dia, sendo destes no máximo 2 g provenientes de suplementos alimentares, devido a possibilidade de efeitos adversos no controle glicêmico e aumento de hemorragias (WHELAN; RUST, 2006).

Outras instituições têm suas recomendações baseadas no consumo de EPA, DHA e ALA, tais como a *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids* (EPA e DHA maior ou igual a 500 mg/dia, e 0,7% das calorias ingeridas diariamente de ALA), *Scientific Advisory Committee on Nutrition*, do Reino Unido (ácidos graxos polinsaturados totais ingeridos superiores a 0,2 g/dia) e *British Nutrition Foundation* (1,25 g/dia de ômega-3 totais) (WHELAN; RUST, 2006).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), determina que os produtos contendo ácidos graxos ômega-3 apresentem no mínimo 0,1 g de EPA e/ou DHA na porção ou em 100 g ou 100 mL para poderem apresentar alegação de alimento benéfico para o coração (ANVISA, 2010).

1.6 Principais fontes

As principais fontes de ácidos graxos polinsaturados EPA e DHA são plânctons marinhos e peixes marinhos gordurosos de águas profundas e frias como atum, salmão, cavala, arenque, entre outros, que variam sua concentração de 0,4 a 2,2 g de ômega-3 / 100 g de peixe (OOMEM et al., 2000; TRAUTWEIN, 2001).

Em geral, o conteúdo de lipídios em peixe varia de 2 a 30%, dependendo da espécie, da alimentação, da sua localização geográfica, do ambiente, da fase reprodutiva e variações sazonais (KIM; MENDIS, 2006). Na Tabela 1, seguem expostos os principais peixes fontes de ômega-3 e suas composições em ácidos graxos.

Segundo Sanguansri e Augustin (2007), a fonte mais tradicional de óleo rico em ácidos graxos ômega-3 é o peixe e os concentrados destes, contudo, de acordo com Rubio-Rodríguez et al. (2010), fontes alternativas estão sendo estudadas, tais como microrganismos marinhos e plantas transgênicas. O óleo de peixe é considerado um subproduto da indústria de pescado, e pode sofrer oxidação e hidrólise, se extraído e armazenado em condições impróprias (KIM; MENDIS, 2006). A vida de prateleira dos óleos ricos em ômega-3 é em torno de seis meses, mas pode-se chegar até doze meses se microencapsulado e armazenado a 4 °C em recipientes fechados, sob atmosfera inerte (KOLANOWSKI; LAUFENBERG, 2006; KEOGH et al., 2001).

Tabela 1. Composição em ácidos graxos dos principais peixes frescos fontes de ômega-3 (Adaptado de Tehrany et al., 2011).

Ácidos graxos (mg/100g)	Linguado	Cavala	Salmão	Sardinha	Atum	Tamboril	Bacalhau
Lipídios totais (g/100 g)	11,7	7,07	13,5	5,72	0,73	0,21	0,3
C14:0	366	179	640	179	6	8	1
C14:1 (n-5)	-	-	7	-	-	-	-
C15:0	-	10	8	11	1	-	-
C16:0	1832	1198	2472	1200	109	32	45
C16:1 (n-7)	808	145	576	197	10	6	2
C18:0	295	327	360	276	53	12	10
C18:1 (trans)	109	15	248			1	2
C18:1 (cis, n-9)	1544	1258	2204	808	94	18	19
C18:1 (cis, n-7)	329	-	74	3	1	2	2
C18:2 (n-6, LA)	-	-	13	4	1	-	-
C18:3 (n-3, ALA)	9	58	174	40	3	-	-
C18:4 (n-3)	1296	343	672	146	4	1	5
C20:0	143	120	105	42	3	-	-
C20:4 (n-6, AA)	116	114	81	89	18	6	7
C20:5 (n-3, EPA)	969	662	1112	638	35	26	28
C22:5 (n-3, DPA)	285	118	349	178	7	2	4
C22:6 (n-3, DHA)	1400	1404	2164	1269	131	37	75
MUFA ^a	3069	1436	3237	1081	113	33	24
PUFA ^b	4186	2845	5246	2407	211	71	121
LC-PUFA (n-3) ^c	3960	2585	4472	2270	179	66	112
LC-PUFA (n-6) ^d	191	259	671	130	31	7	8

^a MUFA = ácidos graxos monoinsaturados^b PUFA = ácidos graxos polinsaturados^c LC-PUFA (n-3) = ácidos graxos de cadeia longa polinsaturados ômega-3^d LC-PUFA (n-6) = ácidos graxos de cadeia longa polinsaturados ômega-6

Métodos e condições especiais de extração de óleo de peixe são vitais para manter sua qualidade final e, juntamente com a separação dos ácidos graxos ômega-3, impulsionam novas pesquisas (KIM; MENDIS, 2006). Processos de separação por cristalização a baixas temperaturas, complexação de uréia, fracionamento ou destilação molecular, cromatografia, extração com fluido supercrítico e purificação enzimática são utilizados para produzir óleo de peixe e

concentrados de ômega-3. Destes, os três últimos métodos se destacam pela produção de derivados nas formas de metil ou etil éster, em substituição aos métodos que utilizam altas temperaturas e solventes orgânicos (RUBIO-RODRÍGUEZ et al., 2010).

Desde a determinação da importância do consumo de ácidos graxos polinsaturados ômega-3, inúmeros estudos foram realizados buscando definir os valores ideais de ingestão diária, então surgiram problemas relativos à grande quantidade de peixe ou de óleo de peixe necessária para suprir as exigências diárias. Com isso, ocorreu uma busca pelo desenvolvimento de compostos mais concentrados, sendo desenvolvido compostos com 30 a 90% de EPA e DHA nas formas de ácidos graxos livres, ésteres etílicos ou triacilgliceróis reestruturados (DYERBERG et al., 2010).

Segundo Tsai et al. (2012), a crescente demanda de concentrados de EPA e DHA vem sendo requerida no comércio global e para se obter altas concentrações destes não é possível apenas refinar e destilar o óleo de peixe natural, pois estes ácidos graxos se encontram principalmente na posição sn-2 dos triacilgliceróis. Para tanto, os triacilgliceróis são submetidos a uma transesterificação com álcool etílico obtendo EPA e DHA na forma de éster etílico (MOGELSON; PIEPER; LANGE, 1984).

O éster etílico de óleo de peixe, quando pré-tratado com uréia e posteriormente fracionado, pode chegar a concentrações de até 39,0 e 65,6% de EPA e DHA, respectivamente (HWANG; LIANG, 2001).

Experimentos clínicos têm demonstrado que os ácidos graxos EPA e DHA na forma de triacilgliceróis apresentam diferenças na potencialidade aparente (absorção e utilização). Na forma de éster etílico, ambos ácidos têm menor disponibilidade para a pronta absorção, quando comparado à forma de triacilgliceróis ou à forma de ácidos graxos livres. Entretanto as concentrações muito mais elevadas de EPA e DHA levam a um total absorvido superior (BECKERMANN; BENEKE; SEITZ, 1990). Conforme Dyerberg et al. (2010), a

biodisponibilidade de EPA e DHA pode diferir entre as formas mais utilizadas de suplementação, triacilgliceróis reestruturados apresentam absorção superior, enquanto ácidos graxos livres apresentam absorção intermediária, não diferindo do óleo peixe, já o éster etílico os menores valores, entretanto estes valores foram obtidos em um curto prazo de estudo (duas semanas) podendo ser observado resultados distintos em estudos com períodos de suplementação superiores e valores diários de suplementação diferentes dos testados (3,5 g/dia).

1.7 Alimentos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3

O mercado de produtos alimentícios enriquecidos com ácidos graxos polinsaturados ômega-3 está em crescimento e a demanda por estes produtos vem aumentando desde a década de 90, principalmente com produtos voltados para consumidores especiais, que envolvem crianças, mulheres grávidas, lactantes e outras pessoas preocupadas com saúde e bem estar (KOLANOWSKI; LAUFENBERG, 2006).

Um consumo regular de peixe é a forma mais direta de se elevar os níveis de EPA e DHA no sangue (KOLANOWSKI et al., 2007). Contudo, devido ao baixo consumo diário de ômega-3 e as recomendações das organizações mundiais têm estimulado um aumento na concentração destes ácidos em produtos de origem animal pela suplementação direta da dieta animal com derivados de peixe (IAFELICE et al., 2008; KOLANOWSKI; LAUFENBERG, 2006). Além disto existe uma recomendação de incorporação desses nutrientes em alimentos processados enriquecidos com o óleo de peixe líquido ou em pó (KOLANOWSKI et al., 2007).

Sanguansri e Augustin (2007) afirmam que os produtos enriquecidos com ômega-3 podem ser encontrados em diversas formas, como comida para animais, suplementos dietéticos, produtos lácteos, peixes processados, produtos cárneos, ovos, *snacks*, alimentos infantis (segmento de maior foco em pesquisas), produtos de panificação e bebidas.

Muitos alimentos enriquecidos com ômega-3 podem ser encontrados nos mercados da Europa, da Austrália, do Canadá, dos Estados Unidos e da América do Sul, alguns destes expostos na Tabela 2.

Segundo Kolanowski et al. (2007), os produtos mais adequados para se adicionar óleo de peixe (líquido ou microencapsulado) são óleos para salada, cremes vegetais, iogurte flavorizado e formulações baseadas em leite em pó instantâneo com alto teor de gordura e baixo teor de água. Sucos de frutas com baixo pH podem acelerar a hidrólise e oxidação do óleo, sendo evitado com a retirada de oxigênio e adição de antioxidante. Outras aplicações possíveis são biscoitos, sopa em pó (preparado imediatamente antes do consumo) e pão.

Tabela 2. Alimentos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3 encontrados no mercado mundial.

Alimentos	Teores de ômega-3
Ovos	50 a 150 mg de DHA/ ovo
Produtos lácteos	10 a 190 mg de EPA + DHA / 200 mL de leite ou iogurte
Margarinas, pastas e molhos para saladas	15 a 107 mg de EPA + DHA / 10 g
Cereais e barras de cereais	2 a 5,3 g / 55 g de porção de EPA e DHA
Fórmulas infantis	60 mg de DHA/ 113 g de porção
Massas e pães	10 a 300 mg de ácidos graxos ômega-3 / porção

Fonte: WHELAN; RUST, 2006.

2 Microencapsulação

A microencapsulação é a técnica de aprisionar componentes (núcleo, recheio ou ativo) em um material secundário (encapsulante, material de parede, carreador ou cobertura) transformando-os em pequenas partículas sólidas, geralmente microcápsulas que variam de 1 a 500 μm (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2007).

Embora as técnicas de microencapsulação sejam conhecidas e estudadas desde a década de 30, os primeiros estudos na área de alimentos foram iniciados nos anos 60, com a microencapsulação de óleos essenciais para a prevenção da oxidação e da perda de compostos voláteis e para o controle da liberação do aroma (VILSTRUP, 2001). Segundo Gouin (2004), existe um interesse crescente de pesquisadores no potencial oferecido pela microencapsulação e isto se comprova pelo grande aumento no número de publicações ao longo dos anos.

Segundo Sanguansri e Augustin (2007) e Favaro-Trindade, Pinho e Rocha (2008) os propósitos gerais da microencapsulação são: transformar um líquido em sólido, de modo a facilitar sua manipulação, seu transporte e sua adição em formulações; separar materiais reativos; reduzir toxicidade do material ativo; promover liberação controlada do ativo encapsulado; reduzir volatilidade ou inflamabilidade de líquidos; mascarar sabor e odor de determinados componentes; aumentar a vida de prateleira e proteger contra a luz, umidade e calor.

Normalmente, três fases estão envolvidas na formação da microcápsula: preparação de uma solução contendo o material de parede e o recheio, deposição do material de parede ao redor do recheio e fixação ou solidificação da estrutura da parede (BAKAN, 1973).

Muitas técnicas são utilizadas para microencapsulação, podendo ser divididas em métodos físico-químicos (coacervação simples ou complexa, separação por fase orgânica, envolvimento lipossômico), métodos físicos (*spray drying*, *spray coating*, *spray chilling*, leite fluidizado, extrusão, centrifugação com múltiplos orifícios, co-cristalização, liofilização) e métodos químicos (polimerização interfacial, inclusão molecular) (GIBBS et al., 1999).

A escolha do método de encapsulação depende das propriedades do recheio, especialmente a solubilidade, e do tipo de partícula desejada para proteção e liberação controlada, além da finalidade (morfologia, estabilidade, mecanismo de liberação) e das circunstâncias envolvidas na manufatura do produto. Contudo a técnica de *spray drying* tem sido mais utilizada

industrialmente, por limitações de custo e dificuldade de produção em grande escala dos outros métodos, além de pouca disponibilidade de materiais de parede naturais e incompatibilidade com os produtos finais (LEE; YING, 2008). Porém, segundo Kolanowski et al. (2007), *spray drying* resulta em partículas porosas, e isto pode aumentar a susceptibilidade à oxidação do material de recheio, na presença de oxigênio.

Outro ponto crítico na microencapsulação é a seleção adequada dos materiais de parede em função do ingrediente ativo, do sistema no qual este será aplicado e dos mecanismos de liberação (DAVIDOV-PARDO et al., 2008). Estes materiais podem ser gomas (goma arábica, goma lacuste, agar), lipídios (cera, gordura de palma), proteínas (gelatina, proteínas do leite, proteínas da soja), polissacarídeos (amidos, goma xantana, goma guar, alginato) e mono, di e oligossacarídeos (amidos hidrolisados, lactose) (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2007; DRUSCH et al., 2007).

Os mecanismos de liberação dos materiais ativos microencapsulados variam de acordo com a natureza do agente encapsulante, sendo que normalmente ocorrem devido a variação de temperatura e de pH, solubilidade do meio, biodegradação, difusão, ruptura mecânica, permeabilidade seletiva e gradiente de concentração existente em relação ao meio de liberação (BAKAN, 1973; FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008). Também, a espessura da cobertura da microcápsula pode ser modificada de modo que a estabilidade e a permeabilidade sejam alteradas (BAKAN, 1973).

Pelo fato das técnicas de microencapsulação oferecerem a possibilidade de proteção e liberação controlada de ingredientes funcionais lipofílicos em alimentos, podem ser utilizadas para a suplementação de alimentos com ácidos graxos ômega-3 (DRUSCH et al., 2007).

2.1 Microencapsulação pelo processo de coacervação

O processo de coacervação é uma alternativa para a microencapsulação de compostos sensíveis a temperaturas elevadas e a determinados solventes orgânicos, visto ser um processo físico-químico que não utiliza solventes orgânicos nem necessita de temperaturas drásticas e normalmente são encapsulados ingredientes sólidos ou líquidos insolúveis em água (GOUIN, 2004).

A coacervação é definida como a separação de duas fases em um sistema coloidal (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2007). O sistema de microencapsulação por coacervação pode conter um ou mais hidrocolóides e a subsequente separação se dá pela deposição do coacervado recém formado em volta do ingrediente ativo (recheio) suspenso ou emulsificado no mesmo meio de reação. A parede do hidrocolóide pode receber ligações cruzadas utilizando agente químico ou enzimático apropriado, se necessário. Tendo em vista a proibição do uso de glutaraldeído, agente químico reticulante, para realizar as ligações cruzadas na produção de cápsulas para uso alimentício, algumas pesquisas têm sido desenvolvidas a respeito da utilização de enzimas, como a transglutaminase, além compostos como gliceraldeído e ribose (GOUIN, 2004).

Coacervação simples ocorre em sistemas que contêm somente um soluto coloidal (ex. somente gelatina), enquanto que na coacervação complexa os sistemas contêm mais de um soluto, exemplo gelatina e goma arábica (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2007). Na Figura 3 é apresentado um esquema geral do processo de coacervação complexa.

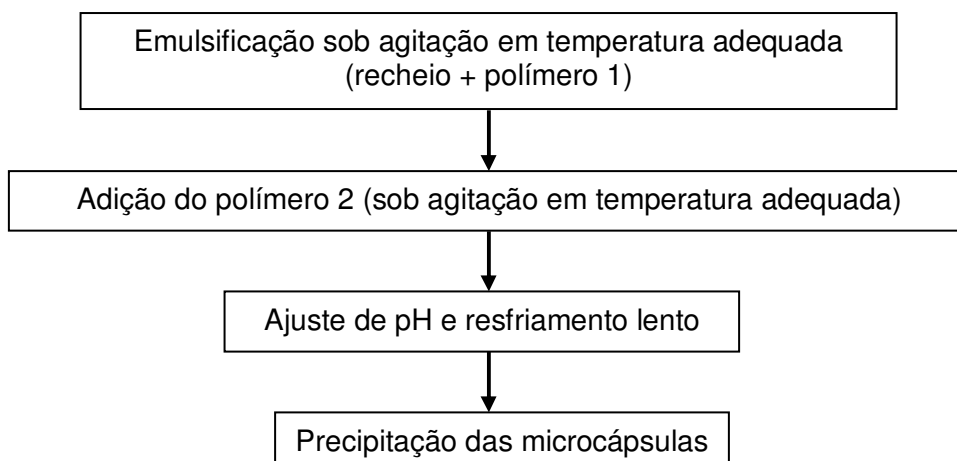


Figura 3. Modelo esquemático de microencapsulação por coacervação complexa.

Para que ocorra a separação espontânea de fases na coacervação complexa, com a formação de um complexo insolúvel entre dois ou mais polímeros, duas condições devem ser atendidas: os biopolímeros devem estar juntos em solução e as cargas opostas entre as suas cadeias devem estar em quantidades estequiométricas. A composição e concentração dos polímeros de parede, condições do meio como pH e força iônica estão diretamente relacionados com a eficiência de encapsulação e com características variadas de estrutura, tamanho e porosidade (YEO et al., 2005).

As microcápsulas obtidas por coacervação podem ser classificadas em dois grupos de acordo com sua estrutura interna: mononucleadas e multinucleadas. Quando uma única gota de óleo é encapsulada por coacervação é formada uma partícula mononucleada. As microcápsulas multinucleadas possuem estrutura tipo matriz e podem liberar o recheio lentamente a não ser que a parede tenha sido rompida. Pelo contrário, as microcápsulas mononucleadas possuem estrutura tipo reservatório e liberam todo o recheio rapidamente, além de, em alguns casos, serem desuniformes devido ao material de parede não ser distribuído igualmente pela superfície da gota de recheio. A parte mais fina da camada de parede estará mais susceptível ao rompimento e liberação do recheio. Com isto, as microcápsulas multinucleadas possuem maior controle de liberação e são

facilmente produzidas, sendo mais interessante para produção industrial e aplicação (DONG et al., 2007).

As microcápsulas produzidas por coacervação podem apresentar pequenos diâmetros, variando de 1 a 500 μm para a coacervação complexa e de 20 a 500 μm para a coacervação simples (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008) e alta eficiência de encapsulação, podendo conter de 85 a 90% de material de recheio para materiais lipofílicos, como óleos vegetais, e vitamina A, recobertos por uma cobertura hidrofílica, como gelatina ou gelatina/goma arábica (KOLANOWSKI et al., 2007).

Tendo em vista as vantagens da coacervação complexa, trabalhos vêm sendo realizados, como a microencapsulação de óleo ricos em ômega-3 através desta técnica. Tais como Jouzel et al. (2003), que otimizaram os parâmetros de processo da microencapsulação de óleo de fígado de bacalhau em matriz de gelatina/goma arábica. Também Lamprecht, Schafer e Lehr (2001), avaliaram as condições de reticulação de microcápsulas coacervadas com gelatina/goma arábica contendo éster etílico de EPA e observaram que o processo de enrigecimento das cápsulas por *spray dryer* resultou em menor estabilidade oxidativa.

Wu, Chai e Chen (2005) avaliaram a microencapsulação de óleo de peixe por coacervação simples utilizando hidroximetilcelulose e maltodextrina e reportaram que a formação, eficiência de retenção e características dos coacervados foram afetados por vários fatores, tais como concentração, proporção, peso molecular e solubilidade em água dos materiais encapsulantes, sendo necessária a otimização dos parâmetros do processo.

Este método apresenta a desvantagem de ser necessário manter-se um controle crítico das concentrações do material coloidal e do iniciador da coacervação, pois a coacervação ocorrerá somente dentro de uma limitada faixa de pH, concentração de colóide e/ou de eletrólito (THIES, 1995). Na etapa de isolamento das cápsulas, após a coacervação, também se tem estudado métodos

para que não elevem demasiadamente os custos do processo e não danifiquem a integridade da cápsula (GOUIN, 2004).

Para contornar as dificuldades envolvidas nesta tecnologia, como a necessidade de reticulação, tem se desenvolvido diversos processos, por exemplo, a coacervação mediante controle de pH e rápido abaixamento de temperatura, ou a microencapsulação por coacervação em camadas múltiplas (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2007).

2.2 Processos de reticulação com enzimas

Segundo Lantto (2007), a enzima transglutaminase (TG) pode ser encontrada em diversos tecidos de origem animal e vegetal, sendo que as pesquisas para sua obtenção e aplicação foram impulsionadas pela evolução biotecnológica ocorrida a partir da descoberta de sua produção por microrganismo como *Streptomyces mobaraense* (ANDO et al., 1989) *S. ladakanum* (TSAI; LIN; JIANG, 1996), *S. cinnamoneum* (DURAN et al., 1998) e *Bacillus subtilis* (KOBAYASHI et al., 1998; SUZUKI et al., 2000). O processo de obtenção desta enzima foi desenvolvido por fermentação microbiana (*Streptoverticillium sp.* e *Streptomyces sp.*), fato que a tornou mais acessível para escala industrial e consequentemente mais adequada para uso, considerando o custo de aplicação (CARVALHO; GROSSO, 2004).

A enzima TG (E.C. 2.3.2.13; R-glutamil-peptídeo: amina g-glutamil transferase) catalisa reações de acil transferência, formando ligações cruzadas intra e intermoleculares em proteínas, peptídeos e aminas primárias, principalmente através de ligações covalentes entre resíduos de glutamina e lisina, sendo sua eficiência na formação destas ligações cruzadas dependentes da estrutura molecular da proteína (GRIFFIN; CASADIO; BERGAMINI, 2002; CHAMBI; GROSSO, 2006). Como um resultado da ligação cruzada dos peptídeos da glutamina e lisina ocorre a formação de polímeros de alto peso molecular. Além

das reações de ligação cruzada, outras duas reações são catalisadas pela TG, a desamidação e inserção de grupos amina, evitando assim que os grupamentos de glutamina se transformem em resíduos de ácido glutâmico e altere a efetividade das ligações cruzadas (ZHU et al., 1995; SHARMA; LORENZEN; QVIST, 2001).

Alguns estudos utilizando a TG vêm sendo publicados na literatura reportando a sua capacidade de realização de ligações cruzadas em várias proteínas, tais como as proteínas miofibrilares (KAHN; COHEN, 1981), proteínas de leite (JAROS et al., 2006), proteínas de clara e gema de ovo (SAKAMOTO; KUMAZAWA; MOTOKI, 1994; LIM; MINE; TUNG, 1998), proteínas de peixe (JOSEPH; LANIER; HAMANN, 1994), proteínas de cereais (BASMAN; KÖKSEL; NG, 2002) e proteínas de soja (IKURA et al., 1980; NIO; MOTOKI; TAKINAMI, 1985; KANG et al., 1994; BABIKER, 2000; CHO; SHIM; PARK, 2003; SERNA-SALDIVAR et al., 2006).

Em alguns estudos mais específicos, como os direcionados às proteínas do soro, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, Aboumahmoud e Savello (1990) concluíram que estas apresentam dificuldade de formar ligações entre glutamina e lisina com o uso de TG, necessitando ajuste de pH (valores entre 6,5 a 8,5), adição de íons Ca^{2+} e ditiotretol, se comparadas com soro reconstituído comercial e pó de soro modificado que não necessitam de nenhum ajuste. Outro trabalho foi desenvolvido por Cho, Shim e Park (2003), onde concluem que o isolado protéico de soja (IPS) oferece uma boa capacidade de formação de gel sob a ação de enzimas como a TG, enquanto outras proteínas (isolado protéico de soro, caseinato de sódio e proteína solúvel de trigo) apresentam pobre capacidade de formação de gel, sendo que a concentração da TG influencia diretamente na formação de gel a partir do isolado protéico de soja. Outros estudos utilizando TG em proteína de soja indicam a sua efetividade no aumento da habilidade de absorção de água e de formação de gel desta proteína (BABIKER, 2000).

As microcápsulas produzidas por coacervação complexa, apesar da vantagem de encapsularem grandes quantidades de recheio, apresentam baixa

resistência mecânica e térmica devido à natureza iônica das interações entre os polímeros formadores, sendo necessário produzir um fortalecimento da parede através de reticulação, em geral envolvendo a proteína, que pode ser feito utilizando-se reticulantes químicos ou enzimáticos (BURGESS; PONSART, 1998). Segundo Mascarenhas (2010), uma opção com muito progresso nos estudos como agente reticulante de microcápsulas, com uso permitido em alimentos é a enzima transglutaminase (TG).

2.3 Microencapsulação pelo processo de gelificação enzimática

Poucos trabalhos são encontrados na literatura referentes à técnica de gelificação enzimática. Esta metodologia de microencapsulação foi desenvolvida por Cho, Shim e Park (2003), a qual se baseia na formação de uma dupla-emulsão sugerida por Lee e Rosenberg (2000). As metodologias se diferenciam pelo fato da primeira utilizar a enzima transglutaminase para o processo de formação de gel e endurecimento da parede das cápsulas formadas, sendo que na segunda metodologia ocorre a formação de gel por ação de elevadas temperaturas.

A metodologia descrita por Cho, Shim e Park (2003) requer maior detalhamento e segue descrita posteriormente:

Inicialmente a proteína deve ser dissolvida em de água deionizada, adicionando-se a enzima transglutaminase (TG), em temperatura ambiente e pH 6,0. A primeira emulsão é formada pela mistura do material lipídico a ser encapsulado na dissolução inicial por 10 minutos, a uma determinada velocidade de agitação. Para formação da segunda emulsão, utiliza-se óleo de milho pré-aquecido, adicionando-se emulsificante mono-oleato de sorbitana (Span 80). Imediatamente após o preparo da primeira emulsão, esta deve ser lentamente adicionada ao óleo de milho e emulsificante, sob leve agitação magnética. Cessada a mistura após 1 minuto de agitação, a dupla-emulsão deve ser mantida a 37 °C por tempo necessário a formação das microcápsulas.

As cápsulas após este período devem ser filtradas e lavadas para a retirada do material lipídico aderido. Posteriormente as microcápsulas devem ser secas, por processo adequado.

Outro trabalho que utiliza esta técnica foi publicado por Davidov-Pardo e colaboradores no ano de 2008, com posterior aplicação das cápsulas em produtos de panificação.

2.4 Biopolímeros para microencapsulação

2.4.1 Biopolímeros utilizados na coacervação complexa

Os biopolímeros ideais para serem empregados na coacervação complexa são aqueles que apresentam propriedades coloidais hidrofílicas, densidades de cargas adequadas e cadeias lineares. Alguns exemplos de biopolímeros passíveis de serem utilizados são: gelatinas, alginatos, albuminas, caseína, ágar, gomas, pectinas, etc (THIES, 1995). Na Tabela 3 estão apresentados alguns biopolímeros que vêm sendo estudados nos últimos anos.

Diversos hidrocolóides podem ser utilizados na produção de microcápsulas, porém o sistema mais estudado é gelatina/goma arábica. Esta técnica resulta em elevada eficiência de encapsulação, sendo utilizada, principalmente, para encapsular *flavors*, além de óleos de peixe, vitaminas, conservantes, enzima, entre outros. As partículas obtidas podem ter diversas aplicações, em indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos (GOUIN, 2004).

Tabela 3. Trabalhos realizados em microencapsulação por coacervação com diferentes biopolímeros e materiais de recheio.

Material de parede	Recheio	Autores
Gelatina / Goma arábica	Óleo de soja, azeite de oliva e óleo de amendoim	RABIŠKOVÁ; VALASKOVÁ (1998)
Gelatina / Goma arábica	EPA	LAMPRECHT; SCHÄFER; LEHR (2000)
Gelatina / Goma arábica	EPA	LAMPRECHT; SCHÄFER; LEHR (2001)
Gelatina / Goma arábica	Óleo de peixe	JOUZEL et al. (2003)
Proteína de soro / Goma arábica	Óleo de girassol, óleo essencial de limão e de laranja	WEINBRECK; MINOR; DE KUIF (2004)
Hidroxipropil metilcelulose	Óleo de peixe	WU; CHAI; CHEN (2005)
Gelatina / Goma arábica	Oleoresina e óleo de soja	ALVIM (2005)
Gelatina / Goma arábica	Flavor de produtos de panificação na forma oleosa	YEO et al. (2005)
Gelatina / Pectina/Goma arábica	Óleos	PRATA (2006)
Gelatina / Goma arábica	óleo de menta	DONG et al. (2007)
Gelatina	Estigmasterol	OLIVEIRA (2007)
Gelatina de peixe / Goma arábica	Óleo de salmão	BUENO (2008)
Isolado protéico de soja / Pectina (BM)	Hidrolisado de caseína	MEDANHA et al. (2009)
b-Lg isolada bovina / Pectina (BM)	DHA	ZIMET; LIVNEY (2009)
Gelatina / Polifosfato	Éster etílico de óleo de peixe	BARROW; NOLAN; HOLUB (2009)
Gelatina / Goma arábica	Substancias aromáticas	LECLERCQ; MILO; REINECCIUS (2009)
Gelatina / Goma arábica	Óleo de soja e óleo resina de páprica	CÉLIS (2009)
Gelatina / Goma arábica	1-Dodecanol (C12OH)	KONG et al. (2009)
Mistura de HPMC, NaCMC e SDS (*)	Óleo de girassol	KATONA; SOVILJ; PETROVIC (2010)
Isolado protéico de soja / Goma arábica	Óleo essencial de laranja	JUN-XIA; HAI-YAN; JIAN (2011)

(*): hidroxipropilmetil celulose (HPMC), carboximetil celulose de sódio (NaCMC) e Dodecil sulfato de sódio (SDS)

Adaptado de: MASCARENHAS, 2010.

2.4.2 Goma arábica

As gomas são normalmente polissacarídeos de interesse para a indústria de alimentos. O termo goma é utilizado para referir-se a um grupo de polissacarídeos ou seus derivados, obtidos a partir de plantas (exsudados, extratos, sementes e algas) ou substâncias excretadas por bactérias. A obtenção de goma arábica a partir de plantas do gênero *Acácia* ocorre com a exsudação das árvores como resposta a algum dano à planta (COULTATE, 2004).

A goma arábica também é denominada goma acácia, sendo a mais antiga das gomas conhecidas (2.650 a.C.), com relatos históricos de sua utilização em cosméticos, perfumes, ingredientes para mumificação e cola desde o antigo Egito (PRATA, 2006; BUENO, 2008; CÉLIS, 2009; MASCARENHAS, 2010).

Esta goma é um polissacarídeo complexo que apresenta três frações de tamanhos moleculares distintos e uma parte protéica correspondente a aproximadamente 2% da molécula, que lhe confere características emulsificantes e estabilizantes (IDRIS; WILLIAMS; PHILLIPS, 1998; MAHENDRAN et al., 2008). Ela possui uma estrutura altamente ramificada (Figura 4), apresentando formato de elipsóide achatado fino (SANCHEZ et al., 2008). A cadeia principal é formada por unidades de 1,3- β -D-galactopiranosose unidas por ligações glicosídicas, à qual estão ligadas cadeias laterais com diferentes estruturas químicas formadas por D-galactopiranosose, L-ramnose, L-arabinose e ácido D-glucurônico, ligadas à cadeia principal por ligações $\beta(1,6)$. O polissacarídeo natural está na forma de sal, que por acidificação é transformado no ácido correspondente, ácido arábico (BOBBIO; BOBBIO, 1992). Em pH acima de 2,2 é negativamente carregada e a baixos pH (< 2,2) a dissociação dos grupos carboxila é suprimida (PRATA, 2006; BUENO, 2008; CÉLIS, 2009).

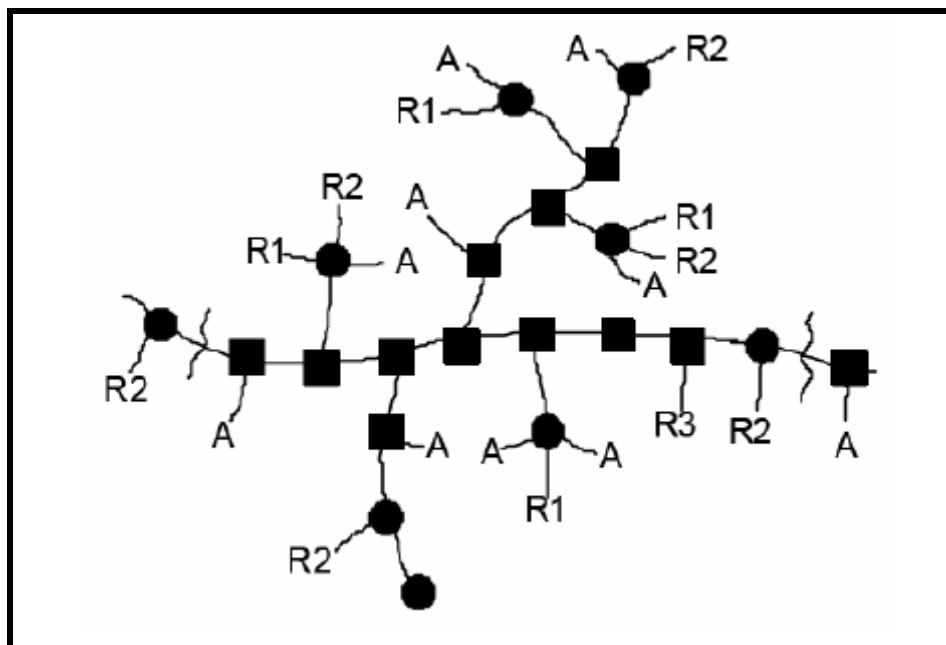


Figura 4. Estrutura molecular da goma arábica.

Onde: A = arabinosil; Radicais baseados em R1= ramnose, R2=ácido gulucurônico, R3= arabinose.

Fonte: ISLAM et al., 1997; CELIS, 2009.

Segundo Glicksman (1983), as principais espécies produzidas são *Acacia senegal*, *Acacia seyal* e *Acacia laeta*. Estas possuem diferentes propriedades físicas e composição química, sendo que existe uma variação entre os teores de nitrogênio de 0,14 a 0,65%, de metoxila entre 0,25 a 0,94%, a composição sacarídica após hidrólise também varia (galactose 38 a 44%; arabinose 27 a 29%; ramnose 4 a 13%; ácidos glucurônicos 6,5 a 14,5; 4-O-ácidos metaglugurônicos 1,5 a 5,5%). A espécie mais utilizada para microencapsulação é a *Acacia senegal*.

A goma arábica possui boas propriedades que possibilitam sua aplicação em processos de encapsulação de óleos e substâncias voláteis (LEE; YING, 2008). Suas características de alta solubilidade, baixa viscosidade em altas concentrações, características de emulsificação e sua boa capacidade de retenção de recheio na encapsulação de compostos voláteis são provenientes do

seu baixo peso molecular, aproximadamente 250.000 Da (RENARD, 2008). Características estas que a tornam muito versátil para a maioria dos processos de microencapsulação. Entretanto, este material de parede apresenta um elevado custo se comparado com outros materiais como a maltodextrina (KENYON, 1995; SHIGA; YOSHII; NISHIYAMA, 2001).

Como vários dos materiais de recheio são insolúveis em soluções aquosas, a formação de emulsões é necessária e se torna uma propriedade significativa para levar em consideração na seleção de um material de cobertura adequado. A goma arábica possui vantagens por ter esta propriedade emulsificante em ampla faixa de pH, além de outras como texturização, formação de filme ao redor das gotículas de óleo e propriedades ligantes (SHAHIDI; HAN, 1993; PRATA, 2006; GHARSALLAOUI et al., 2007; LEE; YING, 2008).

2.4.3 Materiais protéicos

Os filmes protéicos geralmente são excelentes barreiras ao oxigênio e a aromas e são utilizados para a produção de microcápsulas através de várias técnicas, das quais podem ser citadas coacervação simples ou complexa seguida de reticulação ou gelificação térmica (LEE; ROSENBERG, 2000).

2.4.3.1 Gelatina

A gelatina é um composto protéico solúvel obtido pela hidrólise parcial do colágeno, um dos principais constituintes dos músculos, cartilagens e peles. Entretanto a sua origem, a idade do animal e o tipo de colágeno são fatores intrínsecos que influenciam diretamente as suas propriedades de formação de filmes e emulsificação (JOHNSTON-BANKS, 1990; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

A extração da gelatina pode ser realizada em diferentes temperaturas (de 60°C a 90°C) e pH, sendo que a escolha do pH é feita visando a maximização da taxa de extração e a manutenção de suas propriedades físicas (CARVALHO, 2002). Dois tipos de gelatina são disponíveis comercialmente, conhecidos como gelatina tipo A, cujo ponto isoelétrico (pI) é em pH próximos a 8, e tipo B (pI em pH próximo a 4), obtidas respectivamente por pré-tratamento ácido, com ácido clorídrico ou sulfúrico e alcalino, com carbonato de sódio (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

A gelatina pode ser usada como um agente espumante, emulsificante e umectante em produtos alimentícios, farmacêuticos, aplicações médicas e técnicas devido às suas propriedades tensoativas (BALTI et al., 2011). As gelatinas tipo A, com seu elevado ponto isoelétrico (maior que 7) possuem a habilidade de formar emulsões óleo/água com cargas positivas em uma gama variada de valores de pH, como é conseguido com as proteínas emulsificantes convencionais, tais como proteínas de soja, de soro e caseína (DICKINSON; LOPEZ, 2001). Esta possui geralmente 14% de umidade, 84% de proteína e 2% de cinzas (BUREY et al., 2008).

Segundo Sanguansri e Augustin (2007), a gelatina tem boa solubilidade em água, o que é interessante para o processo de coacervação, torna-se um material de parede resistente e não libera o recheio em meio aquoso com a promoção de sua coagulação através de temperatura ou pH. As proteínas dissociadas em água possuem cargas elétricas dependentes do pH da solução e do seu pI, por isso a necessidade de controle de pH no processo de coacervação e o pI alto da gelatina, garantindo grande quantidade de cargas positivas para a coacervação com polissacarídeos carregados negativamente.

Complexos coacervados de gelatina com polímeros aniônicos na forma de microcápsulas apresentam especial interesse para encapsular componentes funcionais e promover a proteção contra oxidação ou degradação durante a estocagem. Além disto, podem ser utilizados para se obter a liberação controlada

destes compostos em produtos alimentícios ou como embalagens bioativas quando ingeridos por seres humanos (SCHRIEBER; GAREIS, 2007). Esta proteína quando utilizada para a microencapsulação por coacervação complexa pode produzir partículas de 50–400 μm (BUREY et al., 2008).

2.4.3.2 Isolado protéico de soro

O isolado protéico de soro é um composto que contém no mínimo 90% (b.s.) das proteínas presentes no soro do leite de vaca, das quais as principais constituintes são a β -lactoglobulina e α -lactoalbuma, proteínas globulares organizadas em uma estrutura tridimensional compacta que possuem importantes propriedades físico-químicas e funcionais, além de um elevado valor nutricional devido seu conteúdo em aminoácidos sulfurados, lisina e triptofano (MOTTA, 2002). Em média as proteínas do soro apresentam 18% de ácido glutâmico e 9% de lisina (MIZUBUTI, 1994). Estas proteínas podem ser extraídas do leite após o processo de fabricação do queijo e contêm alto teor de aminoácidos essenciais, especialmente os de cadeia ramificada (HARAGUCHI; ABREU, 2006). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a recomendação de consumo de proteínas varia de 0,75 g.kg⁻¹ para adultos a 1,85 g.kg⁻¹, para crianças de 3 meses a 6 anos (PELEGRINE; CARRASQUEIRA, 2008).

As proteínas do soro apresentam boas propriedades de emulsificação, gelificação e formação de filmes. Estas propriedades, especialmente a combinação das características de emulsificação e gelificação térmica, possibilitam a formação de cápsulas insolúveis em água sem a necessidade do uso de agentes reticulantes (LEE; ROSENBERG, 2000).

Na década de 70 os processos de produção de concentrados protéicos de soro foram substituídos pelos processos de osmose reversa e ultrafiltração/diafiltração, que utilizam membranas para separar as proteínas e

reduzir as concentrações de sais e lactose no produto final, fornecendo proteínas com boa solubilidade e melhores propriedades funcionais (MOTTA, 2002).

Muitas pesquisas vêm sendo realizadas utilizando proteínas de soro como material de parede no processo de microencapsulação de materiais de recheio voláteis e não voláteis, como exemplo, materiais lipídicos visando evitar sua oxidação (ROSENBERG, 1997). O processo de encapsulação mais pesquisado utilizando isolado protéico de soro e as proteínas de soro isoladas (β -lactoglobulina e α -lactoalbuma) é *spray drying*, mas também têm sido estudados processos de coacervação complexa, gelificação térmica e gelificação enzimática, entre outros (CHO; SHIM; PARK, 2003; WEINBRECK; MINOR; DE KUIF, 2004; ZIMET; LIVNEY, 2009).

2.4.3.3 Isolado protéico de soja

Proteínas de soja são normalmente classificadas em três grupos: farinha de soja, concentrado protéico de soja e isolado protéico de soja, com um conteúdo mínimo de proteínas de 50, 65 e 90% (base seca), respectivamente (EGBERT, 2004). Isolados protéicos de soja são praticamente livres de lipídios e carboidratos (McMINDS, 1991), apresentam de 2 a 4% de cinzas (HENN, 1997) e saponinas, fosfolipídios, isoflavonas e outros constituintes representam 3 a 4% (WOLF, 1970).

O isolado protéico de soja (IPS) é produzido a partir de flocos/farinha de soja (subproduto da extração de óleo de soja) usando uma diluição alcalina (pH 8-9) com subsequente centrifugação para a remoção dos materiais insolúveis, resultando em um extrato protéico de soja contendo proteínas solúveis, oligossacarídeos e minerais. A acidificação do extrato protéico de soja para pH 4,5 utilizando ácidos de grau alimentício (ácido fosfórico ou ácido hidrocloreídrico) causa a seleção das proteínas devido a sua precipitação e concentração. Uma lavagem subsequente deste concentrado para a remoção das proteínas não

solúveis, neutralização (pH 7) e secagem por *spray drying* produzem o IPS (ALIBHAIA et al., 2006).

Isolado protéico de soja tem sido usado com sucesso para microencapsulação de caseína hidrolisada pelo processo *spray drying* (MOLINA-ORTIZ et al., 2009), de óleo essencial de laranja por coacervação complexa (JUNXIA; HAI-YAN; JIAN, 2011) e de óleo de peixe pelo processo de gelificação enzimática (CHO; SHIM; PARK, 2003; SERNA-SALDIVAR et al., 2006). IPS é um composto anfótero e tem um ponto isoelétrico de pH 4,5, indicando que este apresenta potencial para a aplicação como material de parede em processos de microencapsulação por coacervação complexa. Além disto, estudos realizados por Kim e Morr (1996), indicaram que o IPS apresenta maior compatibilidade com goma arábica que outros polímeros.

Além da funcionalidade como material de parede o IPS apresenta valor nutricional reconhecido, servindo de fonte de vários aminoácidos essenciais, principalmente uma mistura de glicina e β -conglucina globulares (conhecidas como as frações 11S e 7S) que representam mais de 85% das proteínas totais (JARAMILLO; ROBERTS; COUPLAND, 2011). Segundo Vieira, Cabral e Oliveira (1999), em média as proteínas de soja apresentam 6% de lisina e 20% de ácido glutâmico, seu principal aminoácido. O *Food and Drug Administration* (FDA), em 1999 aprovou que alimentos enriquecidos com proteínas de soja apresentem apelo funcional para a redução ao risco de doenças coronárias, caso contenham 6,25 g de proteínas de soja por porção (WRICK, 2003).

2.5 Microencapsulação de ácidos graxos ômega-3

Os óleos ricos em ácidos graxos ômega-3, como o óleo de peixe, estão muito sujeitos à deterioração oxidativa, devido à presença de um grande número de insaturações e, levando consequentemente a perdas nutricionais e ao desenvolvimento indesejado de produtos tóxicos, como alguns peróxidos, e

aromas estranhos (*off-flavors*). Com isso, o enriquecimento de alimentos processados em elevadas temperaturas e mesmo que necessitem não alterar suas características sensoriais de aroma e sabor pode ser alcançado utilizando-se ômega-3 na forma de microcápsulas (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2007).

Além da susceptibilidade oxidativa, existe uma resistência de grupos de consumidores à ingestão de peixes ricos em ômega-3, fato que leva ao desenvolvimento de técnicas que facilitem a incorporação destes ingredientes em formulações alimentícias para sua fortificação (ACKMAN, 2005).

Nos últimos anos foram desenvolvidos diversos trabalhos envolvendo as técnicas de microencapsulação de ômega-3, incluindo patentes por coacervação complexa (CURTIS; ZHANG; JIN, 2005; LAMPRECHT; SCHAFER; LEHR, 2001; SUBRAMARIAN et al., 2008), *freeze drying* (HEINZELMANN et al., 2000; KLAYPRADIT; HUANG, 2008), *spray drying* (KOLANOWSKI; LAUFENBERG; KUNZ, 2004; CHAN; HEN, 2005; KOLANOWSKI et al., 2006; KOLANOWSKI et al., 2007; TAN), e por gelificação enzimática (CHO; SHIM; PARK, 2003; DAVIDOV-PARDO et al., 2008).

Vários materiais de parede têm sido testados para a microencapsulação de óleo de peixe (DAVIDOV-PARDO et al., 2008). Diaz-Rojas et al. (2004) utilizaram pectina, alginato de sódio e quitosana como material de parede através do processo de gelificação iônica.

O aumento da estabilidade de óleo de peixe foi verificado quando encapsulado com a mistura de hidroxipropilmetilcelulose, maltodextrina e goma acácia, com matrizes amorfas contendo trealose e a mistura de celulose e maltodextrina (KOLANOWSKI; LAUFENBERG; KUNZ, 2004; WU; CHAI; CHEN, 2005; DRUSCH et al., 2006). Entretanto, quando encapsulado em grânulos de amido de arroz/gelatina e recoberto com pectina e gelatina, o óleo apresentou uma rápida degradação quando estocado em estufa, a 45 °C (CARDOSO; GROSSO; VITALI, 2001). Já, Kolanowski et al. (2006), não conseguiram provar o aumento da estabilidade utilizando celulose modificada como material de parede.

No trabalho de Velasco, Dobarganes e Márquez-Ruiz (2000) é indicado que óleo de peixe microencapsulado pelo processo de *freeze drying*, pode apresentar um desenvolvimento de processos oxidativos devido à conformação da cápsula, materiais de parede utilizados e parâmetros do processo, assim como pelo processo de *spray drying*. Além disto, existem diferenças entre a estabilidade oxidativa do material encapsulado e do material que permanece na superfície da cápsula, dependendo das condições de estocagem e antioxidantes utilizados.

Outros trabalhos microencapsularam óleo de peixe utilizando proteínas de soro concentradas ou isoladas como materiais de parede, com ou sem adição de pectina através do processo de *spray drying*, e demonstraram o possível efeito da proteína β -lactoglobulina como agente antioxidante (TONG et al., 2000; HU; MCCLEMENTS; DECKER, 2003; ZIMET; LIVNEY, 2009).

Cho, Shim e Park (2003) e Davidov-Pardo et al. (2008) estudaram a capacidade de formação de filme utilizando a enzima transglutaminase e dupla-emulsão com subsequente gelificação enzimática em diferentes condições de processo utilizando isolado protéico de soja (IPS) como material de parede.

Em estudos de microcápsulas de ômega-3 aplicadas em produtos alimentícios Chávez-Servín, Castellote e López-Sabater (2008), estudaram o efeito da adição de ômega-3 microencapsulado em fórmulas infantis na degradação da lisina e da lactose e observaram um efeito negativo nestes parâmetros, porém que não afetaram a aceitação sensorial do produto final.

Em estudos de microcápsulas de ômega-3 aplicadas em produtos de panificação Yep et al. (2002), avaliaram o efeito do consumo de pequenas doses diárias de ácidos graxos ômega-3, através da ingestão de pão comercial comparativamente à suplementação com cápsulas e concluíram a existência de efeito positivo sobre a quantidade de EPA e DHA sanguíneos dos pacientes. Serna-Saldivar et al. (2006), determinaram o tempo de vida de prateleira de pães enriquecidos com DHA microencapsulado e óleo de peixe, estipulando o tempo de desenvolvimento de *off-flavors*. Davidov-Pardo et al. (2008), trabalharam com dois

métodos de microencapsulação (*spray drying* e método enzimático) e materiais de parede distintos e observaram alteração nas características tecnológicas e sensoriais de pães acrescidos de microcápsulas de ômega-3.

2.6 Análises relacionadas às microcápsulas

Quando se procura entender uma microcápsula, busca-se definir como esta foi obtida e de que modo pode ser reproduzida ou ainda determinar se as funções desejadas para sua aplicação foram obtidas. Com base nisto as principais características das microcápsulas devem ser consideradas, sendo que algumas destas são discutidas a seguir.

2.6.1 Caracterização estrutural

As caracterizações estruturais podem ser realizadas de forma geral ou uma caracterização externa e/ou interna das microcápsulas. Para tanto se utilizam técnicas de microscopia óptica, eletrônica e confocal. A avaliação da estrutura fina utiliza análises como difração de raios-X e análises térmicas. Outras avaliações comumente realizadas são a determinação do tamanho médio e distribuição do tamanho das partículas obtidos por meio de microscopia eletrônica e/ou analisador de tamanho de partículas. As composições da parede e do recheio podem ser determinadas por análise térmica, química, cromatográfica e por métodos espectroscópicos (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008 apud THIES, 1995).

2.6.2 Avaliações das condições de processos

Fatores como concentração, proporção entre materiais de parede, tamanho molecular, solubilidade relativa dos colóides e polímeros em água e dissolução em

solução aquosa podem afetar a formação, rendimento do processo e eficiência de encapsulação e as características do coacervado, sendo necessária a sua otimização. Contudo inúmeros estudos vêm sendo realizados para determinar os efeitos de concentração de polímeros, pH, adição de surfactantes, razão recheio/polímero, velocidade de homogeneização das emulsões, a fim de se maximizar o rendimento e a eficiência de encapsulação (LAMPRECHT et al., 2001).

No sentido de otimização dos processos de obtenção de microcápsulas, principalmente os que envolvem reações químicas, o estudo do potencial zeta das emulsões iniciais vem se tornando uma análise importante, principalmente para posteriores processos de coacervação complexa. A medida da estabilidade de uma dispersão é obtida através desta análise, onde valores altos (negativo ou positivo) indicam dispersões mais estáveis e valores baixos indicam instabilidade coloidal que pode levar à agregação (SALOPEK; KRASIC; FILIPOVIC, 1992).

Segundo Duce et al. (2004), o potencial zeta corresponde ao potencial eletrocinético da partícula medido na superfície desta, entre sua capa iônica e o meio que a envolve. A medida do potencial possibilita a determinação da faixa de pH apropriada para coacervação. Além da utilização de métodos visuais, com o surgimento de turbidez, pode se atribuir usualmente ao aparecimento de gotas coacervadas no meio. O potencial zeta é medido de maneira indireta, baseado na técnica de mobilidade eletroforética. A suspensão coloidal diluída a ser analisada é introduzida em uma cuba com dois eletrodos e aplica-se um potencial elétrico à suspensão. As partículas com carga elétrica líquida se deslocam na direção do eletrodo de carga contrária, tão mais rapidamente quanto maior a sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado. O quociente da velocidade de deslocamento pelo campo elétrico chama-se mobilidade eletroforética, expressa em $\text{m}^2/\text{V.s}$. Através de equação matemática esse valor se transforma em potencial zeta. Aparelhos de concepção mais moderna usam um laser modulado e medem o deslocamento *doppler* na luz espalhada pelas partículas (HOBECO, 2004).

2.6.3 Comportamento de liberação e aplicação

Nos últimos anos vem sendo estudado o comportamento de liberação, as propriedades físicas e a estabilidade desejadas de microcápsulas produzidas com diversos materiais de recheio e de parede por diferentes técnicas, visando aplicações específicas.

Estes estudos são realizados por meio da determinação do comportamento de liberação por gravimetria, análises microscópicas, térmicas, de raio-X, cromatográficas, de compressão estática, resistência ao cisalhamento, entre outras (THIES, 1995).

Entretanto, algumas das principais características vêm sendo pouco estudadas, a integridade do material encapsulado após processamentos é uma delas, podendo ser acompanhada por análises específicas, como composição do material encapsulado por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (YEO et al., 2005).

Outra análise possível é do teor de compostos resultantes de degradação lipídica, utilizando cromatografia de alta performance por exclusão de tamanho - HPSEC (VELASCO; DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUIZ, 2000). A cromatografia de alta performance por exclusão de tamanho tem por princípio a separação de compostos através da diferença de massa molar entre os compostos presentes no meio reacional, sendo assim também é uma técnica utilizada para a determinação de ésteres, neste caso, a ordem de eluição é triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ésteres e ácidos graxos livres (MOURA et al., 2006).

Uma metodologia inovadora que pode ser utilizada para a determinação de compostos lipídicos utilizados em microcápsulas, tanto como material de parede quanto de recheio, é a espectrometria de massa com ionização ambiente por *sonic-spray* (EASI-MS). Esta técnica de espectrometria de massa é considerada simples e suave por produzir íons sem a necessidade de aplicação de voltagem,

radiação ou aquecimento. EASI baseia-se na ionização *spray* supersônico (SSI) em pressão atmosférica, que cria microgotas de solvente carregadas (positiva ou negativamente) devido à distribuição estatística não-balanceada de cátions e ânions das amostras, utilizando normalmente metanol como solvente (LORDEIRO, 2011). O denso fluxo de microgotas carregadas promove a dessorção do analito da superfície, ionização, e transferência dos íons para a fase gasosa, conforme mostra a Figura 5 (SIMAS, 2010).

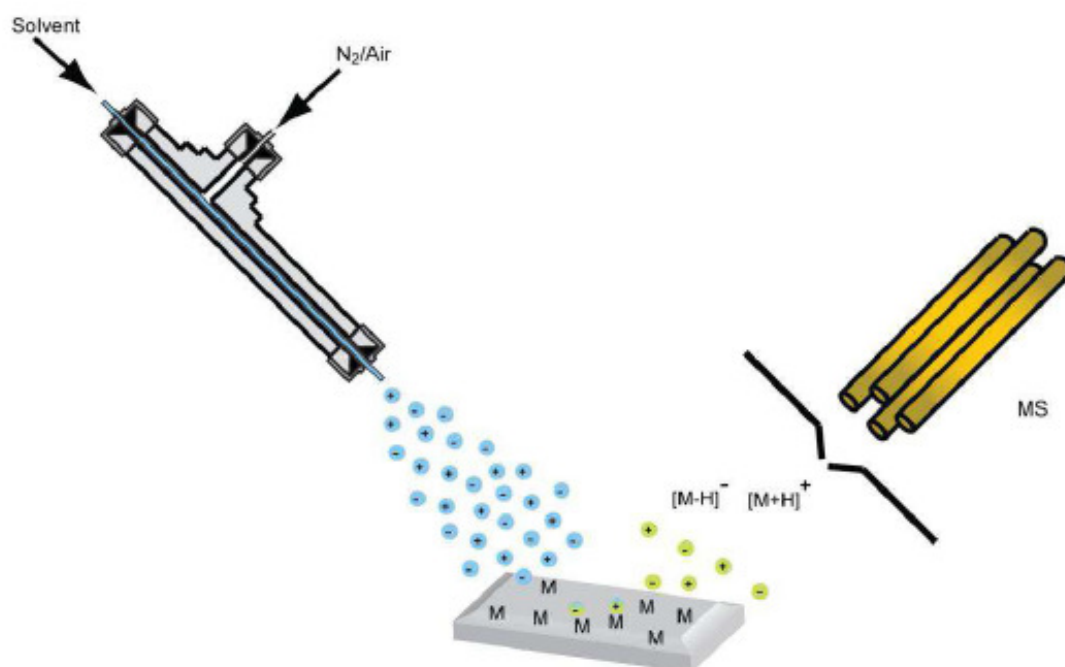


Figura 5. Esquema do processo de ionização EASI-MS.
(Fonte: SIMAS, 2010).

O EASI-MS tem sido aplicado com sucesso na análise de uma variedade de analitos e matrizes, tais como, perfumes (HADDAD et al., 2008), surfactantes (SARAIVA et al., 2009a), óleos vegetais (SARAIVA et al., 2009b; SIMAS et al., 2010) e biodiesel (SIMAS, 2010). Utilizando o módulo negativo, EASI(-)-MS, podem ser indentificados ácidos graxos livres, já no módulo positivo, EASI(+)-MS, pode-se observar ésteres, diacilgliceróis, triacilgliceróis e hidroperóxidos (SIMAS et al., 2010). Com base nisto, esta técnica pode ser utilizada para analisar a

composição de materiais microencapsulados e acompanhar a qualidade e integridade destes.

3. REFERÊNCIAS

ABOUMAHMOUD, R.; SAVELLO, P. Cross-linking of whey protein by transglutaminase. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 256-263, 1990.

ACKMAN, R.G. Fish oil. In: SHAHIDI, F. **Bailey's industrial oil and fat products**. John Wiley: New Jersey, 6 ed., v.3, p. 279-319, 2005.

ALIBHAI, Z.; MONDOR, M.; MORESOLI, C.; IPPERSIEL, D.; LAMARCHE, F. Production of soy protein concentrates/isolates: traditional and membrane technologies. **Desalination**, v. 191, p. 351-358, 2006.

ALVIM, I. D. **Produção e caracterização de micropartículas obtidas por spray drying e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes**. 2005, 243p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2005.

ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K.; MATSUURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; TANAKA, H.; MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganism. **Agricultural Biology and Chemistry**, v. 53, p. 2613-2617, 1989.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 18/03/2012.

BABIKER, E. E. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein. **Food Chemistry**, v. 70, p. 139–145, 2000.

BAKAN, J.A. Microencapsulation of foods and related products. **Food Technology**, v.27, n.11, p.34-44, 1973.

BALTI, R.; JRIDI, M.; SILA, A.; SOUISSI, N.; NEDJAR-ARROUME, N.; GUILLOCHORN, D.; NASRI, M. Extraction and functional properties of gelatin from the skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using smooth hound crude acid protease-aided process. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 943-950, 2011.

BANG, H. O.; DYERBERG, J.; NIELSEN A. B. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic west coast Eskimos. **Lancet**, p. 1143–1145, 1971.

BARROW, C. J.; NOLAN, C; HOLUB, B. J. Bioequivalence of encapsulated and microencapsulated fish-oil supplementation. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 1, p. 38-43, 2009.

BASMAN, A.; KÖKSEL, H.; NG, P.K.W. Effects of transglutaminase on SDS-PAGE patterns of wheat, soy and barley proteins and their blends. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 2654-2658, 2002.

BECKERMANN, B.; BENEKE, M.; SEITZ, I. Comparative bioavailability of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from triglycerides, free fatty acids and ethyl esters in volunteers. **Arzneimittelforschung**, v. 40, n. 6, p. 700–704, 1990.

BELCH, J. J. F.; MUIR, A. n-6 and n-3 Essential fatty acids in rheumatoid arthritis and other rheumatic conditions. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, p. 563–569, 1998.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO F. O. (Ed.). **Introdução à Química de Alimentos**, 2ª ed., Varela, São Paulo, 1992.

BRENNAN, J. T.; SALEM, N.; SINCLAIR, A. J.; CUNNANE, S. C. α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 longchain polyunsaturated fatty acids in humans. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 80, p. 85–91, 2009.

BUCHER, H.C.; HENGSTLER, P.; SCHINDLER, C.; MEIER, G. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. **American Journal of Medicine**. v. 112, p. 298–304, 2002.

BUENO, C. M. M. **Extração e caracterização de gelatina de pele de tilápia e aplicação como agente encapsulante de óleo de salmão em micropartículas obtidas por coacervação complexa**. 2008, 133p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.

BUREY, P.; BHANDARI, B.R.; HOWES, T. ; GIDLEY, M.J. Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization and Application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 361-377, 2008.

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

CARDOSO, F. S. N.; GROSSO, C. R. F.; VITALI, A. Microcápsulas de amido obtidas através da secagem por atomização e recobertas em leite fluidizado. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, n. 69, p. 131-136, 2001.

CARVALHO, R. A. **Elaboração e caracterização de filmes a base de gelatina modificada enzimática e quimicamente**. 2002, 249p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP, 2002.

CARVALHO, R.A.; GROSSO, C.R.F. Characterization of gelatin-based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 5, p. 717-726, 2004.

CÉLIS, F. T. **Efeito da reticulação induzida pela transglutaminase e o glutaraldeído sobre as propriedades das micropartículas obtidas por coacervação complexa**. 2009, 148p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.

CHAMBI, H.; GROSSO, C.R.F. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. **Food Research International**, v.39, n.4, p.458-466, 2006.

CHÁVEZ-SERVÍN, J. L.; CASTELLOTE, A. I.; LÓPEZ-SABATER, M. Evolution of available lysine and lactose contents in supplemented microencapsulated fish oil infant formula powder during storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 1121–1128, 2008.

CHO, Y. H.; SHIM, H. K.; PARK, J. Encapsulation of fish oil by an enzymatic gelation process using transglutaminase cross-linked protein. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 2717-2723, 2003.

CONNOR, W. E.; LOWENSOHN, R.; HATCHER, L. Increased docosahexaenoic acid levels in human newborn infants by administration of sardines and fish oil during pregnancy. **Lipids**, v. 31, p. S183–S187, 1996.

COULTATE, T. P. **Alimentos**: a química de seus componentes. Porto Alegre: Artmed, 3ª ed, 2004, 368 p.

CUNNANE, S. C.; RYAN, M. A.; NADEAU, C. R.; BAZINET, R. P.; MUSA-VELOSO, K.; MCCLOY, U. Why is carbon from some polyunsaturates extensively recycled into lipid synthesis? **Lipids**, v. 38, p. 477–484, 2003.

CURTIS, J. ZHANG, W.; JIN, Y. **Microcapsules and emulsions containing low bloom gelatin and methods of making and using thereof**. US Patent 6969530, 2005.

DAS, U. Essential fatty acids – A review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 7, p. 467–482, 2006.

DAVIDOV-PARDO, G.; ROCCIA, P.; SALGADO, D.; LEÓN, A. E.; PEDROZA-ISLAS, R. Utilization of different wall materials to microencapsulate fish oil evaluation of its behavior in bread products. **American Journal of Technology**, v. 3, n. 6, p. 384-393, 2008.

DIAZ-ROJAS, E. I.; PACHECO-AGUILAR, R.; LIZARDI, J.; ARGÜELLES-MORALES, W.; VALDEZ, M. A.; RINAUDO, M.; GOYCOOLEA, F. M. Linseed pectin: Gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. **Food Hydrocolloid**, v. 18, p. 293-304, 2004.

DICKINSON, E.; LOPEZ, G. Comparison of the emulsifying properties of fish gelatin and commercial fish proteins. **Journal of Food Science**, v. 66, p. 118–123, 2001.

DONG, Z. J.; TOURE, A.; JIA, C. S.; ZHANG, X. M.; XU, S. Y. Effect of processing parameters on the formation of spherical multinuclear microcapsules encapsulating peppermint oil by coacervation. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n.7, p.634–646, 2007.

DYERBERG, J.; MADSEN, P.; MØLLER, J.M.; AARDESTRUP, I.; SCHMIDT, E.B. Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 83, p. 137–141, 2010.

DRUSCH, S.; SERFERT, Y.; HEUVEL, A. V. D.; SCHWARZ, K. Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 807-815, 2006.

DRUSCH, S.; SERFERT, Y.; SCAMPICCHIO, M.; SCHMIDT-HANSBERG, B.; SCHWARZ, K. Impact of physicochemical characteristics on the oxidative stability of fish oil microencapsulated by spray-drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 11044–11051, 2007.

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

DURAN, R.; JUNQUA, M.; SCHMITTER, J.M.; GANCET, C.; GOULAS, P. Purification, characterisation, and gene cloning of transglutaminase from *Streptovorticillium cinnamoneum* CBS 683.68. **Biochimie**, v. 80, p. 313-319, 1998.

EGBERT, W. R. Isolated Soy Protein: Technology, Properties And Applications. In LIU, K. (Ed.), **Soybeans as Functional Foods and Ingredients**, USA: AOCS Publishing, p. 135–162, 2004.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FÜRST P. The striking diet of the island of Crete: lipid nutrition from the palaeolithic to the affluent modern society. **Clinical Nutrition**, v. 21, p. 9-14, 2002.

GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A. S. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 5, p. 611-621, 2006.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v.40, p.1107-1121, 2007.

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

GLICKSMAN, M. (Ed.) **Food Hydrocolloids**. v. 2, New York: CRC Press Inc. 1983.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1813-1827, 2011.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Food Science and Technology**, v. 15, p. 330-347, 2004.

GRIFFIN, M.; CASADIO, R.; BERGAMINI, C. M. Transglutaminases: Nature's biological glues. **Biochemical Journal**, v. 368, p. 377-396, 2002.

GUILLOT, N.; CAILLET, E.; LAVILLE, M.; CALZADA, C.; LAGARDE, M.; VERICEL, E. Increasing intakes of the long-chain ω -3 docosahexaenoic acid: effects on platelet functions and redox status in healthy men. **FASEB Journal**, v. 23, p. 2909–2916, 2009.

HADDAD, R.; CATHARINO, R. R.; MARQUES, L. A.; EBERLIN, M. N. Perfume fingerprinting by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry: nearly instantaneous typification and counterfeit detection. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 22, p. 3662, 2008.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

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

HENN, R. L. **Características bioquímicas e hidrólise enzimática de diferentes isolados protéicos de soja comerciais.** 1997, 128p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1997.

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

HOBECO. **Corrente de Fluxo.** 2004. Disponível em: <www.hobeco.net>. Acesso em: outubro de 2011.

HU, F. B.; BRONNER, L.; WILLETT, W. C.; STAMPFER, M. J.; REXRODE, K. M.; ALBERT, C. M.; HUNTER, D.; MANSON, J. E. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. **Journal of the American Medical Association**, v. 287, p. 1815–1821, 2002.

HU, M.; McCLEMENTS, J.; DECKER, E. A. Impact of whey protein on the oxidative stability of salmon oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1435-1439, 2003.

HWANG, L. S.; LIANG, J. H. Fractionation of urea-pretreated squid visceral oil ethyl esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, p. 473–476, 2001.

IAFELICE M. F. C.; CUBADDA, R.; DI CRISCIO, T.; TRIVISONNO, M. C.; MARCONI, E. Development of functional spaghetti enriched with long chain omega-3 fatty acids. **Cereal Chemistry**, v. 85, n. 2, p146-151, 2008.

IDRIS, O. H. M.; WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Characterisation of gum from *Acacia senegal* trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. **Food Hydrocolloids**, v. 12, p. 379-388, 1998.

IKURA, K.; KOMETANI, T.; SASAKI, R.; CHIBA, H. Crosslinking of soybean 7S and 11S proteins by transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, p. 1979-1984, 1980.

JARAMILLO, D. P; ROBERT, R. F.; COUPLAND, J. N. Effect of pH on the properties of soy protein–pectin complexes. **Food Research International**, DOI: 10.1016/j.foodres.2011.01.057, 2011.

JAROS, D.; PARTSCHEFELD, C.; HENLE, T.; ROHM, H. Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics and applications. **Journal of Texture Studies**, v. 37, p. 113-155, 2006.

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

JOSEPH, D.; LANIER, T.C.; HAMANN, D.D. Temperature and pH affect transglutaminase-catalyzed .setting. of crude fish actomyosin. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 1018-1036, 1994.

JOUZEL, B.; PENNARUN, A.-L.; PROST, C.; RENARD, D.; PONCELET, D.; DEMAÏMAY, M. Encapsulation of a lipid precursor, the eicosapentaenoic acid, to study the development of the *Crassostrea gigas* oyster flavours. **Journal of Microencapsulation**, v. 20, n. 1, p.35–46, 2003.

JUMP, D. B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Current Opinion in Lipidology**, v. 19, p. 242–247, 2008.

JUN-XIA, X.; HAI-YAN, Y; JIAN, Y. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1267–1272, 2011.

KAHLON, T. S.; KEAGY, P. M. Benefits and sources of functional foods. **Cereal Foods World**, v.48, n.3, p.112-115, 2003.

KAHN, D.R.; COHEN, I. Factor XIIIa catalyzed coupling of structural proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 668, p. 490-494, 1981.

KANG, I. J.; MATSUMURA, Y.; IKURA, K.; MOTOKI, M.; SAKAMOTO, H.; MORI, T. Gelation and gel properties of soybean glycinin in a transglutaminase-catalysed system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 159-165, 1994.

KATONA, J. M.; SOVILJ, V. J.; PETROVIC, L. B. Microencapsulation of oil by polymer mixture—ionic surfactant interaction induced coacervation. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 563–570, 2010.

KENYON, M.M. Modified starch, maltodextrin, and corn syrup solids as wall materials for food encapsulation. In: RISCH, S .J.; REINECCIUS, G. A. **Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients**, ASC Symposium Series 590. Washington: American Chemical Society. p. 43–50, 1995.

KEOGH, M. K.; O'KENNEDY, B. T.; KELLY, J.; AUTY, M. A.; KELLY, P. M.; FUREBY, A.; HAAHR, A.-M. Stability to oxidation of spray-dried. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 66, n. 2, p. 217-224, 2001.

KIM, S. K.; MENDIS, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. **Food Research International**, v. 39, p. 383–393, 2006.

KIM, Y. D.; MORR, C. V. Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1308–1313, 1996.

KLAYPRADIT, W.; HUANG, Y.-W. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1133-1139, 2008.

KOBAYASHI, E.; HASHIGUCHI, K.; YIKOZEKI, K.; YAMANAKA, S. Molecular cloning of the transglutaminase gene from *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, p. 1109-1114, 1998.

KOLANOWSKI, W.; JAWORSKA, D.; WEIÂBRODT, J.; KUNZ, B. Sensory assessment of microencapsulated fish oil powder. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 37–45, 2007.

KOLANOWSKI, W.; LAUFENBERG, G. Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. **European Food Research Technology**, v. 222, p. 472–477, 2006.

KOLANOWSKI, W.; LAUFENBERG, G.; KUNZ, B. Fish oil stabilization by microencapsulation with modified cellulose. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 55, n. 4, p. 333-343, 2004.

KOLANOWSKI, W.; ZIOLKOWSKI, M.; WEIÂBRODT, J.; KUNZ, B.; LAUFENBERG, G. Microencapsulation of fish oil by spray drying – impact on oxidative stability. **European Food Research and Technology**, New York, v. 222, n. 3-4, p. 336-342, 2006.

KOMPRDA, T. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammation-modulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 25–38, 2012.

KOMPRDA, T.; ZELENKA, J.; FAJMONOVÁ, E.; FIALOVÁ, M.; KLADROBA, D. Arachidonic acid and long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid contents in meat of selected poultry and fish species in relation to dietary fat sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6807–6812, 2005.

KONG, X. Z. ; GU, X.; ZHU, X.; ZHANG, Z. Spreadable dispersion of insect sex pheromone capsules, preparation via complex coacervation and release control of the encapsulated pheromone component molecule. **Biomed Microdevices**, v. 11, p. 275–285, 2009.

KRIS-ETHERTON, P.M.; TAYLOR, D.S.; YU-POTH, S.; HUTH, P.; MORIARTY, K.; FISHELL, V.; HARGROVE, R.L.; ZHAO, G.; ETHERTON, T.D. Polyunsaturated

fatty acids in the food chain in the United States. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 179-188, 2000.

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

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

LANTTO, R. **Protein cross-linking with oxidative enzymes and transglutaminase: Effects in meat protein systems**. Finland: Espoo VTT Publications 642, 2007, 118 p.

LARRIEU, S.; LETENNEUR, L.; HELMER, C.; DARTIGUES, J.F.; BARBERGER-GATEAU, P. Nutritional factors and risk of incident dementia in the PAQUID longitudinal cohort. **Journal of Nutrition Health and Aging**, v. 8, p. 150-154, 2004.

LEE, S. J.; ROSENBERG, M. Whey protein-based microcapsules prepared by double emulsification and heat gelation. **LWT – Food Science and Technology**, v. 33, p. 80–88, 2000.

LEE, S. J.; YING, D. Y. Encapsulation of fish oils. In: Garti, N. **Delivery and controlled release of bioactives food nutraceuticals**. Boca Raton: CRC, 2008.

LECLERCQ, S.; MILO, C.; REINECCIUS, G. A. Effects of Cross-Linking, Capsule Wall Thickness, and Compound Hydrophobicity on Aroma Release from Complex Coacervate Microcapsules. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57,p. 1426–1432, 2009.

LIM, L.T.; MINE, Y.; TUNG, M.A. Transglutaminase cross-linked egg white protein films: tensile properties and oxygen permeability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4022-4029, 1998.

LIN, Y. H.; SALEM, N. Whole body distribution of deuterated linoleic and alpha-linolenic acid and their metabolites in the rat. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 2709–2724, 2007.

LORDEIRO, R. A. **Construção de uma fonte EASI-MS (Easy Ambient Sonicspray Ionization) para análise direta de superfícies e sua aplicação em amostras de interesse forense**. 2011, 78p. Dissertação (Mestrado em Química – Química Analítica) – Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

MAHENDRAN, T.; WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O.; AL-ASSAF, S. New insights into the structural characteristics of gum Arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 9296–9297, 2008.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3 ed., 2010, 386p.

MASCARENHAS, M. C. C. N. **Utilização de surfactantes na produção de microencapsulados de óleo rico em ômega 3 por coacervação complexa com aplicação em emulsões**. 2010, 167p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

McMINDS, M. K. Applications of isolated soy protein in low-fat meat products. **Food Technology**, v. 45, n. 12, p. 61-64, 1991.

MEDANHA, D. V.; ORTIZ, S. E. M.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; MAURI, A. MONTERREY-QUINTERO, E.S.; THOMAZINI, M. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. **Food Research International**, v. 42, p. 1099-1104, 2009.

MIZUBUTI, I. Y. Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 15, n.1, p. 80-94, 1994.

MOGELSON, S.; PIEPER, S. J.; LANGE, L. G. Thermodynamic bases for fatty acid ethyl ester synthase catalyzed esterification of free fatty acid with ethanol and accumulation of fatty acid ethyl esters. **Biochemistry**, v. 23, p. 4082–4087, 1994.

MOLINA-ORTIZ, S. E.; MAURI, A.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; TRINDADE, M. A.; SANTANA, A. S.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, n. 5, p. 919–923, 2009.

MOTTA, E. M. P. **A influência de íons cálcio nas características de solubilidade, textura e capacidade de retenção de água de géis de concentrados e isolados protéicos de soro de leite**. 2002, 77p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

MOURA, J. M. L. N.; GONÇALVES, L. A. G; GRIMALDI, R.; SOARES, M. S.; RIBEIRO, A. P. B. Otimização das condições de produção de ésteres etílicos a partir de óleo de peixe com elevado teor de ácidos graxos ω -3. **Química Nova**, v. 29, p. 956-959, 2006.

NAKAMURA, M. T.; CHEON, Y.; LI, Y.; NARA, T. Y. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. **Lipids**, v. 39, p. 1077–1083, 2004.

NIO, N.; MOTOKI, M.; TAKINAMI, K. Gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, p. 2283-2286, 1985.

O'KEEFE, S. F. Nomenclature and classification of lipids. In: **Food lipids: Chemistry, nutrition and biotechnology**. Boca Raton: CRC, 2 ed., p. 1-41, 2002.

OLIVEIRA, A. B. **Microencapsulamento de Estigmasterol proveniente de *Musa paradisiaca* L., Musaceae**. 2007, 132p. Dissertação (Mestre em Ciências

Farmacêuticas). Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

OOMEM, C. M.; FESKENS, E. J. M.; RASANEN, L.; FIDENZA, F.; NISSINEN, A. M.; MENOTTI, A.; KOK, F. J.; KROMHOLT, D. Fish consumption and coronary heart disease mortality in Finland, Italy and the Netherlands. **American Journal of Epidemiology**. v. 151 p. 999–1006, 2000.

PELEGRINE, D. H. G; CARRASQUEIRA, R.L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. **Brazilian Journal of Food Technology**. VII BMCFB, dez. 2008, p.145-151.

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

RABIŠKOVÁ, M.; VALÁŠKOVÁ, J. The influence of HLB on the encapsulation of oils by complex coacervation.. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, n. 6, p. 747-751. 1998.

RAMAPRASAD, R.; TALAHALLI, R. R.; VALLIKANNAN, B.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B. R. Lower efficacy in the utilization of dietary ALA as compared to preformed EPA+DHA on long chain n-3 PUFA levels in rats. **Lipids**, v. 45, p. 799–808, 2010.

ROSENBERG, M. **Milk derived whey protein-based microencapsulating agents and a method of use**. US Patent Number 5601760, 1997.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N.; BELTRÁN, S.; JAIME, I.; DIEGO, S. M.; SANZ, M. T.; CARBALLIDO, J. R. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 1–12, 2010.

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

SAKAMOTO, H.; KUMAZAWA, Y.; MOTOKI, M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 866-871, 1994.

SALOPEK, B.; KRASIC, D.; FILIPOVIC, S. Measurement and Application of Zeta-Potential. **Rudarsko-geoloiko-naftni zbornik**, v. 4, p. 147-151, 1992.

SANCHEZ, C.; SCHMITT, C.; KOLODZIEJCZYK, E.; LAPP, A.; GAILLARD, C.; RENARD, D. The Acacia gum arabinogalactan fraction is a thin oblate ellipsoid: a new model based on SANS and ab initio calculation. **Biophysical Journal**, v. 94, p. 629-639, 2008.

SANDERS, T.A.; ROSHANAI, F. The influence of different types of omega 3 polyunsaturated fatty acids on blood lipids and platelet function in healthy volunteers. **Clinical Science**, v. 64, p. 91–99, 1983.

SANGUANSRI, L.; AUGUSTIN, M. A. Microencapsulation and delivery of omega-3 fatty acids. Functional food ingredients and nutraceuticals. In: SHI, J. (ed). **Functional food ingredients and nutraceuticals**. CRC: Boca Raton, p. 297–327, 2007.

SARAIVA, A. S.; ABDELNUR, P. V.; CATHARINO, R. R.; NUNES, G.; EBERLIN, M. N. Fabric softeners: nearly instantaneous characterization and quality control of cationic surfactants by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 23, p. 357, 2009a.

SARAIVA, A. S.; CABRAL, E. C.; EBERLIN, M. N.; CATHARINO, R. R. Amazon vegetable oils and fats: Fat typification and quality control of triacylglycerol (TAG) profiles from dry matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS

fingerprinting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4030-4034, 2009b.

SCHACKY, C. V. n-3 fatty acids and the prevention of coronary atherosclerosis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 224–227, 2000.

SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 47, p. 147–155, 2008.

SCHRAM, L.B.; NIELSEN, C.J.; PORSGAARD, T.; NIELSEN, N.S.; HOLM, R.; MU, H. Food matrices affect the bioavailability of (n-3) polyunsaturated fatty acids in a single meal study in humans. **Food Research International**, v. 40, p. 1062-1068, 2007.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. (2007). **Gelatin handbook**. Theory and industrial practice. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.. KGaA., 2007, 347p.

SERNA-SALDIVAR, S. O.; ZORRILLA, R.; LA PARRA, C.; STAGNITTI, G.; ABRIL, R. Effect of DHA Containing Oils and Powders on Baking Performance and Quality of White Pan Bread. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, p. 121–129, 2006.

SIMAS, R. C. **Caracterização de óleos vegetais e petróleo por espectrometria de massa em condições ambiente e com alta exatidão e precisão**. 2010, 150p. Tese (Doutorado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

SIMAS, R. C.; CATHARINO, R. R.; CUNHA, I. B. S.; CABRAL, E. C.; BARRERA-ARELLANO, D.; EBERLIN, M. N.; ALBERICI, R. M. Instantaneous characterization of vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v. 135, p. 738–744, 2010.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.54, p.438-463, 1991.

SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical review in food science and nutrition**, v.33, n.6, p.501-547, 1993.

SHARMA, R.; LORENZEN, P. C.; QVIST, K. B. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of ϵ -(γ -glutamyl) lysine and the susceptibility of individual proteins towards cross-linking. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 785–793, 2001.

SHIGA, H.; YOSHII, H.; NISHIYAMA, T. Flavor encapsulation and release characteristics of spray-dried powder by the blended encapsulante of cyclodextrin and gum Arabic. **Drying Technology**, v.19, p.1385–1395, 2001.

SUZUKI, S.; IZAWA, Y.; KOBAYASHI, K.; ETO, Y.; YAMANAKA, Y.; KUBOTA, K.; YOKOZEKI, K. Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 2344-2351, 2000.

SUBRAMARIAN S.; CONNOLLY, B.; CRANDELL, M.; ABRIL, J. R. **Food fortification with polyunsaturated fatty acids**. US Patent Application 096964, 2008.

TAN, L. H., CHAN, L. W., HEN, P. W. S. Effect of oil loading on microspheres produced by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 3, p. 253-259, 2005.

TEHRANY, E. A.; JACQUOT, M.; GAIANI, C.; IMRAN, M.; DESOBRY, S.; LINDER, M. Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. **Trends in Food Science & Technology**, 2011, DOI: 10.1016/j.tifs.2011.12.002

THIES, C. **How to make Microcapsules Lecture and Laboratory Manual**. Sant Louis: Thies technology, 1995.

TONG, L. M.; SASAKI, S.; McCLEMENTS, J.; DECAER, E. A. Mechanisms of antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1473-1478, 2000.

TRAUTWEIN, E. A. N-3 fatty acids – physiological and technical aspects for their use in food. **European Journal of Lipid Science Technology**, v.103, p.45–55, 2001.

TSAI, G.-J.; LIN, S.-M.; JIANG, S.-T. Transglutaminase from *Streptoverticillium ladakanum* and application to minced fish product. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 1234-1238, 1996.

TSAI, C.-J.; LIU, C.-C.; HUNG, L.-B.; PAN, B. S. TMAH-Catalyzed Transesterification of EPA and DHA in Encapsulated Fish Oil Products. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 89, p. 9–16, 2012.

VELASCO, J.; DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G.; Oxidation of free and encapsulated oil fractions in dried microencapsulated fish oil. **Grasas y Aceites**, v. 51, p. 439-446, 2000.

VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; OLIVEIRA, A. C. P. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 7, p. 1277-1283, 1999.

VILSTRUP, P. **Microencapsulation of food ingredients**. Leatherhead Publishing: Londres, 2001, 76p.

WEINBRECK, F.; MINOR, M.; DE KRUIF, C. G. Microencapsulation of oils using whey protein/gum arabic coacervates. **Journal of Microencapsulation**, v.21, n.6, p. 667-679, 2004.

WHELAN, J.; RUST, C. Innovative dietary sources of n-3 fatty acids. **Annual Review of Nutrition**, v. 26, p. 75-103, 2006.

WOLF, W. J. Soybean proteins: their functional, chemical and physical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 969-976, 1970.

WRICK, K. The US soy market: An update and outlook. **Nutraceutical World**, v. 6, n. 1, p. 32–42, 2003.

WU, K.G.; CHAI, X. H.; CHEN, Y. Microencapsulation of fish oil by simple coacervation of hydroxypropyl methylcellulose. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 23, n. 11, p. 1269-1572, 2005.

YEO, Y.; BELLAS, E.; FIRESTONA, W.; LANGUER, R.; KOHANE, D. S. Complex Coacervates for Thermally Sensitive Controlled Release of Flavour Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 53, p. 7518-7525, 2005.

YEP, Y. L.; LI, D.; MANN, N. J.; BODE, O.; SINCLAIR, A. J. Bread enriched with microencapsulated tuna oil increases plasma docosahexaenoic acid and total omega-3 fatty acids in humans. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 11, p. 285-291, 2002.

ZHAN, Z. P.; HUANG, F. R.; LUO, J.; DAI, J. J.; YAN, X. H.; PENG, J. Duration of feeding linseed diet influences expression of inflammation-related genes and growth performance of growing-finishing barrows. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 603–611, 2008.

ZIMET, P; LIVNEY, Y. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for w-3 polyunsaturated fatty acids. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1120–1126, 2009.

ZHU, Y.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial transglutaminase—a review of its production and application in food processing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 277–282, 1995.

ARTIGO I

EFEITO DO ISOLADO PROTÉICO DE SOJA E DO ISOLADO PROTÉICO DE SORO COMO MATERIAL DE PAREDE PARA MICROCÁPSULAS CONTENDO EPA E DHA OBTIDAS PELO PROCESSO DE GELIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Artigo formatado para a revista

Journal of Microencapsulation

ISSN: 0265-2048 (impresso),

1464-5246 (eletrônico)

Efeito do isolado protéico de soja e do isolado protéico de soro como material de parede para microcápsulas contendo EPA e DHA obtidas pelo processo de gelificação enzimática

Leilane Costa Conto^{1*}; Chiu Chih Ming¹; Lirenny Aparecida Guaraldo Gonçalves¹.

¹ Faculdade de Engenharia de Alimentos, Caixa Postal 6121, CEP: 13083-862, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

* Correspondência: Tel.: 55 019 32891186 Fax: 55 019 32893617. E-mail: leilanedeconto@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de dois materiais protéicos como parede na obtenção de microcápsulas contendo como recheio éster etílico de óleo de peixe, obtidas por gelificação enzimática, utilizando transglutaminase. As microcápsulas obtidas foram avaliadas quanto ao tamanho de partícula e sua distribuição, ao rendimento de processo, à eficiência de encapsulação, teor de material lipídico superficial e à morfologia através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O óleo residual da lavagem das microcápsulas foi caracterizado segundo sua constituição em grupos lipídicos por cromatografia de alta performance por exclusão de tamanho (HPSEC), para a detecção de éster etílico de óleo de peixe perdido no processo. As partículas obtidas com isolado protéico de soro apresentaram formatos irregulares e maiores tamanhos de partículas. O ensaio com 10% de isolado protéico de soja na proporção 2:1 material de

parede:material de recheio apresentou os maiores valores de rendimento de processo e de eficiência de encapsulação (aproximadamente 88 e 47%, respectivamente), em torno de 8% de material lipídico superficial, menor diâmetro médio (53,47 μm) e apenas 3,95% de éster etílico de óleo de peixe no óleo residual.

PALAVRAS CHAVE: Éster etílico de óleo de peixe; Isolado protéico de soro; Isolado protéico de soja; gelificação enzimática.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, inúmeros estudos vêm evidenciando os benefícios à saúde humana dos ácidos graxos polinsaturados ômega-3 (Kitessa, Gulati, Ashes, Fleck, Scott & Nichols, 2001). Os ácidos graxos polinsaturados, como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) são constituintes dos tecidos que compõem o sistema nervoso central, atuam no funcionamento adequado da visão, bem como na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e doenças auto-imunes e inflamatórias (Simopoulos, 1991; Trautwein, 2001).

Segundo Sanguansri e Augustin (2007), o peixe é a fonte tradicional de óleo rico em EPA e DHA. De acordo com Rubio-Rodríguez, Beltrán, Jaime, Diego, Sanz e Carballido (2010), destaca-se a produção de derivados concentrados de óleo de peixe nas formas de metil ou etil éster, que apresentam melhor

conservação frente ao oxigênio. Entretanto, a aplicação do óleo de peixe e de seus derivados em sistemas alimentícios tem limitações devido à instabilidade oxidativa durante o período de estocagem, que resultam em aromas e sabores desagradáveis (Cho, Shim & Park, 2003). Com isto, tem se desenvolvido técnicas que o protejam da oxidação como a microencapsulação e que simultaneamente, facilitem a incorporação destes ingredientes em formulações alimentícias (Ackman, 2006).

Inúmeros materiais de parede e métodos de encapsulação têm sido testados para microencapsular óleo de peixe e seus derivados (Davidov-Pardo, Roccia, Salgado, León & Pedroza-Islas, 2008). Os filmes protéicos geralmente são excelentes barreiras ao oxigênio e a aromas e são utilizados para a produção de microcápsulas através de várias técnicas, dentre elas podem ser citadas coacervação simples ou complexa seguida de reticulação com transglutaminase ou gelificação térmica (Lee & Rosenberg, 2000).

Rusli, Sanguansri e Augustin (2006) pesquisaram as influências do tipo de proteína (isolado protéico de soja e isolado protéico de soro aquecidos e adicionados de xarope de glucose – 1:2, proteína:xarope) com diferentes materiais lipídicos como recheio sobre a eficiência de encapsulação e estabilidade oxidativa das emulsões formadas e microcápsulas após processo de *spray drying*. Cho, Shim e Park (2003) estudaram a capacidade de formação de filmes protéicos utilizando dupla-emulsão com subsequente gelificação enzimática em diferentes condições de processo utilizando isolado protéico de soja (IPS) como material de parede e a enzima transglutaminase, obtendo cápsulas estáveis sem a

necessidade de aquecimento da dupla-emulsão. Contudo alguns trabalhos indicam a existência de aromas e sabores indesejáveis em produtos enriquecidos com microcápsulas contendo óleo de peixe, produzidas por técnica semelhante (Serna-Saldivar, Zorrilla, La Parra, Stagnitti & Abril, 2006).

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da variação da concentração de isolado protéico de soja e de isolado protéico de soro nas características morfológicas, no rendimento de processo, na eficiência de encapsulação, teor de material lipídico na superfície e teor de éster etílico residual de microcápsulas contendo éster etílico de óleo de peixe.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Éster etílico de óleo de peixe (62% de EPA + DHA, Vital Atman, Uchoa, SP), óleo de milho (Qualitá, Bunge Alimentos S.A., Gaspar, SC), Span 80 (Croda do Brasil LTDA, São Paulo, SP), isolado protéico de soja (The Solae Company, Esteio, RS, 88% proteína b.u.), isolado protéico de soro (Iso Pro Whey, Probiótica, Embu, SP, 88% proteína b.u.), óleo resina de páprica (Kienast & Kratschmer LTDA, Santo André, SP), Transglutaminase Activa TG-S® (Ajinomoto, Limeira, SP, TG).

2.2 Métodos

2.2.1 Produção das microcápsulas

A produção das microcápsulas utilizando isoladamente 5 (W1) ou 10% (W2) de isolado protéico de soro e 5 (S1) ou 10% (S2) de isolado protéico de soja e a enzima transglutaminase (TG) como agente gelificante em todos os ensaios, segundo metodologia descrita por Cho, Shim e Park (2003), com algumas adaptações na velocidade de rotação e com a adição de óleo resina de páprica.

As microcápsulas foram preparadas utilizando um processo que consiste na dupla-emulsificação e subsequente gelificação enzimática, com três repetições de cada ensaio:

(a) Inicialmente 5 ou 10 g de proteína foram dissolvidas em 100 mL de água deionizada, adicionando-se 0,025% (2,7 UA/g de proteína) da enzima transglutaminase (TG), em temperatura ambiente a pH 6,0.

(b) A emulsão primária foi formada pela homogeneização do éster etílico de óleo de peixe contendo 1% de óleo resina de páprica, na dissolução inicial (a) por 10 minutos, a 11000 rpm com auxílio de Ultra-turrax (IKA-Werke Ultra-turrax modelo T18 basic, Alemanha). A proporção de material de parede para material de recheio foi de 2:1 em massa.

(c) Na emulsão secundária foi utilizado 400 mL de óleo de milho pré-aquecido a 50°C, adicionando-se 3% (em massa) de emulsificante mono-oleato de sorbitana (Span 80), totalizando 12 g, sob agitação magnética. Imediatamente

após o preparo da emulsão primária (a), esta foi lentamente adicionada ao óleo de milho e emulsificante, sob leve agitação magnética. Cessada a mistura após 1 minuto de agitação, formando a dupla-emulsão, que foi mantida a 37°C por 17 horas em câmara (BOD, Eletrolab, Brasil).

As cápsulas foram filtradas e lavadas 1 vez com éter de petróleo (aproximadamente 20 mL) e 3 vezes com etanol anidro para retirada do excesso de óleo de milho da superfície. Posteriormente as microcápsulas foram liofilizadas em liofilizador Edwards Pirani 50 (Edwards, US), onde a temperatura foi baixada a -40 °C, sob uma pressão de 0,1 mmHg para liofilização por 24h.

2.2.2 Avaliação do éster etílico no resíduo

Após a recuperação dos solventes do material lipídico residual, este foi utilizado para a determinação das classes de lipídios presente, com o intuito de verificar a presença de éster etílico de óleo de peixe e comparação com o óleo de milho, através de técnica de cromatografia de alta performance por exclusão de tamanho (HPSEC), em cromatógrafo líquido Perkin Elmer 250, com detector de índice de refração Sicon Analytic e colunas JORDI GEL DVB 300 x 7,8 mm, 500Å e, JORDI GEL DVB 300 x 7,8 mm, 100Å. Fase móvel: tetrahydrofurano (THF); Fluxo da fase móvel: 1 mL/min. A amostra foi dissolvida a 1% em tetrahydrofurano e o volume injetado foi de 20,0 µL. Foram utilizados como padrão uma mistura de triacilglicerol (43,1%), diacilglicerol (38,5%), monoacilglicerol (4,6%) e ácidos graxos livres (13,8%) da marca NuChek (Elysian, MN).

2.2.3 Distribuição de tamanho e tamanho médio das microcápsulas

As determinações de tamanho médio e distribuição de tamanho das micropartículas foram feitas por microscopia óptica utilizando-se um microscópio óptico (NIKON - eclipse E800, Japan) com captação de imagens através de câmera digital controlada pelo programa Image-pro plus 6.0, utilizando lente auxiliar optovar de 0,8x e objetiva 12,5x. Para cada amostra foram avaliadas 500 microcápsulas, cujas fotos foram digitalizadas e com o auxílio do programa Microcal Origin pro 8.0 (Microcal Software, Inc., MA, USA) obteve-se as médias, os desvios padrão e os gráficos.

2.2.4 Morfologia das microcápsulas

As análises morfológicas foram feitas utilizando o microscópio eletrônico de varredura de alto vácuo (SEM scanning electron microscope) modelo TM 3000 (Hitachi, Japão), com magnitude de 15x a 3000x (zoom digital 2, 4x) e aceleração de voltagem de 15 kV (Analy mode). Detector BSE do semiconductor de alta sensibilidade. Bomba turbomolecular: unidade 30 L/sx1, bomba de diafragma. As amostras foram dispostas sob suportes de alumínio (*stubs*) contendo uma fita de cobre de dupla face, para a fixação do material. Foram selecionados os melhores campos, onde as microcápsulas se encontravam isoladas.

2.2.5 Rendimento do processo

O rendimento do processo (equação 1) foi determinado como a massa de microcápsulas liofilizadas obtida dividida pela massa total inicial (éster etílico, proteína e óleo resina de páprica) utilizadas em base seca.

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{Massa de microcápsulas liofilizadas (b.s.)} \times 100}{\text{Massa inicial de polímeros e recheio (b.s.)}} \quad (1)$$

2.2.6 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi obtida após a hidrólise ácida das cápsulas, onde 0,2 g de amostra foram adicionadas de 4,5 mL de água deionizada fervente e 5,5 mL de ácido clorídrico 8 M e deixadas em banho-maria fervente por aproximadamente 30 minutos (até a degradação completa do material de parede). Posteriormente a mistura foi filtrada e lavada com 10 mL de água deionizada fervente. O papel de filtro com as amostras hidrolisadas foi seco em estufa e colocado para extração segundo a metodologia de determinação de teor de óleo da AOCS Ac 3-44 (2009), para compostos com alto teor protéico. A eficiência de encapsulação foi determinada segundo a equação (2), conforme descrito por Davidov-Pardo et al. (2008).

$$\% \text{ Eficiência de Encapsulação} = \frac{(\text{Total de lipídios} - \text{lipídios livres}) \times 100}{\text{Total de lipídios}} \quad (2)$$

2.2.7 Teor de material lipídico superficial das microcápsulas

Os procedimentos para extração do material livre seguiram a metodologia descrita por Velasco, Dobarganes e Márquez-Ruiz (2000), adaptado para menor escala. Para a determinação do óleo livre, 0,8 g de microcápsulas foram adicionadas de 20 mL de éter de petróleo e agitadas por 15 minutos a 25 °C. Posteriormente, as microcápsulas dispersas no éter de petróleo foram filtradas com Na₂SO₄ anidro, este último carregou o éster etílico de óleo de peixe para um balão de 100 mL tarado, posteriormente o solvente foi evaporado, obtendo-se o resultado por gravimetria e as amostras foram secas com nitrogênio e armazenadas.

2.2.8 Análise estatística

As análises e os processos foram realizados em triplicata. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando-se a análise de variância (ANOVA) para verificar os efeitos das variáveis concentração e tipo de proteína, com sua interação e análise de diferença de médias por Teste de Tukey, empregando-se o software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA), com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos para o teor de éster etílico no óleo residual, tamanho médio de partícula, rendimento do processo, eficiência de encapsulação e teor de material lídico na superfície das cápsulas.

3.1 Avaliação do éster etílico no resíduo

Os resultados dos teores de éster etílico de óleo de peixe encontrados nos materiais residuais obtidos após a produção das microcápsulas estão apresentados na Tabela 1. Para o ensaio W1 (5% de isolado protéico de soro), a determinação dos grupos lipídicos do óleo residual identificou a presença de 23,65% de éster etílico. O ensaio W2 (10% de isolado protéico de soro) apresentou um conteúdo de 9,74% de éster etílico no óleo residual, enquanto os valores de éster etílico encontrados para os ensaios S1 (5% de isolado proteico de soja) e S2 (10% de isolado proteico de soja) ficaram em torno de 3%, não diferindo estes últimos estatisticamente entre si ($p > 0,05$), indicando uma deficiência no processo de encapsulação por gelificação enzimática quando foi utilizado isolado protéico de soro nas condições testadas.

Tabela 1. Tamanho médio de partícula, rendimento do processo e eficiência de encapsulação e teor de material lipídico superficial das microcápsulas de isolado protéico de soro e isolado protéico de soja obtidos por gelificação enzimática.

	W1 ^A	W2 ^A	S1 ^A	S2 ^A
Tamanho médio (µm) ^B	105,82 ^b ± 75,11	122,42 ^a ± 99,08	59,25 ^c ± 27,67	53,47 ^c ± 22,54
Rendimento do processo (%) ^B	53,17 ^c ± 2,22	75,58 ^b ± 1,93	72,14 ^b ± 0,48	88,08 ^a ± 3,13
Eficiência de encapsulação (%) ^B	53,02 ^a ± 11,98	23,18 ^b ± 5,98	30,41 ^{ab} ± 5,52	46,87 ^{ab} ± 13,49
Teor de material lipídico superficial (%) ^B	9,97 ^a ± 0,45	8,85 ^a ± 0,90	5,46 ^b ± 0,51	8,32 ^a ± 0,75
Teor de éster etílico no resíduo (%)	23,65 ^a ± 1,88	9,74 ^b ± 0,30	2,34 ^c 0,44	3,95 ^c ± 0,61

^A Onde: W1 = 5% de isolado protéico de soro; W2 = 10% de isolado protéico de soro; S1 = 5% de isolado protéico de soja; S2 = 10% de isolado protéico de soro

^B Os resultados representam as médias de três determinações. As amostras seguidas de letras iguais na linha não diferem (p > 0,05) pelo teste de Tukey.

3.2 Distribuição de tamanho e tamanho médio das microcápsulas

A distribuição do tamanho de partículas (em μm) seguiu uma distribuição unimodal com tendência à normalidade em todos os ensaios, conforme apresentado na Figura 1.

O efeito da variável independente concentração de proteína não foi observado através da ANOVA ($p > 0,05$), somente sua interação com o tipo de proteína e este isoladamente, conforme observado na Tabela 2. Os ensaios W1 e W2 apresentaram partículas com maiores tamanhos médios (105,82 e 122,42 μm , respectivamente) quando comparados com S1 e S2 (59,25 e 53,47 μm , respectivamente). Os tamanhos médios de partícula para os ensaios S1 e S2 não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$), como pode ser observado na Tabela 1.

3.3 Morfologia das microcápsulas

Na Figura 2 estão apresentadas as micrografias obtidas para os quatro ensaios. As microcápsulas produzidas com isolado protéico de soja apresentaram superfície rugosa e formato tendendo ao circular, com presença de microcápsulas menores aderidas nas reentrâncias. Já as microcápsulas produzidas com isolado protéico de soro apresentaram formatos irregulares, parecendo aglomerados protéicos.

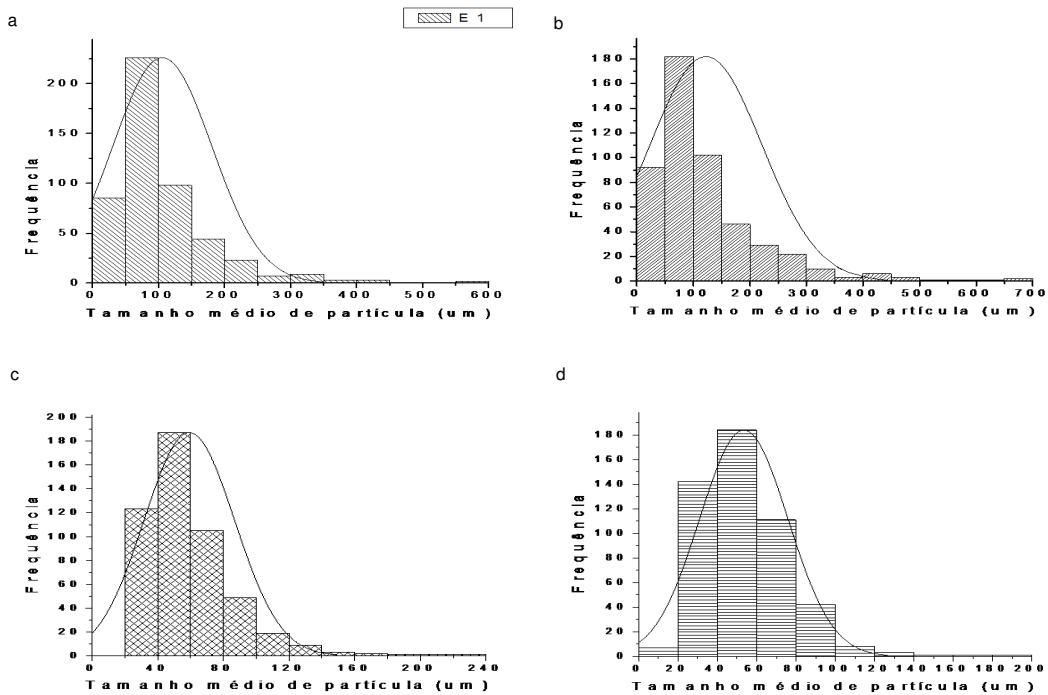


Figura 1. Distribuição de tamanho das microcápsulas liofilizadas obtidas por gelificação enzimática.

Onde: (a) W1 = 5% isolado protéico de soro; (b) W2 = 10% isolado protéico de soro; (c) S1 = 5% isolado protéico de soja; (d) S2 = 10% isolado protéico de soja.

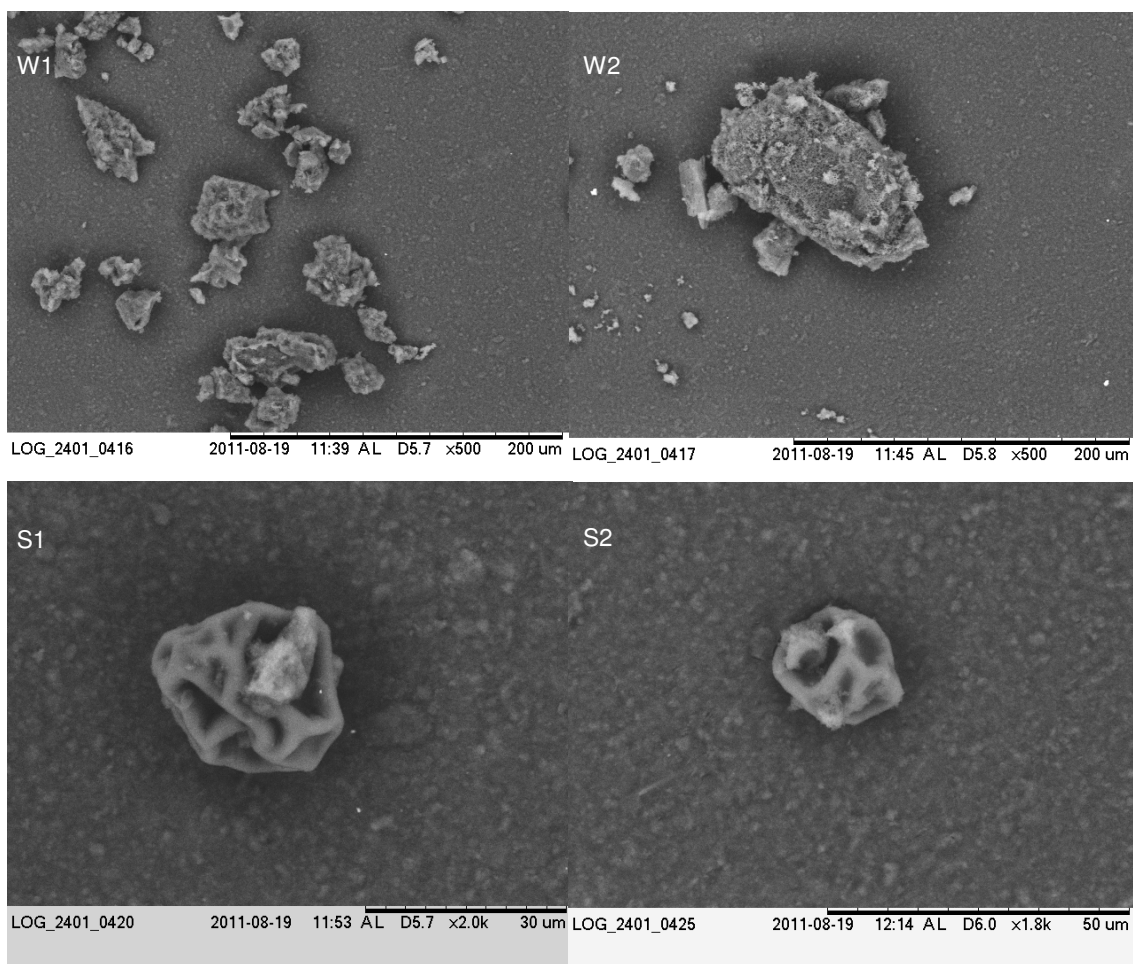


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas contendo éster etílico de óleo de peixe produzidas por gelificação enzimática.

Onde: W1 = 5% isolado protéico de soro; W2 = 10% isolado protéico de soro; S1 = 5% isolado protéico de soja; S2 = 10% isolado protéico de soja.

Tabela 2. Análise de variância dos efeitos das variáveis tipo e concentração de proteína e interação destas para cada variável dependente estudada.

ANOVA - TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA					
Efeito	SQ	GL	QM	F	p
Proteína	1668160	1	1668160,00	398,82	0,00000**
Concentração	14641	1	14641,00	3,50	0,06150
Proteína x Concentração	62672	1	62672,00	14,98	0,00011**
Erro	8348850	1996	4182,79		
Total SS	10094323	1999			

ANOVA - RENDIMENTO DE PROCESSO					
Efeito	SQ	GL	QM	F	p
Proteína	743,87	1	743,87	159,37	0,00000**
Concentração	1103,62	1	1103,62	236,45	0,00000**
Proteína x Concentração	31,43	1	31,43	6,73	0,03187*
Erro	37,34	8	4,67		
Total SS	1916	11			

ANOVA - EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO					
Efeito	SQ	GL	QM	F	p
Proteína	0,86	1	0,86	0,010	0,92438
Concentração	134,13	1	134,13	1,489	0,25704
Proteína x Concentração	1607,7	1	1607,70	17,852	0,00289**
Erro	720,44	8	90,06		
Total SS	2463	11			

ANOVA - MATERIAL LIPÍDICO LIVRE					
Efeito	SQ	GL	QM	F	p
Proteína	18,85	1	18,85	17,870	0,00288**
Concentração	2,2016	1	2,20	2,087	0,18654
Proteína x Concentração	11,6421	1	11,64	11,037	0,01050*
Erro	8,4388	8	1,05		
Total SS	41	11			

ANOVA - ÉSTER ETÍLICO NO RESÍDUO					
Efeito	SQ	GL	QM	F	p
Proteína	550,808	1	550,808	176,2203	0,00000**
Concentração	113,468	1	113,468	36,3018	0,00031**
Proteína x Concentração	180,653	1	180,653	57,7964	0,00006**
Erro	25,005	8	3,126		
Total SS	870	11			

* Nível de significância a 5%

** Nível de significância a 1%

3.4 Rendimento do processo

A ANOVA (Tabela 2) realizada para a variável dependente rendimento do processo permitiu observar que tanto o tipo e a concentração de proteína quanto a interação entre o tipo e a concentração de proteína apresentaram efeito significativo sobre esta variável ($p \leq 0,05$), indicando diferença entre pelo menos dois ensaios. O ensaio S2 apresentou os maiores valores de rendimento do processo, diferindo estatisticamente dos demais ($p \leq 0,05$), seguido pelos ensaios W2 e S1.

3.5 Eficiência de encapsulação

Através da ANOVA realizada (Tabela 2) para a variável dependente eficiência de encapsulação, pôde-se observar que somente a interação entre a concentração e o tipo de proteína apresentou efeito significativo sobre esta variável ($p \leq 0,05$), com diferença entre pelo menos dois ensaios. Na Tabela 1 pode-se observar os baixos valores de eficiência de encapsulação, sendo que W1 e S2 apresentaram os maiores valores e não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Além de este último ter apresentado resultados médios de eficiência de encapsulação semelhante estatisticamente a todos os demais ensaios ($p > 0,05$).

3.6 Teor de material lipídico superficial das microcápsulas

Avaliando os efeitos pela ANOVA realizada (Tabela 2) para a variável dependente “teor de material lipídico superficial” nas microcápsulas, pôde-se observar que tanto tipo de proteína quanto a interação entre o tipo e a concentração de proteína apresentaram efeito significativo sobre esta variável ($p \leq 0,05$), indicando diferença entre pelo menos dois ensaios. O menor valor de material lipídico livre foi observado em S1, sendo este diferente estatisticamente dos demais ($p \leq 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Cho, Shim e Park (2003), trabalhando com isolado protéico de soja e transglutaminase (TG) pelo processo de gelificação enzimática, encontraram valores de tamanho médio de partícula entre 30 e 60 μm , valores próximos aos valores encontrados para as microcápsulas produzidas com este tipo de proteína neste trabalho (Tabela 1). Possivelmente estes valores próximos podem ser explicados pela proximidade na velocidade de agitação utilizada nos dois trabalhos, pois muitos estudos têm comprovado a relação inversa entre velocidade de agitação e tamanho médio de partícula em diferentes metodologias de produção de microcápsulas (Guo & Zhao, 2008; Tirkkonen, Turakka & Paronen, 1994; Dong, Toure, Jia, Zhang & Xu, 2007; Jouzel, Pennarun, Prost, Renard, Poncelet & Demaimay, 2003).

Davidov-Pardo et al. (2008) observaram a eficiência de encapsulação de 65% para cápsulas produzidas com 10% de isolado protéico de soja pelo método de gelificação enzimática. Os valores inferiores para as eficiências de encapsulação obtidos no presente trabalho podem ser explicados por perdas na formação da dupla-emulsão ou perdas durante a lavagem das cápsulas, o mesmo fato foi citado por Cho, Shim e Park (2003).

Os resultados observados nos ensaios W1 (5% de isolado protéico de soro) e W2 (10% de isolado protéico de soro), como o maior teor de éster etílico de óleo de peixe no resíduo e baixos valores de rendimento do processo e eficiência de encapsulação podem ser explicados pelo fato de o isolado protéico de soro apresentar baixa capacidade de emulsificação com o óleo de peixe e a transglutaminase não alterar a viscoelasticidade da proteína ligada, conforme citado por Cho, Shim e Park (2003). Trabalhos anteriores indicam a necessidade de um desdobramento da estrutura globular da β -lactoglobulina para aumentar a acessibilidade a enzimas (Dickinson & Yamamoto, 1996).

Entretanto Rusli, Sanguansri e Augustin (2006) observaram maior eficiência de encapsulação quando utilizaram isolado protéico de soro, valores superiores a 85%, em comparação ao isolado proteico de soja pelo processo de *spray drying* após aquecimento da pré-emulsão de proteína adicionada de xarope de glucose a 100°C por 30 minutos. Previamente, Webb, Naeem e Schmidt (2002) relataram uma diferença significativa entre a solubilidade de isolado protéico de soja (60,7%) e isolado protéico de soro (96,3%). Tais diferenças de resultados encontrados na

literatura podem ser justificadas pelo fato de distintos métodos de preparo das emulsões iniciais e distintos métodos de encapsulação terem sido utilizados.

Cho, Shim e Park (2003) observaram que pelo processo de gelificação enzimática em dupla-emulsão ocorre a formação de microcápsulas estáveis sem a necessidade de aquecimento da dupla-emulsão, partindo de isolado protéico de soja como material de parede e a enzima transglutaminase.

A enzima TG (E.C. 2.3.2.13) catalisa reações de acil transferência, formando ligações cruzadas intra e intermoleculares em proteínas, peptídeos e aminas primárias, principalmente através de ligações covalentes entre resíduos de glutamina e lisina, sendo sua eficiência na formação destas ligações cruzadas dependentes da estrutura molecular da proteína (Griffin, Casadio & Bergamini, 2002; Chambi & Grosso, 2006). Segundo Aboumahmoud e Savello (1990), α -lactoalbumina e β -lactoglobulina apresentam maior dificuldade de formar ligações entre glutamina e lisina com o uso de TG, necessitando ajuste de pH (valores entre 6,5 a 8,5), adição de íons Ca^{2+} e ditiotretol, quando comparadas com soro reconstituído comercial e pó de soro modificado que não necessitam de nenhum ajuste.

Segundo Cho, Shim & Park (2003), o isolado protéico de soja oferece maior estabilidade de emulsão do óleo de peixe e boa capacidade de formação de gel sob a ação de enzimas como a enzima TG quando comparado com outras proteínas (isolado protéico de soro, caseinato de sódio e proteína solúvel de trigo), sendo que a concentração da TG influencia diretamente a formação de gel a partir

de isolado protéico de soja. Vários estudos utilizando TG em proteína de soja indicam a sua efetividade no aumento da habilidade de absorção de água e de formação de gel desta proteína (Motoki, Nio & Takinami, 1994; Babiker, 2000). Tal fato possivelmente pode explicar os melhores valores de rendimento do processo, os menores valores de éster etílico de óleo de peixe no resíduo e de material lipídico na superfície para microcápsulas produzidas com isolado protéico de soja, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Com relação às características morfológicas, microcápsulas de óleo de peixe produzidas por processo semelhante utilizando isolado protéico de soja, apresentaram poros superficiais (Cho, Shim & Park, 2003). Estes poros são provavelmente vestígios das gotículas que estavam originalmente presentes na superfície e foram perdidas no processo de microencapsulação e lavagem (Lee & Rosenberg, 2000). Neste trabalho foram observadas elevadas rugosidades nas superfícies das microcápsulas produzidas com isolado protéico de soja, já as microcápsulas produzidas com isolado protéico de soro apresentaram irregularidades menos definidas, conforme pode ser observado na Figura 2. Tang e Li (2012) também observaram a presença de rugosidades na superfície de microcápsulas produzidas com isolado protéico de soja pelo processo de *spray drying*, justificando tal fato pelo encolhimento desigual da cápsula durante o processo de secagem e/ou pelo elevado teor protéico da sua parede.

5 CONCLUSÃO

O tipo de proteína utilizado como material de parede para o processamento das microcápsulas influenciou em todas as variáveis dependentes estudadas, sendo que o ensaio com 10% de isolado protéico de soja em proporção de 2:1 (material de parede: material de recheio) apresentou o maior valor de rendimento e boa eficiência de encapsulação, com baixos valores de material lipídico livre e teor de éster etílico de óleo de peixe no óleo da segunda emulsão que se tornou descarte, sendo considerado o melhor dentre os ensaios realizados.

6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro dos órgãos governamentais brasileiros (CNPq) pela bolsa doutorado. Agradecem aos fornecedores das matérias primas utilizadas no trabalho Vital Atman, The Solae Company, Kienast & Kratschmer LTDA, Croda do Brasil LTDA e Ajinomoto.

7 REFERÊNCIAS

- Aboumahmoud, R., & Savello, P. (1990) Cross-linking of whey protein by transglutaminase. *Journal of Dairy Science*, 73, 256.263.
- Ackman, R.G. Marine lipids and omega-3 fatty acids. (2006). In: Akoh, C. C. *Handbook of functional lipids*. Boca Raton: CRC.

AOCS (2009). *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. 6th ed. AOCS, Champaign, IL.

Babiker, E. E. (2000). Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein. *Food Chemistry*, 70, 139–145.

Chambi, H. & Grosso, C.R.F. (2006). Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*, 39, 458-466.

Cho, Y. H., Shim, H. K., & Park, J. (2003). Encapsulation of fish oil by an enzymatic gelation process using transglutaminase cross-linked protein. *Journal of Food Science*, 68, 2717-2723.

Davidov-Pardo, G., Roccia, P., Salgado, D., León, A. E., & Pedroza-Islas, R. (2008). Utilization of different wall materials to microencapsulate fish oil evaluation of its behavior in bread products. *American Journal of Technology*, 3, 384-393.

Dickinson, E., & Yamamoto, Y. (1996). Rheology of milk protein gels and protein-stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1371-1377.

Dong, Z. J., Toure, A., Jia, C. S., Zhang, X. M., & Xu, S. Y. (2007). Effect of processing parameters on the formation of spherical multinuclear microcapsules encapsulating peppermint oil by coacervation. *Journal of Microencapsulation*, 24, 634–646.

Guo, H. & Zhao, X. (2008). Preparation of microcapsules with narrow-size distribution by complex coacervation: Effect of sodium dodecyl sulphate concentration and agitation rate. *Journal of Microencapsulation*, 25, 221-227.

Griffin, M., Casadio, R., & Bergamini, C. M. (2002). Transglutaminases: Nature's biological glues. *Biochemical Journal*, 368, 377-396.

Jouzel, B., Pennarun, A. L., Prost, C., Renard, D., Poncelet, D., & Demaimay, M. (2003). Encapsulation of a lipid precursor, the eicosapentaenoic acid, to study the development of the *Crassostrea gigas* oyster flavours. *Journal of Microencapsulation*. 20, 35–46.

Kitessa S. M., Gulati, S. K., Ashes, J. R., Fleck, E., Scott, T. W., & Nichols, P. D. (2001). Utilisation of fish oil in ruminants I. Fish oil metabolism in sheep. *Animal Feed Science Technology*, 89,189–199.

Lee, S. J., & Rosenberg, M. (2000). Whey protein-based microcapsules prepared by double emulsification and heat gelation. *LWT- Food Science and Technology*, 33, 80–88.

Motoki, M., Nio, N., & Takinami, K. (1994). Functional properties of food proteins polymerized by transglutaminase. *Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1257-1261.

Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., Diego, S. M., Sanz, M. T., & Carballido, J. R. (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 1–12.

Rusli, J. K., Sanguansri, L., & Augustin, M. A. (2006). Stabilization of oils by microencapsulation with heated protein-glucose syrup mixture. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83, 965-972.

Sanguansri, L., & Augustin, M. A. (2007). Microencapsulation and delivery of omega-3 fatty acids. Functional food ingredients and nutraceuticals, in: *Functional food ingredients and nutraceuticals*, edited by J. Shi, CRC: Boca Raton, pp. 297–327.

Serna-Saldivar, S. O., Zorrilla, R., La Parra, C., Stagnitti, G., & Abril, R. (2006). Effect of DHA Containing Oils and Powders on Baking Performance and Quality of White Pan Bread. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61, 121–129.

Simopoulos, A. P. (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54, 438-463.

Tang, C.-H. & Li, X.-R. (2012). Microencapsulation properties of soy protein isolate and storage stability of the correspondingly spray-dried emulsions. *Food Research International*, doi: 10.1016/j.foodres.2012.09.010

Tirkkonen, S., Turakka, L., & Paronen, P. (1994). Microencapsulation of indomethacin by gelatin-acacia complex coacervation in the presence of surfactants. *Journal of Microencapsulation*, 11, 615-626.

Trautwein, E. A. (2001). N-3 fatty acids – physiological and technical aspects for their use in food. *European Journal of Lipid Science Technology*, 103, 45–55.

Velasco, J., Dobarganes, M. C., & Márquez-Ruiz, G. (2000). Oxidation of free and encapsulated oil fractions in dried microencapsulated fish oil. *Grasas y Aceites*, 51, 439-446.

Webb, M. F., Naeem, H. A., & Schmidt, K. A. (2002). Food protein functionality in a lipid system: a comparison of deaminated wheat protein with dairy and soy protein. *Journal of Food Science*, 67, 2896-2902.

ARTIGO II

EVALUATION OF THE FATTY MATTER CONTAINED IN MICROCAPSULES OBTAINED BY THE ENZYMATIC GELATION PROCESS

Artigo submetido à revista

LWT – Food Science and Technology

ISSN: 0023-6438

EVALUATION OF THE FATTY MATTER CONTAINED IN MICROCAPSULES OBTAINED BY THE ENZYMATIC GELATION PROCESS

Leilane Costa de Conto^{1*}; Gabriel Deschamps Fernandes¹; Carlos Raimundo
Ferreira Grosso¹; Marcos N. Eberlin²; Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves¹.

¹ School of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP,
Brazil, ZIP CODE: 13083-862

² Thomson Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of
Campinas, Campinas, SP, Brazil, ZIP CODE: 13083-970.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the fatty matter encapsulated by the enzymatic gelation process under different processing conditions, using soy protein isolate as the wall material and the enzyme transglutaminase, studying six different methods of extracting the core material (omega-3) to obtain less altered fatty matter. The microcapsule wall degradation tests showed differences, degradation being observed when using the acid methodology, alkaline enzymatic method and the acid method with direct determination of the fatty acid composition. The presence of triglycerides and ethyl ester was shown in the microcapsules by way of easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS), high performance size exclusion chromatography (HPSEC) and the fatty acid composition as determined by gas chromatography (GC). The microcapsules

* Correspondence: Tel.: 55 019 32891186 Fax: 55 019 32893617. E-mail:
leilanedeconto@gmail.com

23 produced with 5% ethyl ester at 11000 RPM with 10% Soy Protein Isolate and 1%
24 Span 80 contained 2.64 g EPA + DHA / 100 g microcapsules.

25

26 **KEYWORDS:** Omega-3 polyunsaturated fatty acids; soy protein isolate;
27 transglutaminase; wall degradation; enzymatic gelation.

1 INTRODUCTION

Epidemiological and ingestion studies suggest that the consumption of omega-3 polyunsaturated fatty acids such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) has several benefits for human health, such as anti-carcinogenic activity, anti-inflammatory effects, reduction in the risk of heart disease, and the prevention of osteoporosis and neurological disorders (Alzheimer's disease, Crohn's disease etc.), also aiding in the reduction of depression (Riediger, Othman, Suh & Moghadasian, 2009).

According to Rubio-Rodríguez, Beltrán, Jaime, Diego, Sanz & Carballido (2010), fish are the traditional sources of EPA and DHA-rich oils, and the production of concentrated methyl or ethyl ester derivatives from fish oil stands out, since these are more stable to oxidation. However, the application of fish oil and its derivatives in food systems is limited by their oxidative instability during storage, presenting off-flavors (Cho, Shim & Park, 2003). Thus techniques have been developed aimed at protecting these compounds against oxidation, such as microencapsulation, which simultaneously facilitates incorporation of these ingredients into food formulations (Ackman, 2006).

Various wall materials and encapsulation methods have been tested for the microencapsulation of fish oil (Lee & Rosenberg, 2000). Protein films are generally excellent oxygen and aroma barriers and are used to produce microcapsules using simple or complex coacervation techniques (Arshady, 1990), or techniques that consist of double emulsions and subsequent reticulation with glutaraldehyde or heat gelation. Both methods result in the retention of large amounts of core

material and water insolubility (Lee & Rosenberg, 2000). However, the use of protein wall materials for sensitive ingredients is limited because proteins are generally heat instable and damaged by organic solvents, and also there are legal limitations to the use of glutaraldehyde in foods. However, the use of reticulating agents to convert the proteins into stabler forms could lead to an increment in their industrial applications (Babiker, 2000).

The use of the enzyme transglutaminase (TG) as a protein reticulating agent, which is permitted for use in foods, is a promising option. TG (E.C. 2.3.2.13) catalyses acyl transference reactions, forming intra and intermolecular cross linkages in proteins, peptides and primary amines, principally by way of covalent bonds between the glutamine and lysine residues, its efficiency in forming these cross links depending on the molecular structure of the protein (Griffin, Casadio & Bergamini, 2002; Chambi & Grosso, 2006). Some studies on the use of transglutaminase have been published in the literature, reporting on its capacity to form cross linkages in various proteins, such as myofibrillar proteins (Kahn & Cohen, 1981), milk proteins (Jaros, Partschefeld, Henle & Rohm, 2006), egg white and yolk (Sakamoto, Kumazawa & Motoki, 1994; Lim, Mine & Tung, 1998), fish proteins (Joseph, Lanier & Hamann, 1994), cereal proteins (Basman, Köksel & Ng, 2002) and soy proteins (Nio, Motoki & Takinami, 1985; Ikura, Kometani, Sasaki & Chiba, 1980; Kang, Matsumura, Ikura, Motoki, Sakamoto & Mori, 1994; Babiker, 2000; Cho, Shim & Park, 2003; Serna-Saldivar, Zorrilla, La Parra, Stagnitti & Abril, 2006).

Soy protein is an example of a protein that can be used to form films, since it is an abundant by-product from the soybean oil industry and is already widely

known and used in food products, due to its high nutritional value, its contribution to the texture and emulsifying properties of processed foods, and because it contains components of benefit to the health, such as isoflavones (Roesch & Corredig, 2002). Epidemiological and clinical studies have suggested that the low incidence of some types of cancer is associated with diets rich in soybean, as well as reducing the risk of heart disease (Badger, Ronis, Simmen & Simmen, 2005; Hamilton-Reeves, Rebello, Thomas, Kurzer & Slaton, 2008).

Cho, Shim & Park (2003) studied the capacity of soy protein isolate form microcapsules together with the enzyme transglutaminase and a double-emulsion, with subsequent enzymatic gelation under different process conditions, and obtained stable capsules using 10% SPI without the need to heat the double-emulsion for heat gelation. However, some studies have indicated the existence of undesirable aromas and flavors in products enriched with microcapsules containing fish oil produced by a similar technique (Serna-Saldivar et al., 2006).

The objective of the present research was to study the constitution of the fatty matter encapsulated by an enzymatic gelation process under different process conditions, using soy protein isolate as the wall material, the enzyme transglutaminase and fish oil ethyl ester (FOEE) as the core material; evaluating the morphological characteristics, the process yield, encapsulation efficiency and different methods for extracting the encapsulated material.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials

Fish oil ethyl ester (FOEE) (62% EPA + DHA, Vital Atman, Uchoa, SP), corn oil (Qualitá, Bunge Alimentos S.A., Gaspar, SC), Span 80 (Croda do Brasil Ltda, São Paulo, SP), soy protein isolate (The Solae Company, Esteio, RS, 88% protein w.w.b.), active transglutaminase TG-S® (TG) (Ajinomoto, Limeira, SP).

2.2 Methods

2.2.1 Microcapsule production

The microcapsules were produced using the enzyme transglutaminase (TG) as the jelling agent, using the methodology described by Cho, Shim & Park (2003), with the variations shown in Table 1.

The microcapsules were prepared using a double-emulsification process followed by enzymatic gelation and the process were repeated three times.

(a) A 5 or 10% solution of the protein was first prepared in 100 mL deionized water, and 0.025% (2.7 UA/g of protein) of the enzyme TG added at room temperature and pH 6.0.

(b) The first emulsion was formed by mixing the FOEE in the initial protein solution for 10 minutes in a basic T18 Ultraturrax (Ika-Werk, Brasília, DF) at 11000 *rpm*. The ratio of wall material to core material was 2:1 (w/w).

(c) 400 mL of corn oil, pre-heated to 50°C was used to form the second emulsion, adding the surfactant sorbitan mono-oleate (Span 80). Immediately after forming the first emulsion, this was slowly added to the second emulsion with mild magnetic stirring. After mixing, the double-emulsion was maintained at 37°C for 17 hours in a chamber (BOD).

The microcapsules were filtered and washed with anhydrous ethanol three times and then once with petroleum ether, and then freeze-dried in a Pirani 50 freeze-dryer (Edwards, USA), where the temperature was lowered to -40°C under a pressure of 0.1 mmHg for 24 h.

2.2.2 Process yield and encapsulation efficiency

The process yield was determined from the mass of freeze-dried microcapsules obtained divided by the total initial mass used.

The encapsulation efficiency was obtained after the acid degradation of the capsules, where 0.2 g of sample was added to 4.5 mL of boiling deionized water containing 5.5 mL 8 M hydrochloric acid, and maintained in a boiling water bath for 30 minutes (until complete degradation of the wall material). The mixture was subsequently filtered and washed with 10 mL boiling deionized water. The filter papers with the hydrolyzed samples were dried in an oven and then extracted according to the methodology for the determination of the oil content (AOCS Ac 3-44, 2009) of compounds with high protein content. The encapsulation efficiency

was determined using equation (1) as described by Davidov-Pardo, Roccia, Salgado, León & Pedroza-Islas (2008).

$$\% \text{ Encapsulation efficiency} = \frac{(\text{Total lipid content} - \text{free lipid content}) \times 100}{\text{Total lipid content}} \quad (1)$$

2.2.3 Microcapsule morphology

The morphology of the microcapsules was determined using a model TM 3000 high vacuum scanning electronic microscope (SEM) (Hitachi, Japan), with a magnitude of x15 to x3000 (digital zoom 2, x4) and accelerating voltage of 15 kV (Analy mode). The samples were arranged on aluminum stubs containing a double-faced copper tape, using carbon glue to secure the material. The best fields were selected, where the microcapsules were isolated.

2.2.4 Size distribution and average size of the microcapsules

The average size and size distribution of the microcapsules were determined using a Mastersizer 2000 (Malvern Instrument LTDA, Worcestershire, UK). Three readings were made giving a total of nine repetitions, with agitation at 3500 rpm and 25% of ultrasound to disperse the particles in the water.

2.2.5 Extraction of the free fatty matter

The free fatty matter was extracted using the methodology described by Velasco, Dobarganes & Márquez-Ruiz (2000), with some adaptations of the scale.

To determine the free oil content, 20 mL of petroleum ether were added to 0.8 g microcapsules and stirred for 15 minutes at 25°C. The microcapsules were then filtered through anhydrous Na₂SO₄, the solvent evaporated and the samples dried with nitrogen.

The microcapsules recovered after this determination, were used to determine the degradation of the wall material by the different extraction methods, and the constitution of the encapsulated material.

2.2.6 Extraction of the encapsulated fatty matter

The microcapsules obtained with 5% FOEE, 10% SPI, at 1100 rpm and with 3% of Span 80 (E3), due to their greater availability, were submitted to six different extraction methods to extract the encapsulated material, so as to determine which method extracted more material with higher quality. The amount of encapsulated fatty matter extracted by the first five methods was determined using equation (2):

$$\% \text{ Encapsulated Matter} = \frac{\text{g fatty material extracted} \times 100}{\text{g microcapsules}} \quad (2)$$

In parallel, the physical degradation of the microcapsule wall by each method was determined by optical microscopy (eclipse E800, Nikon, Japan),

photographing the images using a digital camera controlled by the image-pro plus 6.0 program, using the x12, x25 and x40 objectives.

Below the code adopted for the samples that will be discussed.

TD1 = alkaline degradation, using the methodology described by Velasco, Dobarganes & Márquez-Ruiz (2000), where 0.1 g of microcapsules free of surface oil were dispersed in 1 mL deionized water at 65°C with stirring, and 0.2 mL 25% NH₄OH then added and heated at 65°C for a further 15 minutes. The solution was then cooled and transferred to a separating funnel and the beaker washed with 10 mL ethanol. The encapsulated material was extracted three times in the following sequence: a) 50 mL of a 1:1 (v/v) solution of ethyl ether : petroleum ether; b) 5 mL of anhydrous ethanol, 30 mL of a 1:1 (v/v) solution of ethyl ether : petroleum ether; c) 30 mL of a 1:1 (v/v) solution of ethyl ether : petroleum ether. After filtration through anhydrous Na₂SO₄, the solvent was evaporated off with nitrogen to constant weight.

TD2 = enzymatic degradation using the methodology described by Mascarenhas (2010) with some adaptations, where 0.1 g of microcapsules free of surface oil were dispersed in 4 mL of enzyme solution containing 0.5% Protex 6L liquid bacterial protease (Genencor, Danisco, Cotia, SP, Brazil) and 0.5% liquid bacterial α-amylase (Thermamyl 2X, Novozymes, Araucária, PR, Brazil) at pH 8. The mixtures were placed in a water bath at 50°C for 1 hour, mixing the contents of the tubes every 10 minutes for 20 s. The contents were then transferred to a separating funnel and 20 ml of a 1:1 (v/v) solution of petroleum ether : deionized

210 water added, thus starting the phase separation process. The funnels were left to
211 rest overnight, after which it was possible to separate the aqueous phase from the
212 residue of wall material. The organic solvent phase was run into a weighed flask
213 and the solvent evaporated off in nitrogen to constant weight.

214

215 TD3 = acid degradation as described in item 2.2.2 up to the filtering step, where
216 the samples were filtered without the aid of boiling water and simply transferred
217 and dried in nitrogen for cold extraction. Cold extraction was carried out by adding
218 20 mL of a 1:1 (v/v) solution of petroleum ether : hexane, the solvents and fatty
219 material being retained in weighed test tubes, evaporating the solvents off with
220 nitrogen to constant weight.

221

222 TD4 = alkaline enzymatic degradation following the methodology described by
223 Lamprecht, Schäfer & Lehr (2001), where 0.1 g of microcapsules free of surface
224 oil, were dispersed in 5 mL of a 2 M solution of NH_4OH plus 0.5 mL of the protease
225 Savinase® (Novozymes, Araucária, PR, Brazil) and incubated overnight at 40°C
226 without shaking. Ten milliliters of hexane were then added and the solvents and
227 fatty material retained in 50 mL weighed test tubes, evaporating off the solvents
228 with nitrogen to constant weight.

229

230 TD5 = mechanical degradation assisted by microwaves following the extraction
231 methodology described by Polovarapu, Oliver, Ajlouni & Augustin (2011), where
232 0.1 g of microcapsules free of surface oil were heated in a microwave oven at
233 maximum power for 10 minutes, and then macerated in a pestle and mortar. The

mixture was subsequently transferred to a 50 mL test tube, washed and dispensed in 2 mL deionized water at 50°C, mixed using a vortex mixer, 4 mL of hexane added and manually shaken, and finally centrifuged at 1000 g for 10 minutes. The hexane layer was separated into a 70 mL weighed test tube and a further 4 mL of hexane added, manually shaken and centrifuged again at 1000 g for 10 minutes. The hexane layer was removed back to the initial test tube and the solvent evaporated off with nitrogen to constant weight.

TD6 = acid degradation with the direct determination of the fatty acid composition using the methodology described by Ruben & Barclay (1999). Three samples (300 mg) were weighed into weighed 50 mL test tubes and 4 mL of a solution of methanol containing 4% sulfuric acid added and mixed in a vortex for 15 s. The mixtures were then made inert using nitrogen gas and mixed again. The samples were then left on a digestion block for 1 hour at 110°C, shaking every 20 minutes. The samples were then cooled to room temperature and 1 mL of deionized water plus 1 mL hexane added, shaken for 20 seconds and centrifuged at 1000 g for 3 minutes. The supernatant was used to determine the fatty acid composition. This method was only evaluated with respect to degradation of the wall and preservation of the fatty acids, considering that the final product was obtained directly in the form of the fatty acid methyl esters.

2.2.7 Constitution of the free and encapsulated material

2.2.7.1 High performance size-exclusion chromatography to determine the lipid group constituents (HPSEC)

The extraction of the encapsulated material for the analysis of the lipid group constituents was carried out according to Lamprecht, Schäfer & Lehr (2001).

The presence of FOEE in the encapsulated and free fatty materials was evaluated according to Moura, Gonçalves, Grimaldi, Soares & Ribeiro (2006), using high performance size-exclusion chromatography (HPSEC) in a Perkin Elmer 250 liquid chromatograph equipped with a Sicon Analytic refractive index detector and 300 x 7.8 mm JORDI GEL DVB columns at 500Å and 100Å. The mobile phase was tetrahydrofuran (THF) with a flow rate of 1 mL/min, and the sample was dissolved in 1% THF, injecting 20.0 µL.

2.2.7.2 Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS)

The encapsulated material was extracted according to Lamprecht, Schäfer & Lehr (2001) for analysis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS). This technique is an ambient desorption/ionization method (Alberici, Simas, Sanvido, Romão, Lalli, Benassi, Cunha & Eberlin, 2010) that has been extensively used for the analysis of oils and biofuels (Riccio, Saraiva, Marques, Alberici, Haddad, Moller, Eberlin & Catharino, 2010).

The presence of FOEE in the encapsulated materials and in a sample of the ester itself were also evaluated from the mass spectra obtained in the positive

mode using a mono-quadrupole mass spectrometer (LC / MS 2010, Shimadzu), equipped with an EASI source. Typical EASI-MS conditions were: N₂ gas nebulization at a rate of 3 L.min⁻¹, surface angle ~ 30°, methanol at a rate of 20 µL.min⁻¹, and 2 µL of sample placed directly on the Kraft paper surface. Mass spectra were accumulated for 30 s in the *m/z* range from 50 to 1000 as described by Simas, Catharino, Cunha, Cabral, Barrera-Arellano, Eberlin & Alberici (2010).

2.2.7.3 Determination of the fatty acid constituents by gas chromatography (CG)

The encapsulated material was extracted as described by Ruben & Barclay (1999) in order to analyze the fatty acid composition.

The fatty acid composition was determined according to the AOCS method Ce 1-62 (2009) by capillary gas chromatography (CGC) using the Agilent 6850 Series GC system, as follows: Agilent DB-23 column (50% cyanopropyl) – methylpolysiloxane, length 60 m, internal diameter 0.25 mm, film 0.25 mm. The chromatographic operational conditions were: column flow = 1.0 ml/min; linear velocity 24 cm/sec; detector temperature of 280°C; injector temperature of 250°C; oven temperature of 110°C-5 min / 110-215°C – 5°C / min / 215°C = 34 min; stripping gas: helium; volume injected 1.0 µL; split 1:50.

The fatty acid compositions of one sample of FOEE and one sample of the corn oil used in the second emulsion were also analyzed to determine which fatty acids might be found on the inside of the microcapsules. The methyl esters of the fatty acids in these samples were then prepared using the methodology described

by Hartman & Lago (1973), adapted for use on a micro-scale, using the equipment conditions previously described.

2.2.8 The encapsulated fatty matter and FOEE contents

In order to visualize the encapsulated FOEE content both graphically and numerically, the encapsulated material was extracted from the microcapsules using the method described by Lamprecht, Schäfer & Lehr (2001), with an adaptation to the solvent washing step, where the material was transferred to separating funnels with 10 mL of anhydrous ethanol. The core material was extracted three times using the following sequence: a) 50 mL of a 1:1 (v/v) solution of ethyl ether: petroleum ether; b) 5 mL of anhydrous ethanol, 30 mL of a 1:1 (v/v) solution of ethyl ether: petroleum ether; c) 30 mL of a 1:1 (v/v) solution of ethyl ether: petroleum ether for better extraction of the material, and determined using equation (2) as cited in 2.2.6.

The encapsulated FOEE content was determined by multiplying the value obtained for the per cent EPA + DHA in item 2.2.7.3 by the value for the encapsulated fatty material.

2.2.9 Statistical analysis

Each microcapsule process was repeated three times. The results obtained were submitted to a statistical analysis using the analysis of variance (ANOVA), analyzing the difference between the means using Tukey's means comparison test

with the software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) and a 95% level of significance ($p \leq 0.05$).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Process yield and encapsulation efficiency

Table 1 shows the values obtained for process yield and encapsulation efficiency, where it can be seen that the process yields were lower in the trials where the surfactant concentration was varied (EG5 and EG6), which differed significantly from the others ($p \leq 0.05$). EG1 presented values over 100%, indicating the incorporation and surface adhesion of oil from the second emulsion.

There was no significant difference ($p > 0.05$) between the results found for encapsulation efficiency, with values of about 55%. Davidov-Pardo et al. (2008) obtained 65% encapsulation efficiency for capsules produced by a process similar to that used in the present study. The lower values obtained in the present study could be explained by losses during the formation of the double emulsion or losses during washing of the microcapsules (Cho, Shim & Park, 2003).

3.2 Free fatty matter content

Table 1 shows the results obtained for the free fatty matter. It can be seen that EG4 showed the highest value for the free fatty matter content, differing statistically from the other trials ($p \leq 0.05$), and trials EG5 and EG6 showed the smallest values. These data indicate an inverse relationship with the mean particle

size observed for the samples, possibly due to a larger surface of the microcapsules in EG4 (Figure 1).

According to Soottitantawat, Yoshii, Furuta, Ohkawara & Linko (2003), the size of the drop formed during the emulsification of the lipid matter with the protein inversely influenced the amount of surface oil.

Davidov-Pardo et al. (2008) found values for free fish oil of above 5% (exact value not specified) when working with soy protein isolate in an enzymatic gelation process. Velasco, Dobarganes & Márquez-Ruiz (2000), working with microcapsules obtained in a freeze-drying process using mono-hydrated D-lactose and sodium caseinate, obtained free oil results of 9.3 and 8.7 g/100g, respectively, for microcapsules containing fish oil and sunflower oil.

3.3 Microcapsule morphology

Figure 1 shows the micrographs of the microcapsules produced by enzymatic gelation, showing that the surface of the microcapsules was rough, with smaller particles adhered to the surface. The format of the EG6 microcapsules tended to a circular shape, possibly due to a greater amount of encapsulated fatty matter. According to Cho, Shim & Park (2003), fish oil microcapsules produced by a similar process presented superficial pores. These pores were probably vestiges of drops originally present on the surface, which were lost during the microencapsulation process (Lee & Rosenberg, 2000).

365

366 **Table 1.** Process yield and encapsulation efficiency, free and encapsulated fatty matter contents and mean particle size of
 367 the microcapsules obtained by enzymatic gelation according to the process variables

Trial	Velocity of agitation (RPM)	FOEE concentration (%)	SPI ^A concentration (%)	Span 80 concentration (%)	Process yield (%) ^B	Encapsulation efficiency (%) ^B	Free fatty matter content (%) ^B	Encapsulated oil content (g/ 100 g microcapsule) ^B	Mean particle size (μm) ^B
EG1	11000	0.0	10	3	101.67 ^a ± 2.98	-	13.57 ^c ± 1.17	7.16 ^{bc} ± 1.72	86.02 ^a ± 5.88
EG2	11000	2.5	5	3	76.19 ^{bc} ± 1.50	45.87 ^a ± 0.72	8.57 ^d ± 0.25	6.52 ^c ± 0.19	74.45 ^b ± 3.43
EG3	11000	5.0	10	3	72.26 ^c ± 2.65	56.41 ^a ± 3.42	17.71 ^b ± 0.33	13.11 ^a ± 1.12	76.06 ^b ± 6.46
EG4	24000	5.0	10	3	84.49 ^b ± 4.71	50.02 ^a ± 3.67	29.45 ^a ± 0.39	11.29 ^{ab} ± 2.36	57.19 ^c ± 2.48
EG5	11000	5.0	10	5	58.91 ^d ± 2.43	58.65 ^a ± 2.41	3.60 ^e ± 0.34	4.91 ^c ± 0.60	77.89 ^b ± 3.99
EG6	11000	5.0	10	1	57.22 ^d ± 3.16	55.92 ^a ± 1.24	4.07 ^e ± 0.71	14.01 ^a ± 2.16	79.96 ^{ab} ± 6.92

368 ^A SPI = soy protein isolate

369 ^B The results represent the mean of three determinations. Samples followed by the same letters in the same column do not differ ($p \leq 0.05$) according to Tukey's
 370 test

371

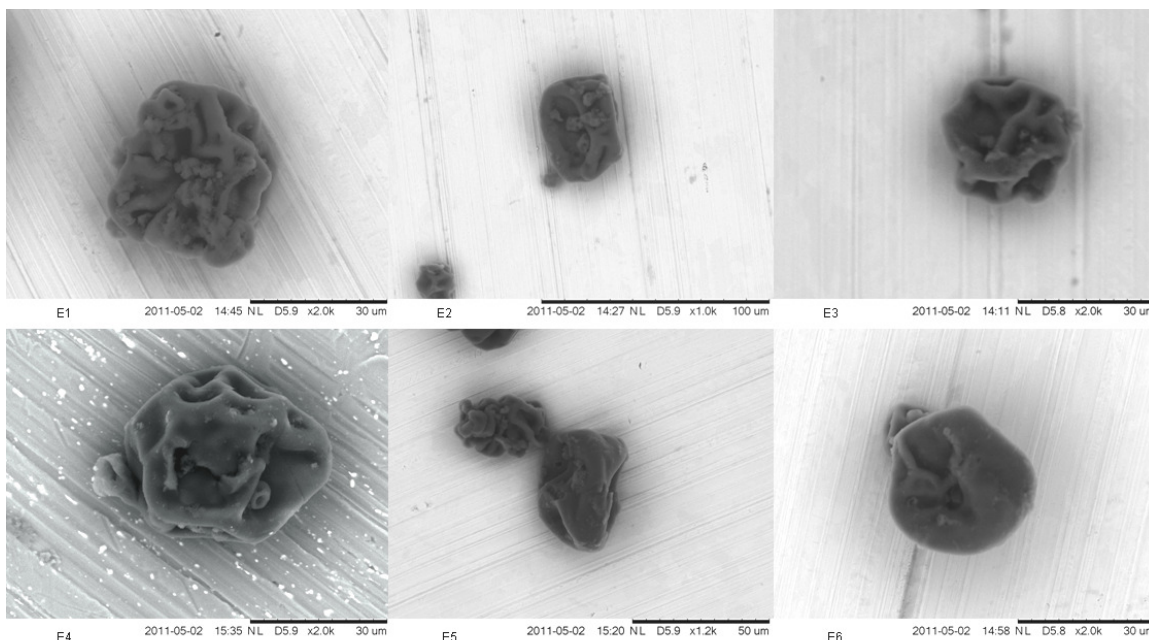


Figure 1. Scanning electronic microscopy of the FOEE microcapsules produced by enzymatic gelation

Where: EG1 = 0% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG2 = 2.5% of FOEE, 11000 RPM, 5% of SPI, 3% of Span 80; EG3 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG4 = 5% of FOEE, 24000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG5 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 5% of Span 80; EG6 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 1% of Span 80.

3.4 Size distribution and mean size of the microcapsules

The particle size distribution followed a unimodal distribution, with a tendency to normality in all the trials, as shown in Figure 2.

Table 1 shows the values obtained for the mean particle size, showing that a homogenization speed of 24000 rpm (EG4) gave the smallest particles, statistically different from the others ($p \leq 0.05$). According to Yeo, Bellas, Firestona, Languer & Kohane (2005), the homogenization speed influenced the mean size of fish oil microcapsules obtained by complex coacervation. Many other studies have shown that the greater the speed of agitation, the smaller the particle size, with greater encapsulation efficiency, not observed in the present study (Tirkkonen, Turakka & Paronen, 1994; Jégat & Taverdet, 2000; Mascarenhas, 2010).

3.5 Extraction of the encapsulated fatty matter

Figure 3A shows the effect of each extraction method tested, as shown by optical microscopy. It can be seen that only TD3 showed complete degradation of the wall material, and TD4 and TD6 showed partial degradation, the latter with the visible presence of free oil (indicated by arrows). The methods TD1 and TD2 showed intact microcapsules, although TD1 showed the largest value for the extraction of fatty matter and ruptured capsules (figure not presented). TD5 presented aggregation of the microcapsules, possibly due to the action of the microwaves and maceration applied in this method.

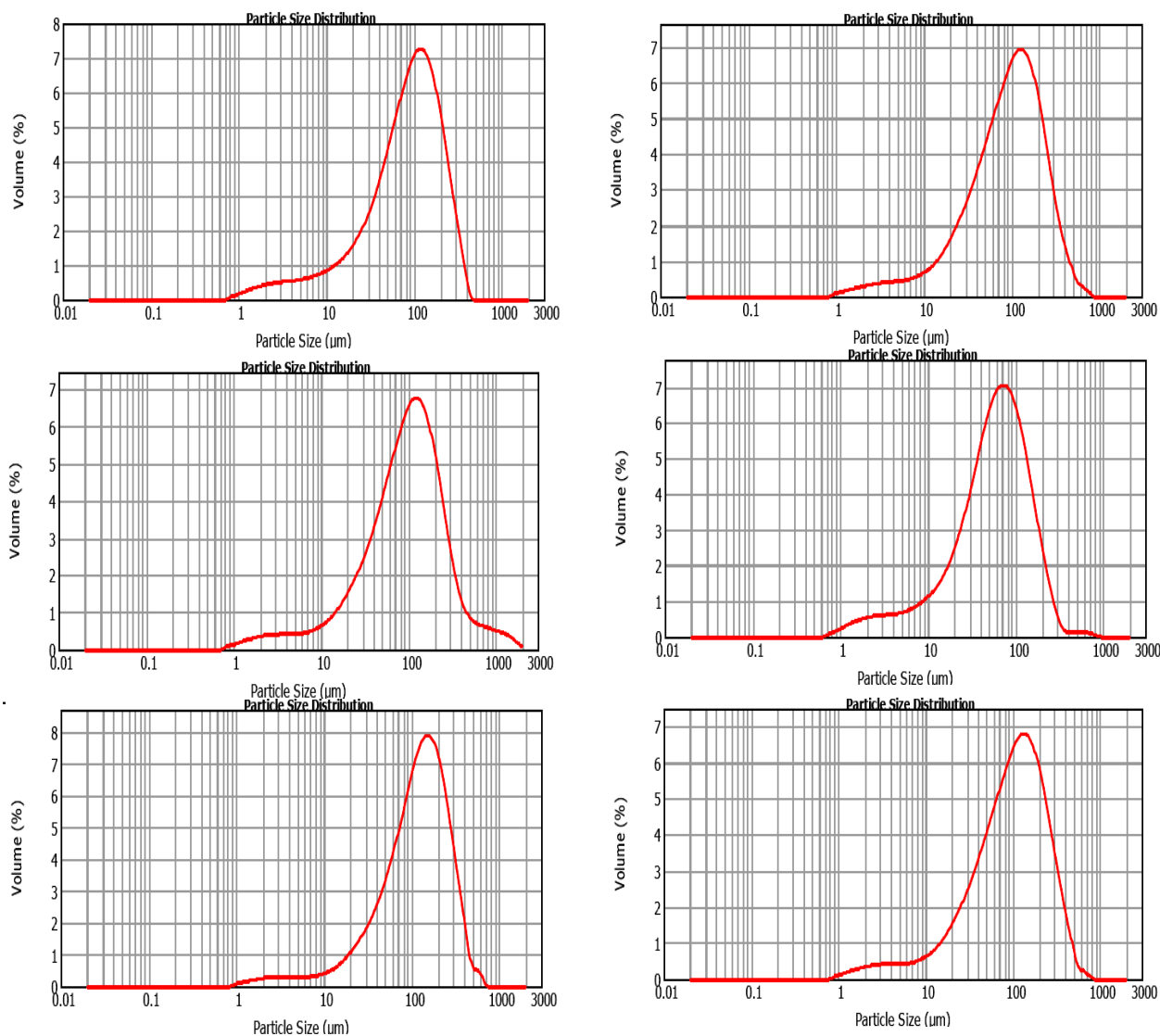


Figure 2. Size distribution of the particles obtained by enzymatic gelation and freeze-dried

Where: EG1 = 0% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG2 = 2.5% of FOEE, 11000 RPM, 5% of SPI, 3% of Span 80; EG3 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG4 = 5% of FOEE, 24000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG5 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 5% of Span 80; EG6 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 1% of Span 80.

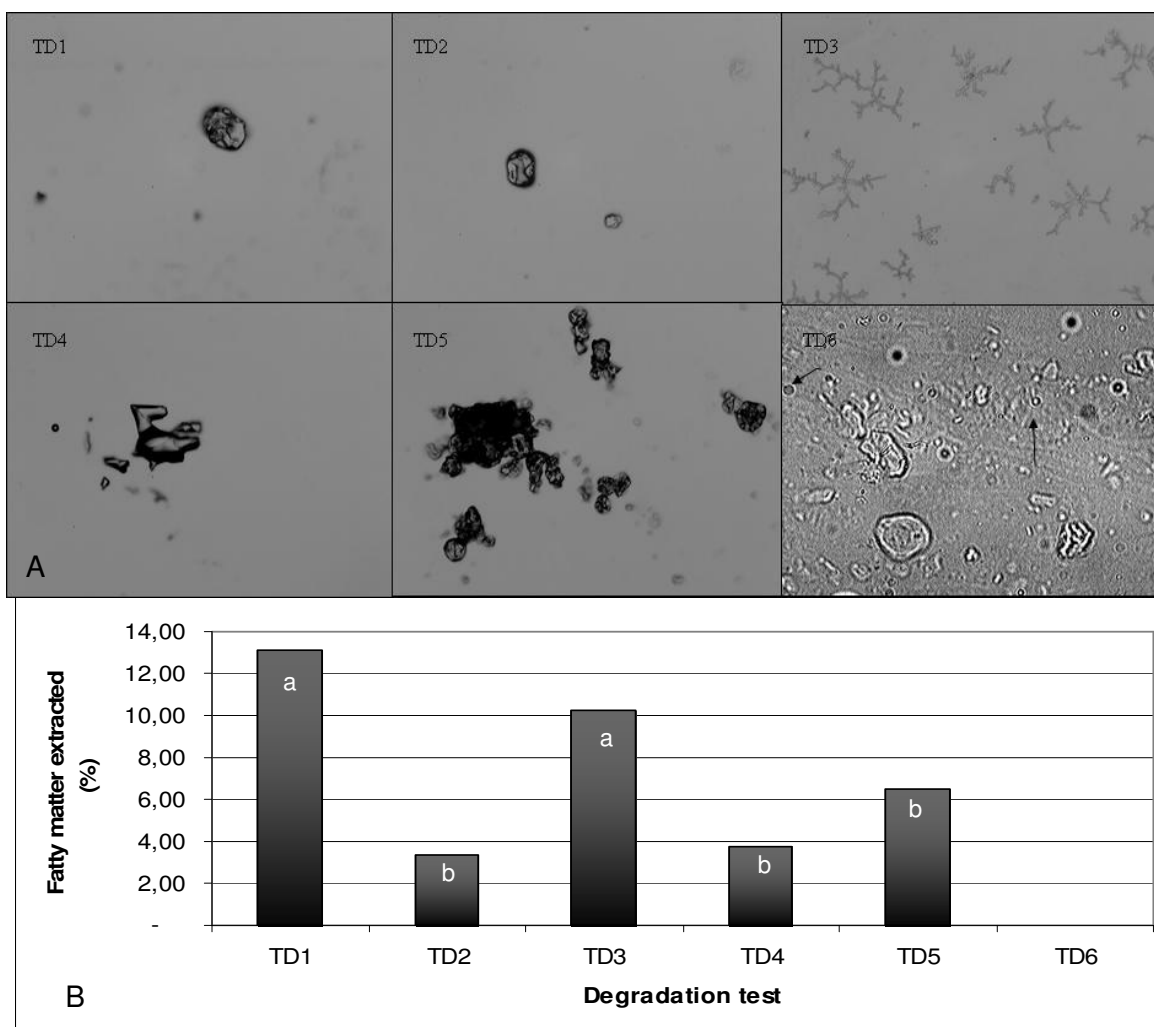


Figure 3. Micrographs of the fish oil ethyl ester microcapsules after the wall degradation tests and the respective results for the fatty matter extracted

Where: TD1 = alkaline degradation; TD2 = enzymatic degradation; TD3 = acid degradation; TD4 = alkaline enzymatic degradation; TD5 = mechanical degradation; and TD6 = acid degradation with direct determination of the fatty acid composition.

The values obtained for the encapsulated fatty matter extracted by TD1 (alkaline degradation) and TD3 (acid degradation) did not differ statistically ($p > 0.05$), and the values obtained by the other methods varied from these two ($p \leq 0.05$) but not from each other (Figure 3B).

Although acid degradation (TD3) presented elevated values for the extraction of the encapsulated material and total degradation of the microcapsule walls, it can not be used for the steps of evaluating the encapsulated material, since this method degrades the internal fatty matter, a fact proven by the presence of methyl esters of very short chain fatty acids in the fatty acid composition analysis. However, this method is more indicated for analyses such as encapsulation efficiency. The method of alkaline enzymatic degradation method (TD4) showed less damage to the fatty acid structure and recovery of the encapsulated fatty matter, and can therefore be used for the analyses described in 2.2.7.1 and 2.2.7.2. The acid degradation method with direct determination of the fatty acids maintained the fatty acids present unaltered, and is therefore recommended for the analysis described in 2.2.7.3.

3.6 Constitution of the encapsulated and free fatty matter

3.6.1 High performance size-exclusion chromatography of the lipid group constituents (HPSEC)

According to Moura et al. (2006), in studies aimed at obtaining fish oil ethyl esters, the HPSEC technique allows one to separate the esters from the other

compounds present in the reaction medium according to their molar mass, the order of elution being triacylglycerols, diacylglycerols, monoacylglycerols, esters and free fatty acids.

In the present trials, triacylglycerols were present in the greatest proportions with values over 60%, a fact which indicates the presence of corn oil from the second emulsion inside the microcapsules. The values found for ethyl esters varied from 11.45 (EG2) to 24.47% (EG6).

3.6.2 Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS)

Figure 4 shows the mass spectra obtained in the analysis of the FOEE components (A) and fatty materials extracted from EG1 (B) and EG4 (C). It can be seen that the compounds found in EG4, as also those from trials EG2, EG3, EG5 and EG6 (data not shown), presented a mixture of compounds A and B, a fact indicating the presence of corn oil from the second emulsion on the inside of the microcapsules, as also evidenced from the results for the lipid groups found.

Peaks of the ethyl esters $[EE + Na]^+$ of EPA (m/z 353) and of DHA (m/z 379) were identified in Figure 4 A. According to Simas et al. (2010), the main triacylglycerol peaks identified in EG1 (B) were PLL (C52:4, m/z 877), PLO (C52:3, m/z 879), POO (C52:2, m/z 881), LLL or OLLn (C54:6, m/z 901), OLL or OOLn (C54:5, m/z 903), OOL (C54:4, m/z 905) and the presence of oxidation products $[TAG + OOH + Na]^+$ m/z 935 (OLL), where: O = oleic acid, L = linoleic acid, Ln = linolenic acid and P = palmitic acid. These data can be confirmed together with the results obtained for the fatty acid composition of EG1, presented in the next item.

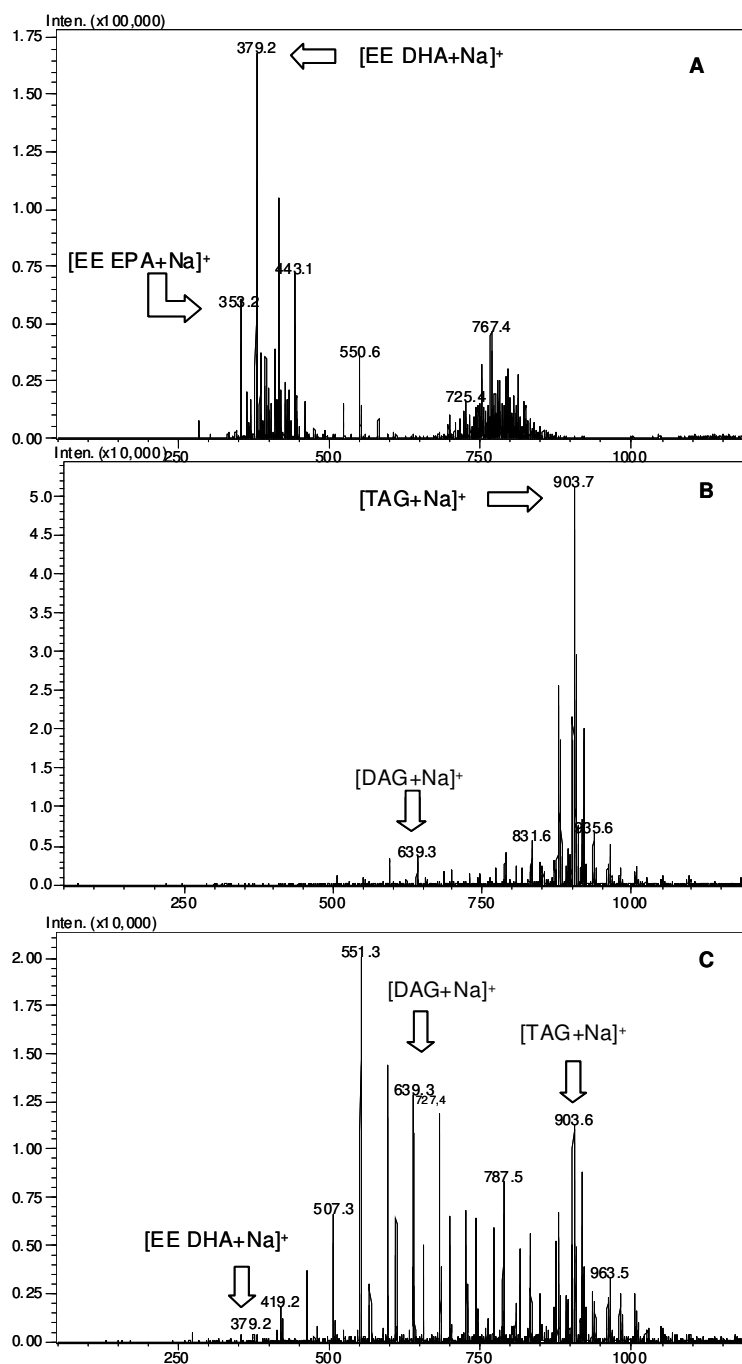


Figure 4. ESI(+)-MS from the samples of the original raw material (ethyl ester – A), EG1 (B) and EG4 (C) showing the the Triacylglycerols (TG), diacylglycerols (DG), EPA ethyl esters (EE EPA), DHA ethyl esters (EE DHA), and dimmers.

Where: EG1 = 0% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; and EG4 = 5% of FOEE, 24000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80.

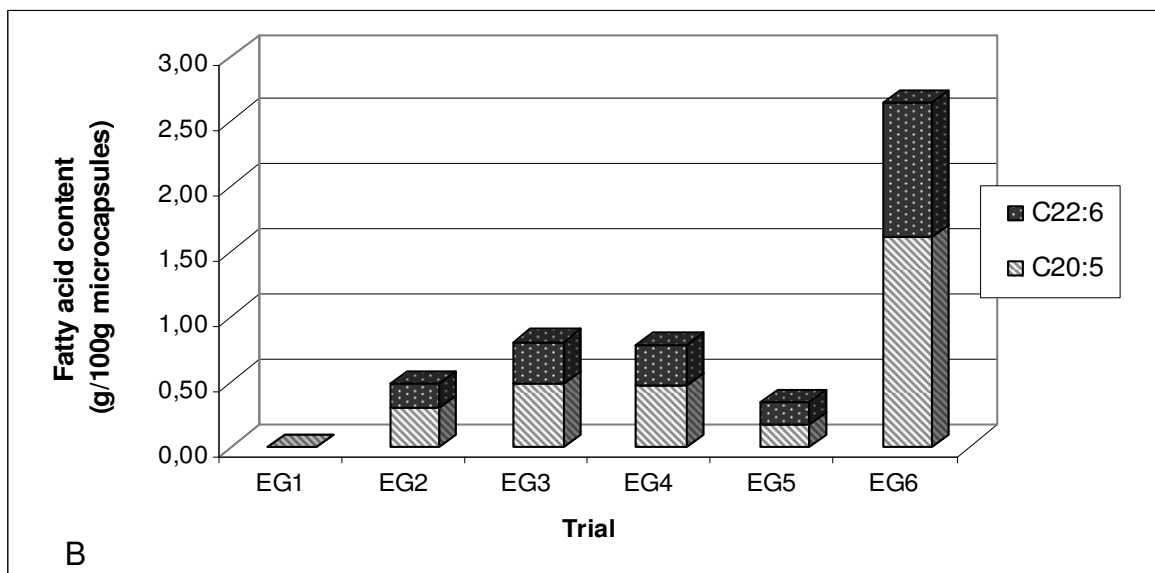
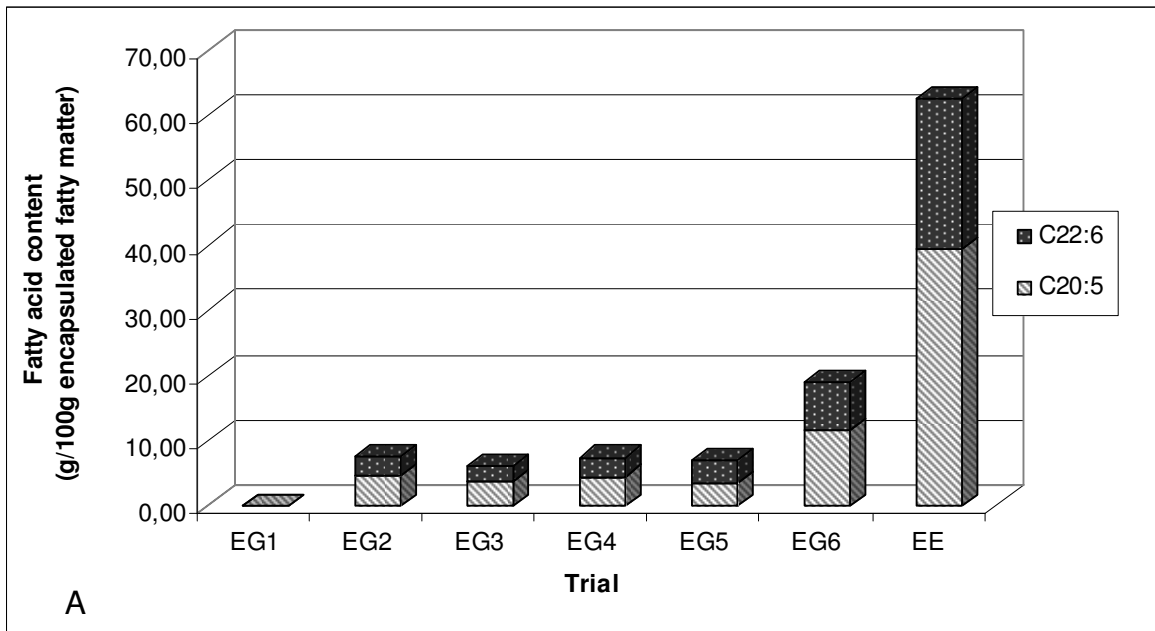


Figure 5. EPA (C20:5) and DHA (C22:6) ethyl ester contents in the encapsulated fatty material extracted from the microcapsules (A) and in the total weight of microcapsules (B)

Where: EG1 = 0% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG2 = 2.5% of FOEE, 11000 RPM, 5% of SPI, 3% of Span 80; EG3 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG4 = 5% of FOEE, 24000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG5 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 5% of Span 80; EG6 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 1% of Span 80.

3.6.3 Determination of the fatty acid constituents by gas chromatography (CG)

In the gas chromatographic analysis of the fatty acids, the values for EPA and DHA in the samples after extraction were much lower than expected, since the FOEE presented a total of 61.56% for EPA + DHA, whereas values with a maximum of 18.82% (Figure 5a) were found after extraction. Moura et al. (2006) found a value of 34.87% for EPA + DPA + DHA in fish oil ethyl esters, as well as a relevant increase in the values for the principal fatty acids found in corn oil, such as oleic acid (C18:1): from 10.27% in the FOEE to 31,95% (EG2), 31.54% (EG3), 29.70% (EG4), 25.24% (EG5) and 24.33% (EG6); and linoleic acid (C18:2): from 0.99% in the FOEE to 42.68% (EG2), 40.97% (EG3), 30.97% (EG4), 23.15% (EG5) and 24.97% (EG6). These data also prove the presence of corn oil on the inside of the microcapsules.

3.7 The encapsulated fatty matter and FOEE contents

Table 1 shows the amounts of encapsulated fatty matter, and it can be seen that the values found for EG3, EG4 and EG6 did not differ statistically ($p > 0.05$). Trial EG5 showed the lowest value (4.19 g fatty matter / 100 g microcapsule), possibly due to the use of a larger amount of surfactant in the second emulsion. The value for fatty matter of 7.16 g of fatty matter / 100 g of microcapsule found in EG1 indicated the encapsulation of corn oil, as proven before.

Figure 5 shows the graphs of the contents of the polyunsaturated fatty acids EPA + DHA in the fatty material extracted from the microcapsules (A) and in the total weight of the microcapsules (B).

The microcapsules produced with 5% FOEE at 11000 rpm with 10% SPI and 1% Span 80 (EG6) showed the largest amounts of encapsulated EPA + DHA, with values of 18.82 g EPA + DHA/ 100 g fatty matter, indicating that the use of a smaller concentration of surfactant influenced the quality of the fatty matter encapsulated using the enzymatic gelation process.

On the basis of the whole microcapsules produced with 5% FOEE at 11000 rpm with 10% SPI and 1% Span 80 (EG6), these also showed the highest values for EPA (1.62 g / 100 g microcapsules) and DHA (1.02 g / 100 g microcapsules), giving a total of 2.64 g omega-3 fatty acids / 100 g microcapsules. Thus, according to the Brazilian National Agency for Sanitary Vigilance (ANVISA, 2008), 3.79 g of the microcapsules would be required per portion or in 100 g or 100 mL of food, in order to warrant the appeal of being a functional food, since, according to the legislation, a food must contain at least 0.1 g EPA and/or DHA per portion or per 100 g or 100 mL, to permit this allegation (ANVISA, 2009).

According to Whelan & Rust (2006), there are a variety of recommended daily ingestions for omega-3 fatty acids published in the literature: In 1999, the British Nutrition Foundation (UK) recommended the daily consumption of 1.25 g of total omega-3 fatty acids; in 2000, Simopoulos, Leaf & Salem recommended 650 mg/day of EPA + DHA; in 2002, the Scientific Advisory Committee on Nutrition (UK) recommended > 0.2 g/day omega-3 fatty acids; in 2003, the World Health Organization (WHO) recommended that from 1 to 2% of the calories come from

the ingestion of omega-3 fatty acids; and in 2004, the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids recommended the ingestion of ≥ 500 mg/day of EPA + DHA. In 2004, the Food and Drug Administration (FDA) of the USA permitted the allegation of functional properties for foods enriched with omega-3 fatty acids, but suggested that the daily consumption of EPA + DHA not exceed 3 g, due to possible adverse effects on glycemic control, and increases in bleeding time and LDL-cholesterol content.

4 CONCLUSIONS

The tests for microcapsule wall degradation showed differences between the various methods, the highest values for extracted fatty matter being obtained by alkaline (TD1) and acid (TD3) degradation. Total wall degradation was visible for the acid degradation method (TD3), and partial degradation for alkaline enzymatic degradation (TD5) and acid degradation for the determination of the fatty acid composition (TD6).

The presence of triacylglycerols inside the microcapsules was proven indicating that corn oil from the second emulsion was encapsulated. For the microcapsules produced with 5% FOEE at 11,000 rpm with 10% SPI and 1% Span 80 (EG6), 3.79 g of microcapsules would be required per portion or in 100 g or 100 mL of food for the product to warrant the appeal of having a functional property, based on the regulation of the National Agency for Sanitary Vigilance (ANVISA, 2008), Brazil.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the financial support from the Brazilian Governmental Agency, CNPq, in the form of a doctorate scholarship for the first author, and to the following companies, who supplied the raw materials used in this research: Vital Atman, The Solae Company, Croda do Brasil LTDA and Ajinomoto.

6 REFERENCES

Alberici, R.M., Simas, R.C., Sanvido, G. B., Romão, W., Lalli, P. M., Benassi, M., Cunha, I. B. S., & Eberlin, M. N. (2010). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, 265-294.

Ackman, R. G. Marine lipids and omega-3 fatty acids. (2006) .In: Akoh, C. C. *Handbook of functional lipids*. Boca Raton: CRC.

ANVISA. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Alimentos Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Access in: 25/10/2009.

AOCS (2009). *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. 6th ed. AOCS, Champaign, IL.

Arshady, R. (1990). Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing techniques. Part II: Coacervation. *Polymer Engineering and Science*, 30, 905–914.

583

584 Babiker, E. E. (2000). Effect of transglutaminase treatment on the functional
585 properties of native and chymotrypsin-digested soy protein. *Food Chemistry*, 70,
586 139–145.

587

588 Badger, T. M., Ronis, M. J. J., Simmen, R. C. M., & Simmen, F. A. (2005). Soy
589 protein isolate and protection against cancer. *Journal of the American College of*
590 *Nutrition*, 24, 146S–149S.

591

592 Basman, A., Köksel, H., & Ng, P .K. W. (2002). Effects of transglutaminase on
593 SDS-PAGE patterns of wheat, soy and barley proteins and their blends. *Journal of*
594 *Food Science*, 67, 2654-2658.

595

596 Chambi, H. & Grosso, C. R. F. (2006). Edible films produced with gelatin and
597 casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*, 39, 458-
598 466.

599

600 Cho, Y. H., Shim, H. K., & Park, J. (2003). Encapsulation of fish oil by an
601 enzymatic gelation process using transglutaminase cross-linked protein. *Journal of*
602 *Food Science*, 68, 2717-2723.

603

604 Davidov-Pardo, G., Roccia, P., Salgado, D., León, A. E., & Pedroza-Islas, R.
605 (2008). Utilization of different wall materials to microencapsulate fish oil evaluation
606 of its behavior in bread products. *American Journal of Technology*, 3, 384-393.

607

608 Griffin, M., Casadio, R., & Bergamini, C. M. (2002). Transglutaminases: Nature's
609 biological glues. *Biochemical Journal*, 368, 377-396.

610

611 Hamilton-Reeves, J. M., Rebello, S. A., Thomas, W., Kurzer, M. S., & Slaton, J. W.
612 (2008). Effects of soy protein isolate consumption on prostate cancer biomarkers in
613 men with HGPIN, ASAP, and low-grade prostate cancer. *Nutrition and Cancer*, 60,
614 7–13.

615

616 Hartman, L., & Lago, R. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from
617 lipids. *Laboratory Practice*, 22, 475-476.

618

619 Ikura, K., Kometani, T., Sasaki, R., & Chiba, H. (1980). Crosslinking of soybean 7S
620 and 11S proteins by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44,
621 1979-1984.

622

623 Jaros, D., Partschfeld, C., Henle, T., & Rohm, H. (2006). Transglutaminase in
624 dairy products: chemistry, physics and applications. *Journal of Texture Studies*, 37,
625 113-155.

626

627 Jégat, C., & Taverdet, J. L. (2000). Stirring speed influence study on the
628 microencapsulation process and on the drug release from microcapsules. *Polymer*
629 *Bulletin*, 44, 345-351.

630

631 Joseph, D., Lanier, T. C., & Hamann, D. D. (1994). Temperature and pH affect
 632 transglutaminase-catalyzed setting. of crude fish actomyosin. *Journal of Food*
 633 *Science*, 59, 1018-1036.

634

635 Kahn, D. R., & Cohen, I. (1981). Factor XIIIa catalyzed coupling of structural
 636 proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 668, 490-494.

637

638 Kang, I. J., Matsumura, Y., Ikura, K., Motoki, M., Sakamoto, H., & Mori, T. (1994).
 639 Gelation and gel properties of soybean glycinin in a transglutaminase-catalysed
 640 system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 159-165.

641

642 Lamprecht, A., Schafer, U. F., & Lehr, C. M. (2001). Influences of process
 643 parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for O - 3
 644 unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. *Journal of*
 645 *Microencapsulation*, 18, 347-357.

646

647 Lee, S. J., & Rosenberg, M. (2000). Whey protein-based microcapsules prepared
 648 by double emulsification and heat gelation. *LWT- Food Science and Technology*,
 649 33, 80–88.

650

651 Lim, L. T., Mine, Y., & Tung, M. A. (1998). Transglutaminase cross-linked egg
 652 white protein films: tensile properties and oxygen permeability. *Journal of*
 653 *Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4022-4029.

654

655 Mascarenhas, M. C. C. N. (2010). *Production of omega 3 microencapsulated with*
 656 *surfactants and application in emulsion*. Campinas: Universidade Estadual de
 657 Campinas, Campinas.

658

659 Moura J. M. L. N., Gonçalves, L. A. G, Grimaldi, R., Soares, M. S., & Ribeiro, A. P.
 660 B. (2006). Otimização das condições de produção de ésteres etílicos a partir de
 661 óleo de peixe com elevado teor de ácidos graxos ω -3. *Química Nova*, 29, 956-959.

662

663 Nio, N., Motoki, M., & Takinami, K. (1985). Gelation of casein and soybean
 664 globulins by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 2283-
 665 2286.

666

667 Polovarapu, S., Oliver, C. M., Ajlouni, S., & Augustin, M. A. (2011).
 668 Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil and fish oil–extra
 669 virgin olive oil microencapsulated by sugar beet pectin. *Food Chemistry*, doi:
 670 10.1016/j.foodchem.2011.02.044.

671

672 Riccio, M. F., Saraiva, S. A., Marques, L. A. Alberici, R., Haddad, R., Moller, J. C.,
 673 Eberlin, M. N., & Catharino, R. R. (2010). *European Journal of Lipid Science and*
 674 *Technology*, 112, 434-438.

675

676 Riediger, N. D., Othman, R. A., Suh, M., & Moghadasian, M. H. (2009). A systemic
 677 review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *Journal of the American*
 678 *Dietetics Association*, 109, 668–679.

679

680 Roesch, R. R., & Corredig M. (2002). Characterization of oil-in-water emulsions
681 prepared with commercial soy protein concentrate. *Journal of Food Science*, 67,
682 2837–2842.

683

684 Ruben, A., & Barclay, B. (1999). Fatty acid analysis of egg yolk as methyl esters.
685 *Omega Tech*, Inc.

686 Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., Diego, S. M., Sanz, M. T., & Carballido,
687 J. R. (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A
688 review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 1–12.

689

690 Sakamoto, H., Kumazawa, Y., & Motoki, M. (1994) Strength of protein gels
691 prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. *Journal*
692 *of Food Science*, 59, 866-871.

693

694 Serna-Saldivar, S. O., Zorrilla, R., La Parra, C., Stagnitti, G., & Abril, R. (2006).
695 Effect of DHA containing oils and powders on baking performance and quality of
696 white pan bread. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61, 121–129.

697

698 Simas, R. C., Catharino, R. R., Cunha, I. B. S., Cabral, E. C., Barrera-Arellano, D.,
699 Eberlin, M. N., & Alberici, R. M. (2010). Instantaneous characterization of
700 vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization
701 mass spectrometry. *Analyst*, 135, 738–744.

702

Sootitawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., & Linko, P. (2003). Microencapsulation by spray drying: Influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. *Journal of Food Science*, 68, 2256-2262.

Tirkkonen, S., Turakka, L., & Paronen, P. (1994). Microencapsulation of indomethacin by gelatin-acacia complex coacervation in the presence of surfactants. *Journal of Microencapsulation*, 11, 615-626.

Velasco, J., Dobarganes, M. C., & Márquez-Ruiz, G. (2000). Oxidation of free and encapsulated oil fractions in dried microencapsulated fish oil. *Grasas y Aceites*, 51, 439-446.

Whelan, J., & Rust, C. (2006). Innovative dietary sources of n-3 fatty acids. *Annual Review of Nutrition*, 26, 75–103.

Yeo. Y., Bellas, E., Firestone, W., Langer, R., & Kohane, D. S. (2005). Complex coacervates for thermally sensitive controlled release of flavour compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7518-7525.

Figure Captions

Fig. 1. Scanning electronic microscopy of the FOEE microcapsules produced by enzymatic gelation

Where: EG1 = 0% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG2 = 2.5% of FOEE, 11000 RPM, 5% of SPI, 3% of Span 80; EG3 = 5% of FOEE, 11000

727 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG4 = 5% of FOEE, 24000 RPM, 10% of SPI,
728 3% of Span 80; EG5 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 5% of Span 80;
729 EG6 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 1% of Span 80.

730

731 **Fig. 2.** Size distribution of the particles obtained by enzymatic gelation and freeze-
732 dried

733 Where: EG1 = 0% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG2 = 2.5%
734 of FOEE, 11000 RPM, 5% of SPI, 3% of Span 80; EG3 = 5% of FOEE, 11000
735 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG4 = 5% of FOEE, 24000 RPM, 10% of SPI,
736 3% of Span 80; EG5 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 5% of Span 80;
737 EG6 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 1% of Span 80.

738

739 **Fig. 3.** Micrographs of the fish oil ethyl ester microcapsules after the wall
740 degradation tests and the respective results for the fatty matter extracted

741 Where: TD1 = alkaline degradation; TD2 = enzymatic degradation; TD3 = acid
742 degradation; TD4 = alkaline enzymatic degradation; TD5 = mechanical
743 degradation; and TD6 = acid degradation with direct determination of the fatty acid
744 composition.

745

746 **Fig. 4.** EASI(+)-MS from the samples of the original raw material (ethyl ester – A),
747 E1 (B) and E4 (C) showing the the Triacylglycerols (TG), diacylglycerols (DG), EPA
748 ethyl esters (EE EPA), DHA ethyl esters (EE DHA), and dimmers.

749 Where: EG1 = 0% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; and EG4 =
750 5% of FOEE, 24000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80.

751

752 **Fig. 5.** EPA (C20:5) and DHA (C22:6) ethyl ester contents in the encapsulated fatty
753 material extracted from the microcapsules (A) and in the total weight of
754 microcapsules (B)

755 Where: EG1 = 0% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG2 = 2.5%
756 of FOEE, 11000 RPM, 5% of SPI, 3% of Span 80; EG3 = 5% of FOEE, 11000
757 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG4 = 5% of FOEE, 24000 RPM, 10% of SPI,
758 3% of Span 80; EG5 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 5% of Span 80;
759 EG6 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 1% of Span 80.

ARTIGO III

CHEMOMETRY AS APPLIED TO THE PRODUCTION OF OMEGA-3 MICROCAPSULES BY COMPLEX COACERVATION WITH SOY PROTEIN ISOLATE AND GUM ARABIC

Artigo submetido à revista

LWT – Food Science and Technology

ISSN: 0023-6438

Leilane Costa de Conto^{a1}; Carlos Raimundo Ferreira Grosso^a; Lireny Aparecida
Guaraldo Gonçalves^a.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the influence of varying the concentrations of the wall materials (soy protein isolate/ gum Arabic, SPI:GA), the ratio of the wall material to the core material and the concentration of the reticulating agent (TG) in the production of omega-3 ethyl ester microcapsules by complex coacervation, using a central compound rotational design (CCRD) and analyzing the results by response surface methodology (RSM). The only dependent variable capable of obtaining a mathematical model was process yield, which was inversely proportional to the core material concentration and directly proportional to the SPI/GA ratio. The trials C12 (1.5:1.0 SPI:GA; 1.0:1.0 polymer:core; 6.0 UA of TG/g) and C14 (1.5:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 polymer:core; 10.0 UA of TG/g) would have to add 0.40 g or 0.45 g of microcapsules to 100 g or

133

22 100 mL portions of foods for them to be considered as having functional properties,
23 respectively.

24

25 **KEYWORDS:** Fish oil ethyl esters; microencapsulation; complex coacervation;
26 transglutaminase; EPA; DHA.

1 INTRODUCTION

There is an increasing demand for natural bioactive compounds that preserve the health and reduce the risk of disease (Augustin, Abeywardena, Patten, Head, Lockett, De Luca & Sanguansri, 2011). The beneficial effects of the long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (LCPUFA n-3), eicosapentanoic acid (EPA; C20:5; n-3) and docosahexanoic acid (DHA;C22:6; n-3) are well documented, showing various benefits to human health, including a reduction in the risks of cardiovascular diseases, anti-cancerigenous activity, anti-inflammation effects, prevention of osteoporosis and neurological disturbances (Alzheimer's disease, Crohn's disease, etc.), also helping to reduce the incidence of depression (Abeywardena & Head, 2001; McLennan & Abeywardena, 2005; Weitz, Weintraub, Fisher & Schwartzbard, 2010; Riediger, Othman, Suh & Moghadasian, 2009; Wendel & Heller, 2009).

Omega-3 polyunsaturated fatty acids are highly susceptible to oxidation. This factor, associated with the resistance of various consumer groups to eat foods that are sources of omega-3, mainly cold water fish, has led to the development of techniques such as microencapsulation that facilitate incorporation of these ingredients in food formulations (Ackman, 2006).

The coacervation process is an alternative to microencapsulation for compounds sensitive to high temperatures and to certain organic solvents, being a physicochemical process that does not use organic solvents nor require drastic temperatures. It is normally used to encapsulate solid or liquid ingredients that are insoluble in water, and is therefore indicated to encapsulate omega-3 rich oils

(Goiun, 2004). According to Ma, Yu, Branford-White, Nie, Fan & Zhu (2009), complex coacervation is a phase separation process for the production of insoluble complexes, based on the simultaneous dissolution of polyelectrolytes with opposite charges, induced by changes in the medium. Normally the two biopolymers used include a protein molecule and a polysaccharide molecule (Jun-Xia, Hai-Yan & Jian, 2011).

Soy protein isolate (SPI) has been used with success in the microencapsulation of hydrolyzed casein by spray drying (Molina-Ortiz, Mauri, Monterrey-Quintero, Trindade, Santana & Favaro-Trindade, 2009), of essential orange oil by complex coacervation (Jun-Xia, Hai-Yan & Jian, 2011) and of fish oil by an enzymatic gelation process (Cho, Shim & Park, 2003; Serna-Saldivar, Zorrilla, La Parra, Stagnitti & Abril, 2006). Studies carried out by Kim & Morr (1996) indicated that SPI showed greater compatibility with gum Arabic than with other polymers.

The microparticles produced by complex coacervation, despite the advantage of encapsulating large amounts of core material (85-90%), present low mechanical and heat resistance due to the ionic nature of the interactions between the wall forming polymers, and thus it is necessary to strengthen the wall by reticulation, generally involving the protein, which can be done using chemical or enzymatic reticulating agents (Burgess & Ponsart, 1998). The enzyme transglutaminase (TG) is a protein reticulating agent permitted for use in foods. TG (E.C. 2.3.2.13) catalyzes acyl transfer reactions, forming intra and intermolecular cross links in proteins, peptides and primary amines mainly by covalent bonds

between glutamine and lysine residues, and its efficiency in forming cross links depends on the molecular structure of the protein (Griffin, Casadio & Bergamini, 2002; Chambi & Grosso, 2006).

The objective of the present work was to evaluate the influence of varying the concentrations of the wall materials (soy protein isolate and gum Arabic, SPI:GA), the ratio of the wall material to the core material and the concentration of the reticulating agent (TG) in the microencapsulation of omega-3 polyunsaturated fatty acid ethyl esters by complex coacervation using a central compound rotational design (CCRD), analyzing the results by response surface methodology (RSM).

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials

Fish oil ethyl ester – FOEE – (62% EPA + DHA, Vital Atman, Uchoa, SP), soy protein isolate – SPI - (The Solae Company, Esteio, RS, Brazil, 88% protein w.w.), Instatgum gum Arabic AA – GA - (Acácia Senegal – CNI Colloides Naturais Brasil Comercial Ltda, São Paulo, SP, Brazil), Transglutaminase Activa TG-S® - TG - (Ajinomoto, Limeira, SP, Brazil).

2.2 Methods

2.2.1 Microcapsule production

In order to produce the multinucleated microcapsules by complex coacervation, the conditions were pre-determined in relation to the raw materials and process according to Table 1. The processing steps are described below, the processing parameters being adapted from those of Jun-Xia, Hai-Yan & Jian (2011).

1 – The soy protein isolate was added to 70 mL deionized water to give the concentration determined by the experimental design (Table 1) and stirred in an ultrasound bath for 10 minutes for dissolution.

2 – The first emulsion was made with the core material (FOEE) and dissolved soy protein isolate in an Ultra-turrax homogenizer (IKA-Werke Ultra-turrax model T18 basic, Germany), with agitation at 20,000 rpm for 1 minute.

3 – 50 mL of a 7% solution of gum Arabic was then added to the emulsion, the volume completed to 150 mL with deionized water, and the mixture heated at 45°C with magnetic stirring.

4 – As indicated by Jun-Xia, Hai-Yan & Jian (2011), the pH was adjusted to the coacervation pH (4.0) by adding 0.5M and 0.1M HCl solutions with magnetic stirring.

5 – The coacervation system was cooled in an ice bath to 10°C with magnetic stirring, in approximately 3 hours.

6 – The reticulation process was carried out by adding the enzyme TG to the system, dissolved in 100 mL deionized water at the concentration described in the experimental design (Table 1), maintaining the system at 10°C for 20 h in a BOD chamber (Eletrolab, Brazil).

7 – The microcapsules were washed three times with deionized water and once with ethanol, filtering through Whatman qualitative filter paper nº4 (porosity 20 µm).

8 – The microcapsules were dried in a Pirani 50 freeze dryer (Edwards, USA), where the temperature was lowered to -40°C under a pressure of 0.1 mmHg for 24 h.

2.2.2 Process yield and encapsulation efficiency

The process yield was determined using equation 1:

$$\% \text{ Yield} = \frac{\text{Mass of the freeze dried microcapsules (dwb)} \times 100}{\text{Initial mass of the polymers and core material (dwb)}} \quad (1)$$

The encapsulation efficiency was obtained after acid degradation of the capsules by adding 0.2 g of sample to 4.5 mL boiling deionized water plus 5.5 mL 8 M HCl, and leaving in a boiling water bath for 30 minutes (until complete degradation of the wall material). The mixture was then filtered and washed with 10 mL boiling deionized water. The filter paper with the hydrolyzed sample was dried

in an oven and then extracted using the methodology for the determination of oil content for protein rich foods (AOCS Ac 3-44 (2009)). The encapsulation efficiency was determined according to equation (2) as described by Davidov-Pardo, Roccia, Salgado, León & Pedroza-Islas (2008).

$$\% \text{ Encap. efficiency} = \frac{(\text{Total lipid content} - \text{free EE content}) \times 100}{\text{Total lipid content}} \quad (2)$$

2.2.3 Morphology of the microcapsules

The morphology of the microcapsules was determined using a model TM 3000 high vacuum scanning electronic microscope (SEM) (Hitachi, Japan), with a magnitude of x15 to x3000 (digital zoom 2, x4) and accelerating voltage of 15 kV (Analy mode). A high sensitivity BSE detector of the semi-conductor was used with a turbomolecular pump: 30L/sx1 units, diaphragm pump. The samples were arranged on aluminum stubs containing a double-faced copper tape to secure the material. The best fields were selected, where the microcapsules were isolated.

2.2.4 Extraction of free FOEE

The methodology of Velasco, Dobarganes & Márquez-Ruiz (2000), with some adaptations to the scale, was used to extract the free material.

To determine the free oil, 0.8 g of microcapsules were added to 20 mL of petroleum ether and shaken for 15 minutes at 25°C. The microcapsules were then

152 filtered through anhydrous Na₂SO₄, the solvent evaporated off and the samples
153 dried in nitrogen.

155 **2.2.5 Microcapsule size distribution and mean size**

156 The mean size and size distribution of the microparticles were obtained
157 using the Mastersizer 2000 (Malvern Instrument LTDA, Worcestershire, UK). Three
158 readings were taken, with three repetitions, giving a total of nine evaluations,
159 shaking at 3500 rpm with 25% of ultrasound to disperse the microcapsules.

161 **2.2.6 Constitution of the FOEE**

162 The lipid material was extracted from microcapsules that had not passed
163 through the process to remove free ethyl esters, aiming to analyze the composition
164 of the fatty acids in this fraction. The wall material was destroyed as described by
165 Velasco, Dobarganes & Márquez-Ruiz (2000), and the samples used to obtain the
166 methyl esters of the fatty acids using the method described by Hartman & Lago
167 (1973), adapted for use with microcapsules.

168 The fatty acid composition was determined by the AOCS Ce 1-62 (2009)
169 method, using a CGC Agilent 6850 Series GC capillary gas chromatograph system
170 equipped with the following capillary column: DB-23 Agilent (50% cyanopropyl) –
171 methylpolysiloxane, dimensions 60 m, internal diameter 0.25 mm, film 0.25 mm.
172 The operating conditions were as follows: flow rate = 1.0 ml/min; linear velocity of

24 cm/sec; detector temperature of 280°C; injector temperature of 250°C; oven temperature of 110°C-5min / 110-215°C – 5°C/min / 215°C = 34 min; stripping gas: helium; volume injected 1.0 µL; split 1:50.

2.2.7 Amount of n-3 encapsulated

In order to have a graphical and numerical view of the amount of n-3 encapsulated, the results for mean lipid content obtained in the determination of encapsulation efficiency (2.2.2) were multiplied by the EPA + DHA concentration found in the fatty acid composition (2.2.6).

2.2.8 Statistical analysis

The evaluation of the effects of different concentrations of wall material (SPI:GA – x_2), core material (wall:core – x_2) and reticulating agent (TG – x_3) on the characteristics of the FOEE microcapsules, was carried out using the STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) software, verifying the possibility of analyzing the results by response surface methodology. The same program was used for the means comparison test (verifying differences between trials 19 and 20) by the analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test, at a significance level of 95% ($p \leq 0.05$).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Process yield and encapsulation efficiency

Table 1 shows the values obtained for process yield and encapsulation efficiency, and Table 2 shows the analysis of variance of the mathematical models obtained for process yield.

Equation 3 shows the complete regression model ($R^2 = 0.92$; $F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}} = 2.98$) obtained for the process yield. Based on the coefficient of determination (R^2), the regression model explained 92% of the responses.

$$EY = y_i = 47.56 - 3.91 x_1 - 1.72 x_1^2 - 2.91 x_2 - 1.22 x_2^2 + 0.11 x_3 - 0.43 x_3^2 + 1.21 x_1 x_2 - 0.48 x_1 x_3 - 0.68 x_2 x_3 \quad (3)$$

Figure 1 shows the response surfaces and contour curves obtained for process yield, which showed that the effects of the wall material (SPI-GA) concentration and the wall material to core material ratio (wall:core). This Figure 1 shows that the smaller the core material concentration and the higher the SPI:GA ratio, the higher the yield, the maximum value being obtained for C5 (1.8:1.0 SPI:GA; 2.6:1.0 wall:core; 8.38 UA de TG/g) approximately 54%. These results corroborate those cited in the literature. Jun-Xia, Hai-Yan & Jian (2011) found the maximum values for process yield when they used only 10% core material (orange essential oil) in relation to the wall material (SPI:GA), the values falling with increases in core concentration. Lamprecht, Schäfer & Lehr (2001) obtained close to 90% yield for capsules of fish oil ethyl esters encapsulated in a matrix of gelatin and GA by complex coacervation. These results, which were the best ones, were

obtained at concentrations of 1.0:1.0 of wall material:core material, and when they increased the concentration of core material, the yield declined.

The low values obtained for process yield and efficiency in the present study can be explained by the fact that the SPI showed low solubility, limiting its application in food systems, even after using ultrasound to improve the solubility of the protein (Mendanha, Molina-Ortiz, Favaro-Trindade, Mauri, Monterrey- Quintero & Thomazini, 2009; Molina Ortiz et al., 2009). Another possible explanation is the fact that the pH was not altered in each trial to obtain stoichiometric equilibrium between the charges, and was hence distant from the ideal zeta potential. According to Jun-Xia, Hai-Yan & Jian (2011), a pH of 4.0 was the ideal value for systems formed from the biopolymers SPI:GA with a core material of orange essential oil, based on the yield and absorbance of the supernatant observed in the pH range between 2.5 and 4.5.

The analyses of the effects of the concentration of the wall materials (SPI:GA), the wall material to core material ratio (wall:core) and the TG concentration on the encapsulation efficiency, failed to present acceptable regression coefficients ($R^2 < 55\%$) for obtaining mathematical models considering the independent variables under study, even though the repeatability of the results was proven by the central point trials (C15, C16, C17 and C18 – 1.5:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g), which did not present statistical differences between them ($p > 0.05$).

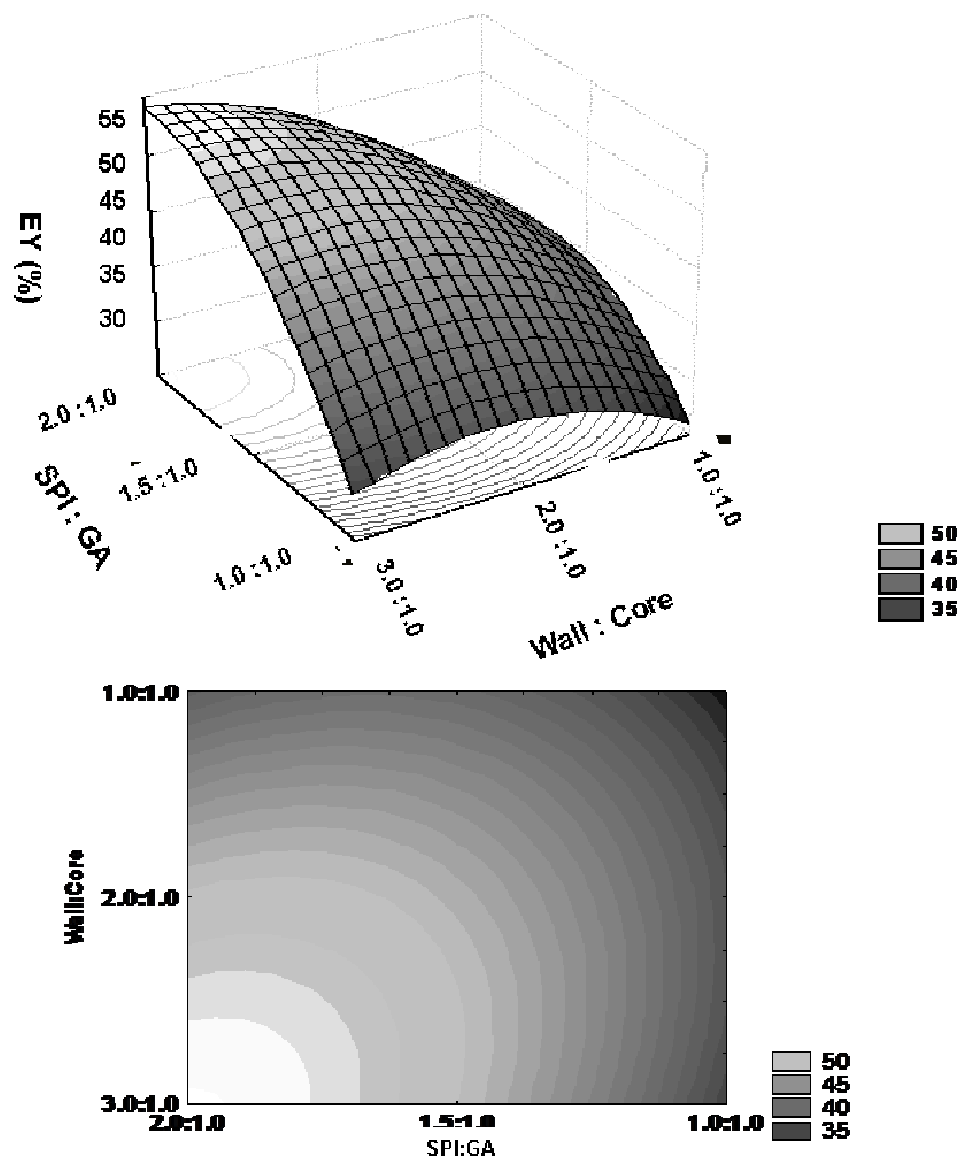


Figure 1. Response surface and contour curve obtained for the dependent variable of process yield (6.0 UA of TG/g)

Table 1. Matrix of the experimental design for the variables of SPI:GA, core material and TG concentration in the production of omega-3 fatty acid ethyl ester microcapsules by complex coacervation, with the respective results for process yield and encapsulation efficiency, free oil content, mean particle size and total EPA + DHA content.

Trial	x1	x2	x3	SPI:GA ^a	Wall:Core ^a	TG ^a (UA/g)	Process yield (%)	Encapsulation efficiency (%) ^c	Free lipid material (%) ^b	Mean particle size (µm) ^b	Total EPA+DHA (g/100g)
C1	-1	-1	-1	1.8:1.0	2.6:1.0	3.62	51.18	53.27 ^b ± 7.08	3.02 ^j ± 0.28	51.93 ^{bcde} ± 2.74	8.26
C2	1	-1	-1	1.2:1.0	2.6:1.0	3.62	43.97	33.82 ^{def} ± 6.94	4.08 ^{ij} ± 0.14	48.12 ^{fgh} ± 2.44	5.75
C3	-1	1	-1	1.8:1.0	1.4:1.0	3.62	43.17	50.37 ^{bcd} ± 4.35	5.07 ^{hi} ± 0.53	50.91 ^{cdef} ± 3.38	13.32
C4	1	1	-1	1.2:1.0	1.4:1.0	3.62	38.83	40.13 ^{bcde} ± 6.55	10.08 ^e ± 1.30	45.85 ^{hi} ± 2.52	14.37
C5	-1	-1	1	1.8:1.0	2.6:1.0	8.38	53.79	62.60 ^{bc} ± 0.87	2.46 ^j ± 0.89	56.48 ^a ± 2.08	7.34
C6	1	-1	1	1.2:1.0	2.6:1.0	8.38	42.71	24.96 ^{ef} ± 3.81	3.14 ^{ij} ± 0.40	48.32 ^{fgh} ± 1.73	4.23
C7	-1	1	1	1.8:1.0	1.4:1.0	8.38	41.13	34.88 ^{bcdef} ± 8.57	7.78 ^g ± 1.07	50.34 ^{cdefg} ± 1.81	12.42
C8	1	1	1	1.2:1.0	1.4:1.0	8.38	36.82	24.25 ^{ef} ± 0.62	6.77 ^{gh} ± 0.16	49.68 ^{defg} ± 3.00	9.52
C9	-α	0	0	2.0:1.0	2.0:1.0	6.00	50.92	25.20 ^{cdef} ± 5.64	10.86 ^e ± 0.53	52.30 ^{bcde} ± 2.38	12.15
C10	+α	0	0	1.0:1.0	2.0:1.0	6.00	35.21	19.81 ^f ± 2.03	8.01 ^{fg} ± 0.18	49.18 ^{efgh} ± 2.54	7.22
C11	0	-α	0	1.5:1.0	3.0:1.0	6.00	46.89	41.53 ^b ± 8.56	3.27 ^{ij} ± 0.79	44.27 ⁱ ± 2.59	6.71
C12	0	+α	0	1.5:1.0	1.0:1.0	6.00	42.07	45.98 ^{bcd} ± 7.94	21.89 ^a ± 0.61	50.23 ^{cdefg} ± 3.50	25.64
C13	0	0	-α	1.5:1.0	2.0:1.0	2.00	45.44	22.23 ^f ± 2.88	9.88 ^{ef} ± 0.08	46.81 ^{ghi} ± 1.78	10.19
C14	0	0	+α	1.5:1.0	2.0:1.0	10.00	47.97	70.77^a ± 4.90	15.31 ^{cd} ± 0.09	54.85 ^{ab} ± 0.29	22.27
C15	0	0	0	1.5:1.0	2.0:1.0	6.00	47.38	26.52 ^{bcdef} ± 6.80	17.73 ^b ± 0.62	53.79 ^{abc} ± 2.20	16.62
C16	0	0	0	1.5:1.0	2.0:1.0	6.00	48.01	26.73 ^{bcdef} ± 7.80	16.11 ^{bc} ± 0.86	53.75 ^{abc} ± 2.29	13.18
C17	0	0	0	1.5:1.0	2.0:1.0	6.00	47.48	27.13 ^{bcdef} ± 2.79	13.54 ^d ± 1.10	53.42 ^{abc} ± 1.38	15.86
C18	0	0	0	1.5:1.0	2.0:1.0	6.00	47.26	27.57 ^{bcdef} ± 4.52	13.90 ^d ± 0.48	53.07 ^{abcd} ± 2.27	14.62
C19	+α	-	+α	1.0:1.0	-	10.00	50.09			51.13 ^{bcdef} ± 2.92	
C20	+α	0	-	1.0:1.0	2.0:1.0	-	44.53	30.35 ^{cdef} ± 0.58	16.31 ^{bc} ± 0.77	50.98 ^{bcdef} ± 3.29	15.50

^a SPI = Soy protein isolate; GA = gum Arabic; Core material = Fatty acid ethyl ester; TG = transglutaminase.

^b The results represent the means of three determinations. Samples followed by the same letters in the same column do not differ ($p \leq 0.05$) by Tukey's test.

^c The results represent the means of five determinations. Samples followed by the same letters in the same column do not differ ($p \leq 0.05$) by Tukey's test.

253 **Table 2.** Analysis of variance (ANOVA) of the mathematical model for process
 254 yield of microcapsules produced with SPI and GA by complex coacervation.

Source of variation	Sum of squares	Degrees of liberty	Mean square	F calculated ^A	F calc / F tab
Regression	388.85	9	43.21	10.09	2.98
Residue	34.26	8	4.28		
Lack of fit	33.9366	5	9.0628	83.854	
Pure error	0.3283	3	0.1081		
Total SS	423.1102	17			

255

256 ^A Level of significance of 95% ($p \leq 0.05$)

In the comparison of the experimental trials with the control trials (C19 – without core material; C20 – without TG), the trial C14 (1.5:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 10 UA/g TG) showed the highest encapsulation efficiency of approximately 70%, differing statistically from the others ($p < 0.05$). Lamprecht, Schäfer & Lehr (2001) obtained lower results of 60% encapsulation efficiency for capsules of fish oil ethyl ester encapsulated in a matrix of gelatin:GA by complex coacervation, although they managed to get elevated results for encapsulation efficiency.

3.2 Microcapsule morphology

The formation of microcapsules of fish oil ethyl esters was confirmed by SEM. All the trials presented the same topographical conformation, with accentuated wrinkling and the presence of smaller microcapsules adhering to the surfaces, a characteristic better observed in Figure 2.

However, the presence of microcapsules with incomplete parts can be observed (C9), a fact also observed by Jun-Xia, Hai-Yan & Jian (2011), who indicated the need for more extensive studies in relation to the interaction of the two biopolymers used, since the presence of cracks could represent the non-sealing and incomplete formation of the microcapsules.

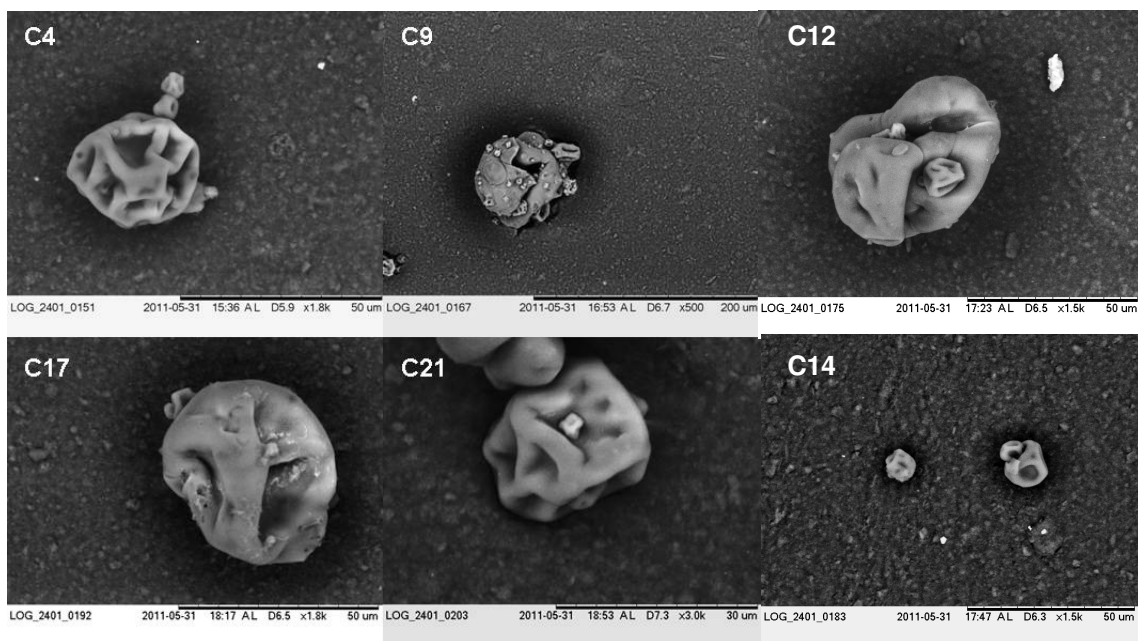


Figure 2. Scanning electronic microscopy of the FOEE microcapsules produced with SPI and GA by complex coacervation.

Where: C4 = 1.2:1.0 SPI:GA; 1.4:1.0 wall:core; 3.62 UA of TG/g; C9 = 2.0:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g; C12 = 1.5:1.0 SPI:GA; 1.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g; C14 = 1.5:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 10.0 UA of TG/g; C17= 1.5:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g; C20 = 1.0:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 0 UA of TG/g.

3.3 Free FOEE content

The analyses of the effects of the concentration of the wall materials (SPI:GA), the wall material to core material ratio (wall:core) and the TG concentration on the free FOEE content failed to present acceptable regression coefficients ($R^2 < 70\%$) for obtaining mathematical models considering the independent variables under study.

Table 1 shows that C12 presented the highest free FOEE content, statistically differing from the other trials ($p < 0.05$), possibly because this trial had the highest concentration of core material tested. Trials C1, C2, C5, C6 and C11 presented the lowest values for free FOEE content, and the highest values for the ratio of wall material to core material.

Lamprecht, Schäfer & Lehr (2001) obtained different results for free FOEE after reticulation with different chemical agents and by spray drying, varying from 4.3 to 28.2%. Davidov-Pardo et al. (2008), working with soy protein isolate by the enzyme jellification process obtained values above 5% for free fish oil.

3.4 Microcapsule size distribution and mean size

The analyses of the effects of the concentration of the wall materials (SPI:GA), the wall material to core material ratio (wall:core) and the TG concentration on the mean particle size, failed to present acceptable regression coefficients ($R^2 < 75\%$) for obtaining mathematical models considering the independent variables under study, even though the repeatability of the results was

proven by the central point trials (C15, C16, C17 and C18 – 1.5:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g), which did not present statistical differences between them ($p > 0.05$). The values obtained for the mean particle size can be seen in Table 1.

In the present study, particle sizes between 12.2 μm (minimum diameter) and 235.9 μm (maximum diameter) were found, and mean values varying between 44 and 56 μm , the control trials (C19 and C20) being situated within this range.

The size of microparticles produced by complex coacervation using the polymer pair of gelatin and gum Arabic is affected by many parameters, such as the stirring rate, solution viscosity, core/polymer ratio, amount of water, etc. (Inoue, Kawai, Kanbe, Saeki & Shimoda, 2002). According to Mascarenhas (2010), a reduced relative dispersion of the particle size can be noted when the microcapsules are produced under controlled conditions, when compared to those produced in the ice bath, that is, controlling the cooling rate resulted in particles with greater uniformity of size amongst them. However, according to Mukai-Correa (2003), the particles produced by complex coacervation can vary from 1 to 500 μm . The variation in mean particle size obtained in this study could possibly be explained by small differences in the cooling temperature during the production process, and by variations in the concentrations of the polymers and core material used, altering the viscosity of the dispersions.

Lamprecht, Schäfer & Lehr (2001) obtained results of about 40 μm for microcapsules of fish oil encapsulated in a matrix of gelatin:GA by complex coacervation. On the other hand, Jun-Xia, Hai-Yan & Jian (2011) obtained a mean

result of 7.57 μm for microcapsules produced with SPI:GA by coacervation. These differences could be justified by the different process conditions used by each author, principally the stirring velocities used (6000 rpm / 5 minutes). Many studies have shown that the greater the stirring velocity the smaller the particle size, with greater encapsulation efficiency (Tirkkonen, Turakka & Paronen, 1994; Jégat & Taverdet, 2000; Mascarenhas; 2010).

The particle size distribution followed a unimodal distribution, with a tendency to normality in all the trials. Figure 3 shows the histograms obtained for a trial at the center point (C18 -1.5:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g) and for the controls C19 and C20, these being representative of all the trials.

3.5 Constitution of the FOEE

Figure 4 shows a representative chromatographic profile of all the trials with the main fatty acids identified, with the exception of trial C19, which had no analyzable lipid material in its constitution. It can be seen that the main fatty acids present were EPA, DHA and oleic acid.

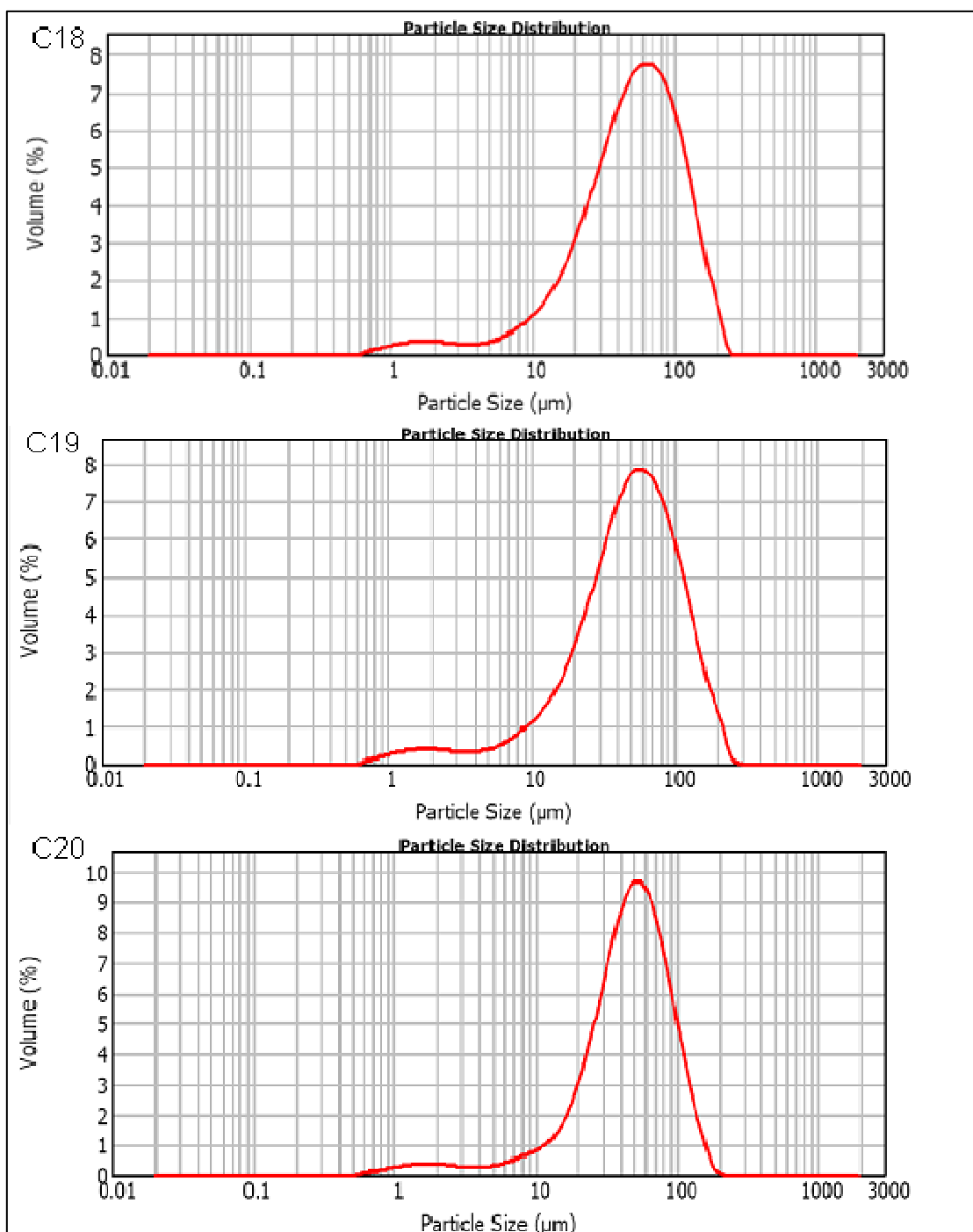


Figure 3. Particle size distribution of the freeze dried microcapsules obtained by complex coacervation.

Where: C18 = 1.5:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g; C19 = 1.0:1.0 SPI:GA; 0 wall:core; 10.0 UA of TG/g; C20 = 1.0:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 0 UA of TG/g.

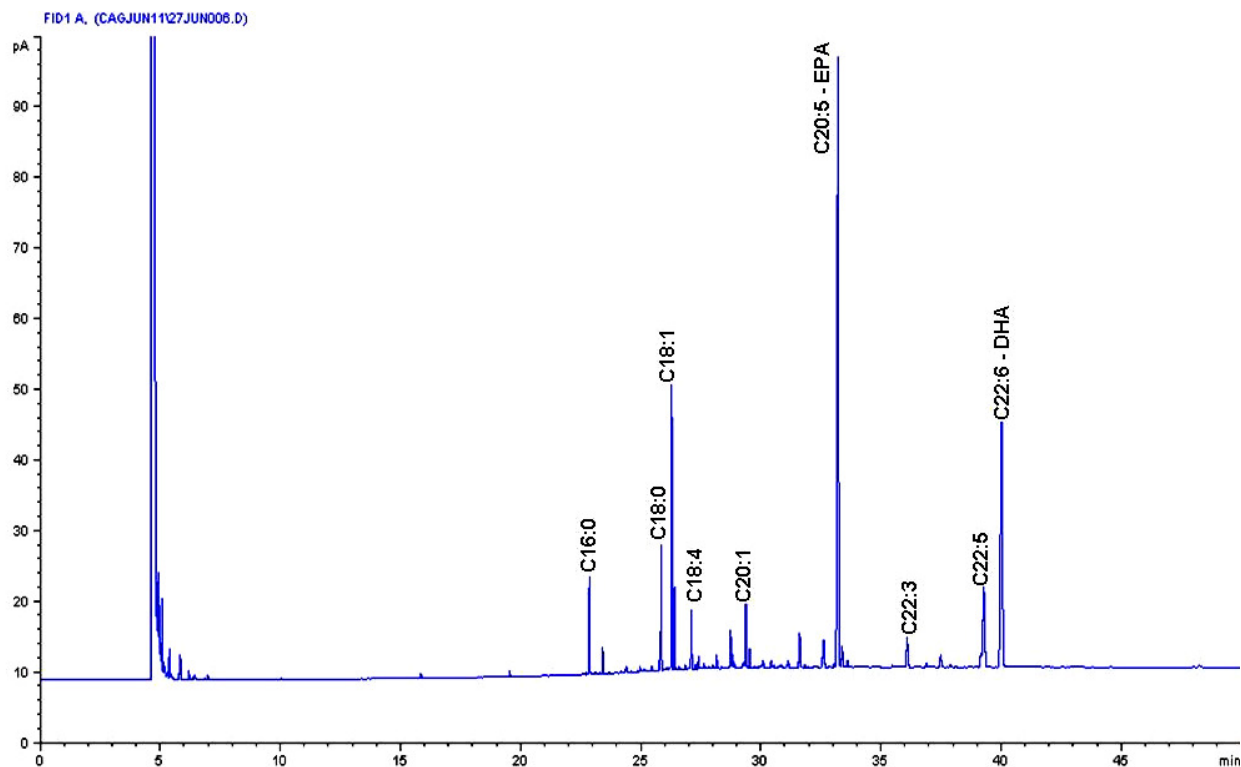


Figure 4. Chromatographic profile of the fatty acid composition of the fish oil ethyl esters in the microcapsules.

Where: C16:0 = palmitic acid; C18:0 = stearic acid; C18:1 = oleic acid; C18:4 = stearidonic acid; C20:1 = gadoleic acid; C20:5 = eicosapentanoic acid; C22:3 = docosatrienoic acid; C22:5 = docosapentanoic acid; C22:6 = docosahexanoic acid. The sample shown is that of trial C12 (1.5:1.0 SPI:GA; 1.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g).

3.6 Amount of n-3 in the microcapsules

The analyses of the effects of the concentration of the wall materials (SPI:GA), the wall material to core material ratio (wall:core) and the TG concentration on the amount of n-3 in the microcapsules, failed to present acceptable regression coefficients ($R^2 < 70\%$) for obtaining mathematical models considering the independent variables under study. Table 1 shows the final values obtained for omega-3 (EPA + DHA) in each trial, and it can be seen that trial C12 (1.5:1.0 SPI:GA; 1.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g) presented approximately 25 g of EPA + DHA in 100 g of microcapsules, followed by trial C14 (1.5:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 10.0 UA of TG/g), with 22.3 g of EPA + DHA in 100 g of microcapsules. Thus based on the National Agency for Sanitary Vigilance (ANVISA – BRASIL, 2009), one would need to add 0.40 g (C12) or 0.45 g (C 14) of microcapsules to 100 g or 100 mL portions of food in order to consider that it had the appeal of a functional property, since the regulation states that foods should present a minimum of 0.1 g EPA and/or DHA per 100 g or 100 mL portion to allow this allegation (ANVISA, 2009).

However, there are numerous recommendations for the daily ingestion of omega-3 fatty acids published by various authors and entities, some of which were listed by Whelan & Rust (2006). According to these authors, in 1999 the British Nutrition Foundation of the United Kingdom recommended the consumption of 1.25 g/day of total omega-3 fatty acids; in 2000, Simopoulos, Leaf & Salem, 650 mg/day of EPA + DHA; in 2002, the Scientific Advisory Committee on Nutrition, also of the United Kingdom, > 0.2 g/day of omega-3 fatty acids; in 2003, the World Health

Organization (WHO), 1 to 2% of the calories coming from omega-3 fatty acids; in 2004, the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, ≥ 500 mg/day of EPA + DHA. In 2004, the Food and Drug Administration (FDA) of the USA allowed the allegation of functional property for foods enriched with omega-3 fatty acids, although also suggesting that the consumption of EPA + DHA not exceed 3 g/day due to possible adverse effects in the control of glycemia, increase in bleeding time and of LDL-cholesterol.

4 CONCLUSIONS

The dependent variable of process yield allowed one to obtain a representative model, which was inversely proportional to the concentration of core material and directly proportional to the SPI:GA ratio. The trials carried out with 1.5:1.0 SPI:GA, 1.0:1.0 wall:core and 6.0 UA of TG/g and 1.5:1.0 SPI:GA, 2.0:1.0 wall:core and 10.0 UA of TG/g presented approximately 25 g and 22 g of EPA + DHA in 100 g of microcapsules, respectively. Thus it would be necessary to add 0.4 g or 0.45 g of microcapsules to 100 g or 100 mL portions of foods to consider the food as having the appeal of a functional property according to the determinations of the national Agency of Sanitary Vigilance (Brazil).

5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the financial support received from the Brazilian governmental organs (Capes and CNPq) in the form of doctoral scholarships

conceded to the first author. They are also grateful to the suppliers of the raw materials used in the study: Vital Atman, The Solae Company, CNI Colloides Naturais Brasil Comercial Ltda and Ajinomoto.

6 REFERENCES

Abeywardena, M. Y., & Head, R. J. (2001). Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. *Cardiovascular Research*, 52, 361–371.

Ackman, R.G. Marine lipids and omega-3 fatty acids. (2006) .In: Akoh, C. C. *Handbook of functional lipids*. Boca Raton: CRC.

ANVISA. *National Health Surveillance Agency*. Technoscientific Advisory Committee on Novel Foods and Functional Foods. Access in: www.anvisa.gov.br. Access: 25/10/2009.

AOCS (2009). *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. 6th ed. AOCS, Champaign, IL.

Augustin, M.A., Abeywardena, M.Y., Patten, G., Head, R., Lockett, T., De Luca, A., & Sanguansri, L. (2011). Effects of microencapsulation on the gastrointestinal transit and tissue distribution of a bioactive mixture of fish oil, tributyrin and resveratrol. *Journal of Functional Foods*, doi:10.1016/j.jff.2011.01.003.

430 Burgess, D.J., & Ponsart, S. (1998). b-glucoronidase activity following complex
431 coacervation and spray drying microencapsulation. *Journal of Microencapsulation*,
432 15, 569-579.

433

434 Chambi, H. & Grosso, C.R.F. (2006). Edible films produced with gelatin and casein
435 cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*, 39, 458-466.

436

437 Cho, Y. H., Shim, H. K., & Park, J. (2003). Encapsulation of fish oil by an
438 enzymatic gelation process using transglutaminase cross-linked protein. *Journal of*
439 *Food Science*, 68, 2717-2723.

440

441 Davidov-Pardo, G., Roccia, P., Salgado, D., León, A. E., & Pedroza-Islas, R.
442 (2008). Utilization of different wall materials to microencapsulate fish oil evaluation
443 of its behavior
444 in bread products. *American Journal of Technology*, 3, 384-393.

445

446 Griffin, M., Casadio, R., & Bergamini, C. M. (2002). Transglutaminases: Nature's
447 biological glues. *Biochemical Journal*, 368, 377-396.

448

449 Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies
450 and trends. *Food Science and Technology*, 15, 330-347.

451

452 Hartman, L., & Lago, R. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from
453 lipids. *Laboratory Practice*, 22, 475-476.

454

455 Inoue, S., Kawai, H., Kanbe, S., Saeki, T., & Shimoda, T. (2002). High-resolution
456 microencapsulated electrophoretic display (EPD) driven by poly-Si TFTs with four-
457 level grayscale. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 49, 1532–1539.

458

459 Jegat, C., & Taverdet, J. L. (2000). Stirring speed influence study on the
460 microencapsulation process and on the drug release from microcapsules. *Polymer*
461 *Bulletin*, 44, 345-351.

462

463 Jun-Xia, X., Hai-Yan, Y. & Jian, Y. (2011) Microencapsulation of sweet orange oil
464 by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food*
465 *Chemistry*, 125, 1267–1272.

466

467 Kim, Y. D., & Morr, C. V. (1996). Microencapsulation properties of gum Arabic and
468 several food proteins: Spray-dried orange oil emulsion particles. *Journal of*
469 *Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1314–1320.

470

471 Lamprecht, A., Schafer, U. F., & Lehr, C. M. (2001). Influences of process
472 parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for O - 3
473 unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. *Journal of*
474 *Microencapsulation*, 18, 347-357.

475

476 Ma, Z. H., Yu, D. G., Branford-White, C. J., Nie, H. L., Fan, Z. X., & Zhu, L. M.
 477 (2009). Microencapsulation of tamoxifen: Application to cotton fabric. *Colloids and*
 478 *Surfaces B Biointerfaces*, 69, 85 - 90.

479

480 Mascarenhas, M. C. C. N. (2010). *Production of omega 3 microencapsulated with*
 481 *surfactants and application in emulsion*. Campinas: UNICAMP, 167p.

482

483 McLennan, P. L., & Abeywardena, M. Y. (2005). Membrane basis for fish oil effects
 484 on the heart: Linking natural hibernators to prevention of human sudden cardiac
 485 death. *Journal of Membrane Biology*, 206, 85–102.

486

487 Mendanha, D. V., Molina-Ortiz, S. E., Favaro-Trindade, C. S., Mauri, A.,
 488 Monterrey- Quintero, E. S., & Thomazini, M. (2009). Microencapsulation of casein
 489 hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*,
 490 42, 1099–1104.

491

492 Molina-Ortiz, S. E., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A., Santana,
 493 A. S., & Favaro-Trindade, C. S. (2009). Production and properties of casein
 494 hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. *LWT*
 495 – *Food Science and Technology*, 42, 919–923.

496

497 Mukai-Corrêa. R., PRATA, A.S., GROSSO, C.R.F. Microcapsules obtained by ionic
 498 polymerization. 2. Release of casein encapsulated in alginate and pectin. *World*
 499 *Aquaculture*, 2003.

500

501 Riediger, N. D., Othman, R. A., Suh, M., & Moghadasian, M. H. (2009). A systemic
502 review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *Journal of the American*
503 *Dietetics Association*, 109, 668–679.

504

505 Serna-Saldivar, S. O., Zorrilla, R., La Parra, C., Stagnitti, G., & Abril, R. (2006).
506 Effect of DHA Containing Oils and Powders on Baking Performance and Quality of
507 White Pan Bread. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61, 121–129.

508

509 Tirkkonen, S., Turakka, L., & Paronen, P. (1994). Microencapsulation of
510 indomethacin by gelatin-acacia complex coacervation in the presence of
511 surfactants. *Journal of Microencapsulation*, 11, 615-626.

512

513 Velasco, J., Dobarganes, M. C., & Márquez-Ruiz, G. (2000). Oxidation o free and
514 encapsulated oil fractions in dried microencapsulated fish oil. *Grasas y Aceites*, 51,
515 439-446.

516

517 Wendel, M., & Heller, A. R. (2009). Anticancer actions of omega-3 fatty acids –
518 Current state and future perspectives. *Anticancer Agents and Medicinal Chemistry*,
519 9, 457–470.

520

521 Whelan, J., & Rust, C. (2006). Innovative dietary sources of n-3 fatty acids. *Annual*
522 *Review of Nutrition*, 26, 75–103.

523

524 Weitz, D., Weintraub, H., Fisher, E., & Schwartzbard, A. Z. (2010). Fish oil for the
525 treatment of cardiovascular disease. *Cardiological Reviews*, 18, 258–263.

Figure captions:

Fig. 1. Response surface and contour curve obtained for the dependent variable of process yield (6.0 UA of TG/g)

Fig. 2. Scanning electronic microscopy of the FOEE microcapsules produced with SPI and GA by complex coacervation

Where: C4 = 1.2:1.0 SPI:GA; 1.4:1.0 wall:core; 3.62 UA of TG/g; C9 = 2.0:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g; C12 = 1.5:1.0 SPI:GA; 1.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g; C14 = 1.5:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 10.0 UA of TG/g; C17= 1.5:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g; C20 = 1.0:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 0 UA of TG/g.

Fig. 3. Particle size distribution of the freeze dried microcapsules obtained by complex coacervation

Where: C18 = 1.5:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g; C19 = 1.0:1.0 SPI:GA; 0 wall:core; 10.0 UA of TG/g; C20 = 1.0:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 0 UA of TG/g.

Fig. 4. Chromatographic profile of the fatty acid composition of the fish oil ethyl esters in the microcapsules

Where: C16:0 = palmitic acid; C18:0 = stearic acid; C18:1 = oleic acid; C18:4 = stearidonic acid; C20:1 = gadoleic acid; C20:5 = eicosapentanoic acid; C22:3 = docosatrienoic acid; C22:5 = docosapentanoic acid; C22:6 = docosahehexanoic acid.

549 The sample shown is that of trial C12 (1.5:1.0 SPI:GA; 1.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of
550 TG/g).

ARTIGO IV

MONITORAMENTO DO POTENCIAL ZETA DAS MISTURAS DE IPS, GA E ÉSTER ETÍLICO DE ÓLEO DE PEIXE E PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA

Artigo formatado para a revista

Food Chemistry

ISSN: 0308-8146

zeta, em especial o IPS que causa variação, devido sua constituição como proteínas isoladas e agregados protéicos, com baixa solubilidade. Microcápsulas produzidas com 1,5:1,0 IPS:GA, 2,0:1,0 parede:recheio e pH 4,0 apresentaram em torno de 20 g de EPA + DHA/ 100 g de microcápsulas, sendo recomendada uma adição de 0,50 g em porções ou em 100 g ou 100 mL de alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Potencial eletrocinético; microcápsulas; coacervação complexa; ômega-3; isolado protéico de soja.

1 INTRODUÇÃO

Ácidos graxos polinsaturados ômega-3, como o ácido eicosapentaenóico (EPA; C20:5; n-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA; C22:6; n-3) encontrados principalmente em óleo de peixe, apresentam inúmeros benefícios à saúde, entretanto são altamente susceptíveis a oxidação. Este fato, associado à resistência dos diversos grupos de consumidores à ingestão de alimentos fontes em ômega-3 (peixes de águas frias), tem levado ao desenvolvimento de técnicas que facilitem a incorporação destes ingredientes em formulações alimentícias, como a microencapsulação (Ackman, 2006).

O processo de coacervação é uma alternativa para a microencapsulação de compostos sensíveis a temperaturas elevadas e a determinados solventes orgânicos, sendo assim indicado para encapsular óleos ricos em ômega-3 (Goiun,

2004). Segundo Ma, Yu, Branford-White, Nie, Fan e Zhu (2009), a coacervação complexa é um processo de separação de fases, produção de complexos insolúveis, baseado na dissolução simultânea de polieletrólitos de cargas opostas induzida por mudanças do meio, atingindo um equilíbrio estequiométrico. Normalmente os dois biopolímeros utilizados incluem uma molécula protéica e uma molécula de polissacarídeo (Jun-Xia, Hai-Yan & Jian, 2011).

A medida da estabilidade de uma dispersão é obtida através do potencial zeta, onde valores altos (negativo ou positivo) indicam dispersões mais estáveis e valores baixos indicam instabilidade coloidal que pode levar à agregação (Salopek, Krasic & Filipovic, 1992). Segundo Ducel, Richard, Saulnier, Popineau e Boury, (2004), o potencial zeta corresponde ao potencial eletrocinético da partícula medido na superfície desta, entre sua capa iônica e o meio que a envolve. A medida do potencial possibilita a determinação da faixa de pH apropriada para coacervação. Estes últimos autores citados também sugerem que o surgimento de turbidez é usualmente atribuído ao aparecimento de partículas coacervadas no meio.

O potencial zeta é medido de maneira indireta, baseado na técnica de mobilidade eletroforética. A suspensão coloidal diluída a ser analisada é introduzida em uma cuba com dois eletrodos e aplica-se um potencial elétrico à suspensão. As partículas com carga elétrica líquida se deslocam na direção do eletrodo de carga contrária, tão mais rapidamente quanto maior a sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado. O quociente da velocidade de deslocamento pelo campo elétrico chama-se mobilidade eletroforética, expressa

em m²/V.s. Através de equação matemática esse valor se transforma em potencial zeta. Aparelhos de concepção mais moderna usam um laser modulado e medem o deslocamento *doppler* na luz espalhada pelas partículas (Hobeco, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento dos biopolímeros (isolado protéico de soja e goma arábica), juntamente com o material de recheio (éster etílico de óleo de peixe) na formação de microcápsulas por coacervação complexa, através determinação do potencial zeta e das principais características das microcápsulas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Éster etílico de óleo de peixe – (EE) - (62% de EPA + DHA, Vital Atman, Uchoa, SP), isolado protéico de soja – (IPS) - (The Solae Company, Esteio, RS, 88% proteína b.u.), goma arábica Instatgum AA – (GA) - (Acácia Senegal – CNI Colloides Naturais Brasil Comercial Ltda, São Paulo, SP), Transglutaminase Activa TG-S® - (TG) - (Ajinomoto, Limeira, SP).

2.2 Métodos

2.2.1 Determinação do potencial zeta

Para a determinação do potencial zeta das suspensões de IPS, GA e EE separadamente e em conjunto formando dispersões, baseando-se em proporções sugeridas em estudos anteriores (P1 = 1,0:0,0 IPS:GA e 2,0:1,0 parede:recheio; P2 = 1,0:1,0 IPS:GA e 2,0:1,0 parede:recheio; P3 = 1,5:1,0 IPS:GA e 2,0:1,0 parede:recheio; P4 = 1,8:1,0 IPS:GA e 2,6:1,0 parede:recheio), foi utilizado Zeta Sizer Nano Series Nano ZS – Malvern Instruments (Inglaterra), com pH variando de 7,0 a 3,0. Estas relações foram utilizadas para a produção das dispersões e seguiram o processo de produção que foi realizado até a etapa 3 do item 2.2.3. Devido limitações operacionais do equipamento, fez-se necessária a diluição das misturas em água deionizada, a 45 °C, até a faixa de detecção do equipamento, sendo uma alíquota de 0,5 mL da dispersão e adição de água para se obter uma concentração de 0,05% da mistura.

2.2.2 Variáveis independentes testadas

As variáveis independentes testadas para a produção das microcápsulas estão expostas na Tabela 1, onde foram avaliados os efeitos da variação do pH, conforme resultados obtidos por cálculos matemáticos na determinação do potencial zeta (2.2.1) e diferentes concentrações dos materiais de parede (IPS:GA) e material de parede em relação ao material de recheio (P:R).

105

106 **2.2.3 Produção das microcápsulas**

107 Para a produção de microcápsulas multinucleadas por coacervação
108 complexa foram pré-determinadas as condições em relação às matérias primas e
109 ao processo conforme Tabela 1. Foram realizadas três repetições de cada ensaio.

110 As etapas de processo estão descritas a seguir, sendo os parâmetros de
111 processos adaptados de Jun-Xia, Hai-Yan e Jian (2011).

112

113 1 - O isolado protéico de soja foi adicionado de 70 mL de água deionizada,
114 em concentração determinada pelo planejamento experimental (Tabela 1) e
115 agitado em ultrasom por 10 minutos para a solubilização deste.

116 2 - A primeira emulsão foi feita com o material de recheio e o isolado protéico
117 de soja solubilizado, em Ultra-turrax (IKA-Werke Ultra-turrax modelo T18 basic,
118 Alemanha) sob agitação de 20000 RPM por 1 minuto;

119 3 - A emulsão formada foi adicionada em 50 mL de solução de goma arábica
120 (7%), completando o volume até 150 mL com água deionizada e aquecida a 45 °C,
121 sob agitação magnética;

122 4 – O acerto para o pH de coacervação foi feito com adição de soluções de
123 HCl 0,5M e 0,1M sob agitação magnética;

5 - O sistema coacervado foi resfriado em banho de gelo com agitação magnética até 10°C, em aproximadamente 3 horas;

6 - O processo de reticulação foi feito adicionando-se 10 UA/g da enzima TG, dissolvida em 100 mL de água deionizada ao sistema e mantido por 20h a temperatura de 10 °C em BOD (Eletrolab, Brasil);

7 - Três lavagens com água deionizada e uma lavagem com etanol 97% foram feitas e as microcápsulas foram filtradas em papel de filtro qualitativo Whatman nº4 (porosidade 20 µm);

8 - As microcápsulas foram secas em liofilizador Pirani 50 (Edwards, US), por 24h.

2.2.4 Rendimento do processo e eficiência de encapsulação

O rendimento do processo das microcápsulas produzidas nos diferentes pHs foi determinado segundo equação 1:

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{Massa de microcápsulas liofilizadas (b.s.)} \times 100}{\text{Massa inicial de polímeros e recheio (b.s.)}} \quad (1)$$

A eficiência de encapsulação foi obtida após a degradação ácida das cápsulas, onde 0,2 g de amostra foram adicionadas de 4,5 mL de água deionizada fervente e 5,5 mL de ácido clorídrico 8 M e deixadas em banho-maria fervente por 30 minutos (até a degradação completa do material de parede). Posteriormente a

mistura foi filtrada e lavada com 10 mL de água deionizada fervente. O papel de filtro com as amostras hidrolisadas foram secas em estufa e colocadas para extração segundo a metodologia de determinação de teor de óleo da AOCS Ac 3-44 (2009), para alimentos ricos em proteínas. A eficiência de encapsulação foi determinada segundo a equação (2), conforme descrito por Davidov-Pardo, Roccia, Salgado, León e Pedroza-Islas (2008).

$$\% \text{ Eficiência de Encapsulação} = \frac{(\text{Total de lipídios} - \text{EE superficial}) \times 100}{\text{Total de lipídios}} \quad (2)$$

2.2.4 Teor de EE superficial

Os procedimentos para extração do material superficial seguiram a metodologia descrita por Velasco, Dobarganes e Márquez-Ruiz (2000), com algumas adaptações na escala.

Para a determinação do óleo livre, 0,8 g de microcápsulas foram adicionadas de 20 mL de éter de petróleo e agitadas por 15 minutos a 25 °C. Posteriormente, as microcápsulas foram filtradas em Na₂SO₄ anidro, o solvente foi evaporado e as amostras secas com nitrogênio.

2.2.5 Morfologia das microcápsulas

As análises morfológicas foram feitas utilizando o microscópio eletrônico de varredura de alto vácuo (SEM scanning electron microscope) modelo TM 3000 (Hitachi, Japão), com magnitude de 15x a 3000x (zoom digital 2, 4x) e aceleração de voltagem de 15 kV (Analy mode). Detector BSE do semiconductor de alta sensibilidade. Bomba turbomolecular: unidade 30 L/sx1, bomba de diafragma. As amostras foram dispostas sob suportes de alumínio (*stubs*) contendo uma fita de cobre de dupla face, para a fixação do material. Foram selecionados os melhores campos, onde as microcápsulas se encontravam isoladas.

2.2.6 Distribuição de tamanho e tamanho médio das microcápsulas

A determinação de tamanho médio e a distribuição de tamanho das microcápsulas foram obtidas através do equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instrument LTDA, Worcestershire, UK). Foram realizadas três leituras, com três repetições totalizando nove avaliações, sob agitação de 3500 rpm e 25% de ultrassom para dispersão das microcápsulas.

2.2.7 Teor de ômega-3

Para a determinação do teor de ômega-3 foram utilizados os resultados do teor lipídico médio total das microcápsulas obtido pela determinação da eficiência

de encapsulação (2.2.2) multiplicado pela concentração de EPA + DHA observado na composição em ácidos graxos. Tal composição foi determinada conforme metodologia descrita por Ruben e Barclay (1999). Três amostras (300 mg) foram pesadas em tubos tarados de 50 mL e adicionadas de 4 mL de solução de metanol contendo ácido sulfúrico (4%), sendo a mistura agitada em vórtex por 15 s. Em seguida as misturas foram inertizadas com nitrogênio gasoso e agitadas novamente. Por uma hora as amostras foram deixadas em bloco digestor a 110 °C sob agitação a cada 20 minutos. Após este período as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, adicionadas de 1 mL de água deionizada e 1 mL de hexano, agitadas por 20 segundos e centrifugadas a 1000 *g* por 3 minutos. O sobrenadante das amostras foi utilizado para a composição em ácidos graxos.

O éster metílico do ácido graxo serviu para a determinação da composição em ácidos graxos realizada em Cromatógrafo Gasoso Capilar – CGC Agilent 6850 Series GC System. Coluna Capilar: DB-23 Agilent (50% cyanopropyl) – methylpolysiloxane, dimensões 60 m, diâmetro interno 0,25 mm, filme 0,25 mm. Condições de operação do cromatógrafo: fluxo coluna = 1,0 mL/min; velocidade linear 24 cm/seg; temperatura do detector 280 °C; temperatura do injetor 250 °C; temperatura forno 110 °C-5 min / 110-215 °C – 5 °C/min / 215 °C = 34 min; Gás de arraste: Hélio; volume injetado 1,0 µL; split 1:50.

2.2.8 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando-se a análise de variância (ANOVA) para verificar os efeitos das variáveis independentes, com suas interações e análise de diferença de médias por Teste de Tukey, empregando-se o software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA), com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Potencial zeta

Na Figura 1 estão expostas as curvas do potencial zeta obtidas para o material de recheio e biopolímeros estudados isoladamente. Para cada reta se obteve o modelo matemático mais adequado ($R^2 > 0,95$), tais modelos seguem nas Equações 1, 2 e 3.

$$y_{(EE)} = 2,1582x^2 - 32,779x + 107,35 \quad (1)$$

$$y_{(IPS)} = 3,6091x^2 - 49,25x + 143,65 \quad (2)$$

$$y_{(GA)} = 0,9285x^2 - 13,679x + 14,127 \quad (3)$$

A curva obtida para IPS assemelha-se a dados encontrados na literatura, onde o valor do potencial zeta atinge o valor zero entre pH 4,4 e 4,6 (Lam, Shen, Paulsen & Corredig, 2007; Jaramillo, Roberts & Coupland, 2011).

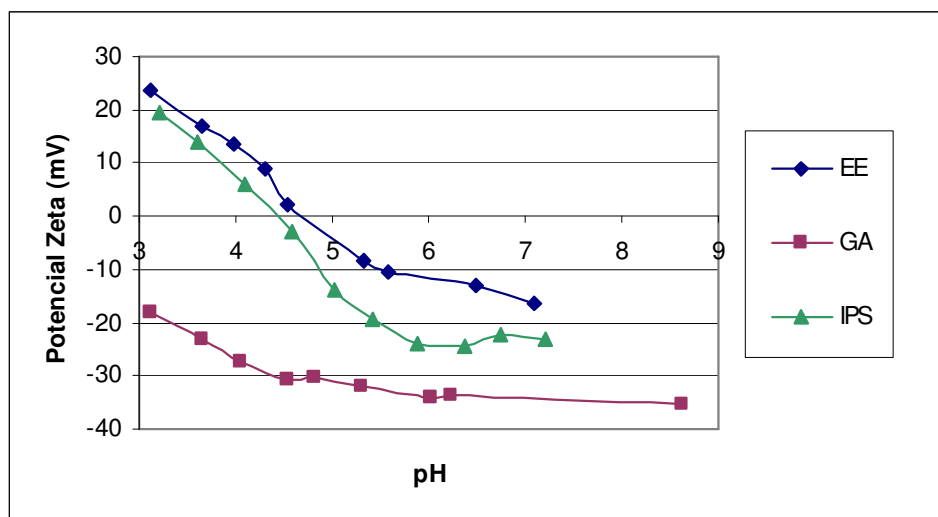


Figura 1. Gráficos dos potenciais zeta para soluções de goma arábica (GA), éster etílico de óleo de peixe (EE) e isolado protéico de soja (IPS).

Com base nos cálculos matemáticos, considerando as três equações anteriores se determinou o pH em que a densidade de cargas dos dois biopolímeros e o material de recheio ficam estequiometricamente balanceadas para cada proporção testada (P1 = 1,0:0,0 IPS:GA e 2,0:1,0 parede:recheio; P2 = 1,0:1,0 IPS:GA e 2,0:1,0 parede:recheio; P3 = 1,5:1,0 IPS:GA e 2,0:1,0 parede:recheio; P4 = 1,8:1,0 IPS:GA e 2,6:1,0 parede:recheio). Estes valores obtidos receberam a codificação Z seguidos de número correspondente para etapas posteriores de produção e caracterização das microcápsulas (Tabela 1).

A Figura 2 apresenta os resultados do comportamento eletrocinético de dispersões contendo IPS e EE (P1) e IPS, GA, e EE em diferentes concentrações (P2, P3 e P4). Nesta se pode observar que apenas o ensaio P1 (IPS:EE = 2:1) atingiu o potencial zeta zero, em valor próximo ao estimado pelos modelos anteriores (4,4 na mistura e 4,5 pela análises dos materiais isolados), sendo necessário ajustar modelos matemáticos preditivos para os demais ensaios.

Segundo Jun-Xia, Hai-Yan e Jian (2011), o pH 4,0 foi ponto elétrico equivalente para sistemas formados pelos biopolímeros IPS:GA na concentração 1:1, encapsulando óleo essencial de laranja, sendo este o possível pH em que a densidade de cargas dos dois biopolímeros ficam estequiometricamente balanceadas, porém esta determinação foi baseada no rendimento do processo e absorbância do sobrenadante observados em uma faixa de pH entre 2,5 e 4,5. Para o ensaio testado nas mesmas condições, entretanto com éster etílico de óleo de peixe (Figura 2B), através do potencial zeta foram obtidos resultados de pH de

1,4, utilizando cálculos matemáticos aproximados. Entretanto considerando os resultados da Figura 1 e equações 1, 2 e 3 este valor foi de 3,8. Tais diferenças possivelmente são explicadas pela interação das cargas dos compostos testados e para certificação dos resultados teóricos se seguiu para a verificação das características das microcápsulas formadas em ambos os pH (1,4 – M2 e 3,8 – Z2).

Nas Figuras 2C e 2D (P3 e P4) observam-se comportamentos diferenciados com a alteração do pH, apresentando um decréscimo nos valores do potencial zeta até próximos a -40 com pH em torno de 5,5 e posterior elevação nos valores. Ainda na Figura 2D, pode-se observar que no pH 6,5 ocorreu uma aproximação da curva ao ponto de cargas zero, tornando-se este um valor para os testes das microcápsulas.

Segundo Jaramillo, Roberts e Coupland (2011), o isolado protéico de soja é uma mistura de proteínas e agregados protéicos, conseqüentemente a medida do potencial zeta para esta é apenas um valor indicativo para estas, podendo partículas individuais apresentarem valores diferentes de potencial zeta em mesmo pH.

264 **Tabela 1.** Concentrações de IPS:GA, de material de recheio e de TG e pH utilizados para produção de microcápsulas de
 265 éster etílico de ácidos graxos ômega-3 por coacervação complexa com os respectivos resultados de rendimento do
 266 processo e eficiência de encapsulação, teor de óleo livre, tamanho médio de partícula e teor total de EPA + DHA.

267 ^A IPS = isolado protéico de soja; GA = goma arábica; P:R = Material de parede: material de recheio (éster etílico de óleo de peixe); TG = transglutaminase.

Ensaio	IPS:GA ^A	P:R ^A	TG ^A (UA/g)	pH	Rendimento (%)	Eficiência de encapsulação ^B (%)	Teor de éster livre ^C (%)	Tamanho de partícula ^C (µm)	Teor de EPA+DHA (g/100g)
Z1	1,0:0,0	2,0:1,0	10	4,46	88,52	22,2 ^d ± 3,14	23,84 ^a ± 1,27	50,71 ^e ± 4,08	17,15
Z2	1,0:1,0	2,0:1,0	10	3,76	40,99	49,59 ^{bcd} ± 8,09	7,86 ^{cd} ± 0,28	59,36 ^c ± 3,02	13,37
Z3	1,5:1,0	2,0:1,0	10	4,12	41,5	22,6 ^d ± 9,71	9,64 ^c ± 1,02	52,21 ^e ± 3,73	9,45
Z4	1,8:1,0	2,6:1,0	10	3,85	55,05	47,6 ^{bcd} ± 9,21	4,49 ^e ± 0,03	53,09 ^{de} ± 2,95	7,48
Z5	1,5:1,0	2,0:1,0	10	4,00	47,78	71,66 ^{ab} ± 9,05	15,29 ^b ± 1,78	51,44 ^e ± 2,20	20,31
M1	1,0:0,0	2,0:1,0	10	4,38	88,57	44,21 ^{bcd} ± 4,94	24,34 ^a ± 1,67	51,97 ^e ± 3,33	21,51
M2	1,0:1,0	2,0:1,0	10	1,42	29,08	78,74 ^a ± 9,44	3,94 ^e ± 0,59	61,61 ^c ± 3,74	15,35
M3	1,5:1,0	2,0:1,0	10	2,69	70,49	34,66 ^{cd} ± 8,21	22,64 ^a ± 0,58	69,22 ^b ± 5,57	18,85
M4	1,8:1,0	2,6:1,0	10	2,47	60,87	53,79 ^{abc} ± 9,48	7,61 ^{cd} ± 0,44	57,91 ^{cd} ± 2,00	11,38
M5	1,8:1,0	2,6:1,0	10	6,40	39,43	53,54 ^{abc} ± 8,45	6,12 ^{de} ± 0,95	121,48 ^a ± 5,72	10,52

268 ^B Os resultados representam as médias de cinco determinações. As amostras seguidas de letras iguais na coluna não diferem ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

269 ^C Os resultados representam as médias de três determinações. As amostras seguidas de letras iguais na coluna não diferem ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

270

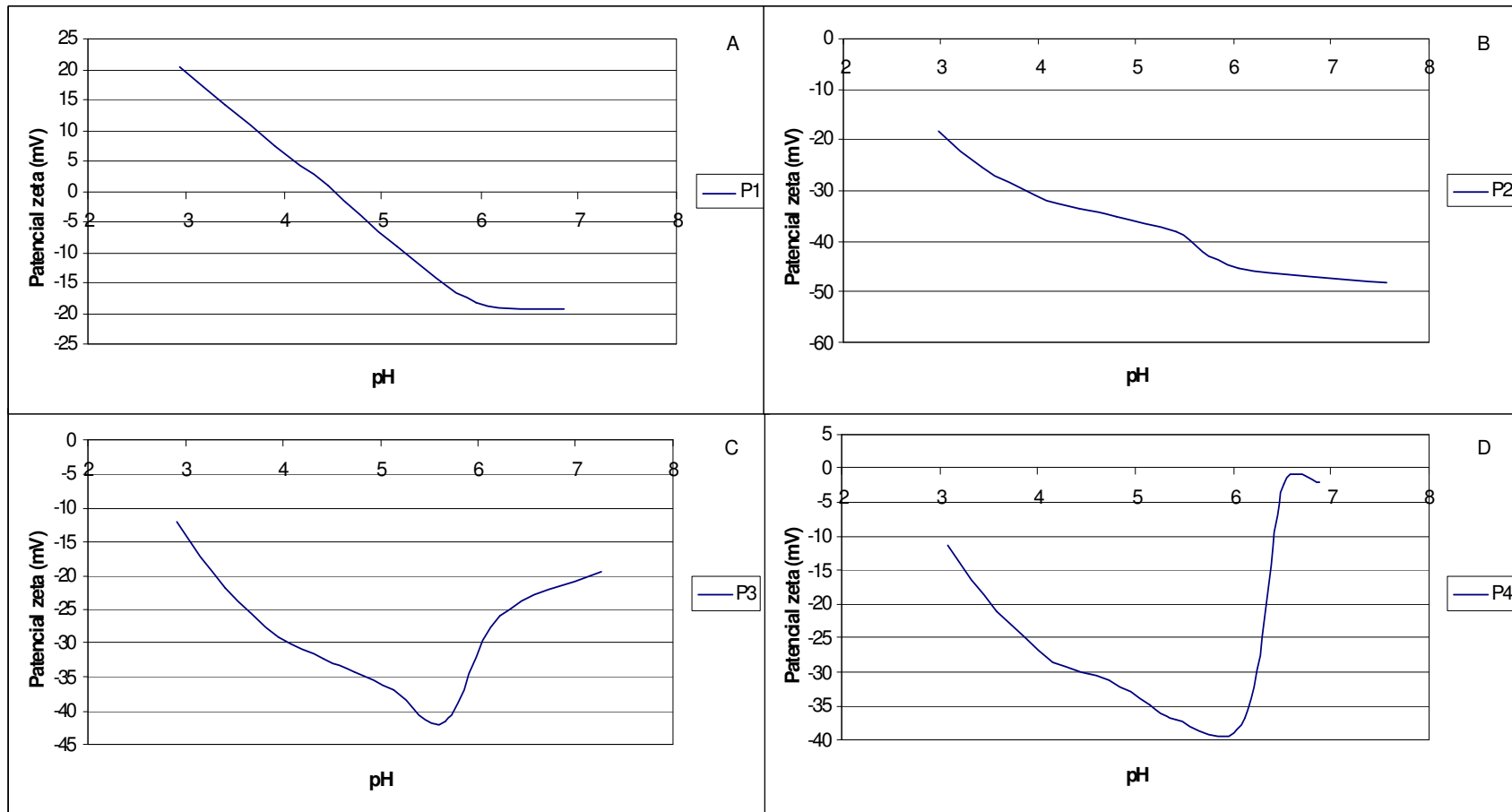


Figura 2. Gráficos dos potenciais zeta para as misturas de goma arábica, éster etílico de óleo de peixe e isolado protéico de soja.

Onde: P1 = 1,0:0,0 SPI:AG; 2,0:1,0 wall:core; P2 = 1,0:1,0 SPI:AG; 2,0:1,0 wall:core; P3 = 1,5:1,0 SPI:AG; 2,0:1,0 wall:core; P4 = 1,8:1,0 SPI:AG; 2,6:1,0 wall:core.

3.2. Rendimento do processo e eficiência de encapsulação

Na Tabela 1 estão expostos os valores de rendimento do processo e eficiência de encapsulação obtidos. Nestes podem ser observados que os rendimentos dos processos foram superiores nos ensaios onde não foram adicionados goma arábica (Z1 e M1), com valores próximos a 90%, seguidos do ensaio com 1,5:1,0 IPS:GA e 2:1 material de parede:material de recheio (M3), com 70% de rendimento do processo. Característica semelhante foi verificada anteriormente, onde os melhores resultados de rendimento foram observados nas maiores proporções de IPS em relação a GA. O menor valor de rendimento observado foi para o ensaio que testou um pH ácido extremo (1,42), as perdas podem ter ocorrido pela desnaturação dos biopolímeros testados e também pela perda de atividade da enzima transglutaminase utilizada como agente reticulante.

Jun-Xia, Hai-Yan e Jian (2011), observaram valores máximos de rendimento de encapsulação quando trabalharam utilizando apenas 10% de material de recheio (óleo essencial de laranja) em relação ao material de parede (SPI:AG), decaindo os valores com o aumento desta concentração. Lamprecht, Schäfer e Lehr (2001), obtiveram resultados próximos a 90% de rendimento de encapsulação para cápsulas de éster etílico de óleo de peixe encapsulado em matriz de gelatina e GA por coacervação complexa, resultados obtidos em concentrações de 1,0:1,0 de material de parede:material de recheio, porém quando aumentaram a concentração do material de recheio, este resultado decaiu.

As eficiências de encapsulação observadas diferiram estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$), variando de 22,2 (Z1) a 78,7% (M2). Os ensaios M2, Z5, M4 e M5 não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), entretanto se observou um antagonismo entre os resultados de rendimento do processo e eficiência de encapsulação.

Os baixos valores de rendimento do processo e eficiência de encapsulação observados podem ser explicados pelo fato do IPS apresentar baixa solubilidade, limitando sua aplicação em sistemas alimentícios, mesmo tendo se recorrido ao uso de ultrassom para melhor solubilização da proteína (Mendanha, Molina-Ortiz, Favaro-Trindade, Mauri, Monterrey- Quintero & Thomazini, 2009; Molina Ortiz et al., 2009).

3.3 Teor de EE superficial

Na Tabela 1 estão expostos os valores de teor de EE superficial obtidos, onde se observa diferença estatisticamente significativa entre os ensaios ($p \leq 0,05$).

Os ensaios Z1, M1 e M3 apresentaram valores superiores a 20% de EE superficial, estes mesmos ensaios apresentaram elevados resultados de rendimento do processo. Os ensaios Z4 (4,5%), M2 (3,9%) e M5 (6,12%) apresentaram os menores valores de éster etílico de óleo de peixe livre. Lamprecht, Schäfer e Lehr (2001), obtiveram diferentes resultados de EE

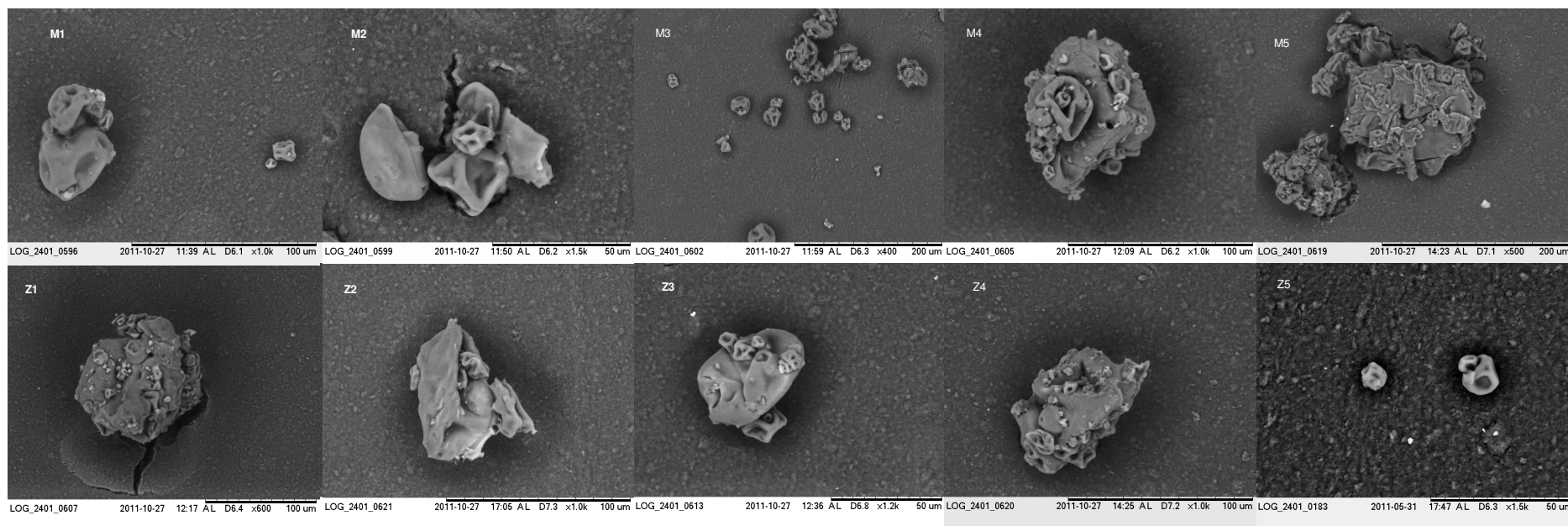
superficial após a etapa de reticulação com diferentes agentes químicos e por *spray drying*, variando de 4,3 a 28,2%. Davidov-Pardo et al. (2008), trabalhando com isolado protéico de soja pelo processo de gelificação enzimática encontraram valores de óleo de peixe superficial superiores a 5%.

3.4 Morfologia das microcápsulas

A formação das microcápsulas de éster etílico de óleo de peixe foi confirmada pela observação em MEV. Todos os ensaios apresentaram a mesma conformação topográfica, com rugosidade acentuada e presença de microcápsulas menores aderidas nas superfícies, sendo que estas características podem ser observadas na Figura 3.

Jun-Xia, Hai-Yan e Jian (2011), obtiveram microcápsulas circulares com pequenas ondulações e perceberam fissuras na superfície das cápsulas obtidas com IPS e GA por processo semelhante ao utilizado neste trabalho. Tang e Li (2012) também observaram a presença de rugosidades na superfície de microcápsulas produzidas com isolado protéico de soja pelo processo de *spray drying*, muito semelhantes às microcápsulas encontradas nesse trabalho, e justificaram tal fato pelo encolhimento desigual da cápsula durante o processo de secagem e/ou pelo elevado teor protéico da sua parede.

347



348

349 **Figura 3.** Microscopia eletrônica de varredura de microcápsulas produzidas com éster etílico de óleo de peixe, isolado
 350 protéico de soja e goma arábica por coacervação complexa em diferentes pHs.

351 Onde: M1 = 1,0:0,0 SPI:AG; 2,0:1,0 wall:core; pH 4,38; M2 = 1,0:1,0 SPI:AG; 2,0:1,0 wall:core; pH 1,42; M3 = 1,5:1,0 SPI:AG; 2,0:1,0 wall:core; pH 2,69; M4 = 1,8:1,0 SPI:AG; 2,6:1,0
 352 wall:core; pH 2,47; M5 = 1,8:1,0 SPI:AG; 2,6:1,0 wall:core; pH 6,40; Z1 = 1,0:0,0 SPI:AG; 2,0:1,0 wall:core; pH 4,46; Z2 = 1,0:1,0 SPI:AG; 2,0:1,0 wall:core; pH 3,76; Z3 = 1,5:1,0
 353 SPI:AG; 2,0:1,0 wall:core; pH 4,12; Z4 = 1,8:1,0 SPI:AG; 2,6:1,0 wall:core; pH 3,85; Z5 = 1,5:1,0 SPI:AG; 2,0:1,0 wall:core; pH 4,0.

3.5 Distribuição de tamanho e tamanho médio das microcápsulas

A distribuição do tamanho de partículas seguiu uma distribuição unimodal com tendência à normalidade em todos os ensaios. Neste trabalho foram observadas variações entre 12,2 μm (diâmetro mínimo) e 360,6 μm (diâmetro máximo), e valores médios variando de 50,7 a 121,5 μm , sendo este valor elevado encontrado no ensaio M5 (diferente estatisticamente dos demais, $p \leq 0,05$), cujo pH utilizado foi de 6,4. Este fato pode ser explicado pelo fato de ser o único pH considerado ideal para a atuação da enzima transglutaminase utilizada para a reticulação das microcápsulas.

A transglutaminase (TG) (E.C. 2.3.2.13; R-glutamil-peptídeo: amina g-glutamil transferase) catalisa reações de acil transferência, formando ligações cruzadas intra e intermoleculares em proteínas, peptídeos e aminas primárias, principalmente através de ligações covalentes entre resíduos de glutamina e lisina. A enzima transglutaminase, obtida a partir de microorganismos apresenta uma faixa ampla de pH para ação (4 - 9), sendo valor de ótima atividade entre pH 5 - 8 e temperatura de 40 °C (Aboumahmoud & Savello, 1990; Folk & Finlayson, 1977; Griffin, Casadio, & Bergamini, 2002; Ando, Adachi, Umeda, Matsuura, Nonaka, Uchio, Tanaka & Motoki, 1989).

3.6 Teor de ômega-3 encapsulados

Na Tabela 1 estão apresentados os valores finais de ômega-3 (EPA + DHA) em cada ensaio, podendo se observar que os ensaios Z5 e M1 apresentaram valores superiores a 20 g de EPA + DHA / 100 g de microcápsula. . Sendo assim, com base na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA – BRASIL, 2009), seria necessária a adição de 0,50 g de microcápsulas em porções ou em 100 g ou 100 mL de alimentos para considerar este com apelo de propriedade funcional, visto que é regulamentado que alimentos devem apresentar no mínimo 0,1 g de EPA e/ou DHA na porção ou em 100 g ou 100 mL, para se permitir esta alegação (ANVISA, 2009).

Todavia, existem inúmeras recomendações de ingestão diária de ácidos graxos ômega-3 divulgadas por diversos autores e Entidades, algumas listadas por Whelan e Rust (2006):

A British Nutrition Foundation, do Reino Unido, recomendou o consumo de 1,25 g/dia de ácidos graxos ômega-3 totais (1999); Simopoulos, Leaf e Salem, 650 mg/dia de EPA + DHA (2000); o Scientific Advisory Committee on Nutrition, também do Reino Unido, > 0,2 g/dia ácidos graxos ômega-3 (2002); a Organização Mundial da Saúde (OMS), 1 a 2% das calorias provenientes de ácidos graxos ômega-3 (2003); a International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, ≥ 500 mg/dia de EPA + DHA (2004). Ainda em 2004, a Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos, permitiu a alegação de propriedade funcional para alimentos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3, porém

também sugeriu que o consumo EPA + DHA não exceda 3 g/dia devido a possíveis efeitos adversos no controle glicêmico, aumento do tempo de sangramento e do LDL-colesterol.

4 CONCLUSÃO

Ao término deste trabalho conclui-se que cada componente estudado apresenta comportamento típico quando avaliado através do potencial zeta, em especial o IPS que causa variação devido sua constituição como proteínas isoladas e agregados protéicos, com baixa solubilidade, sendo assim difícil determinar exatamente o valor de potencial zeta zero para as misturas estudadas.

As microcápsulas produzidas com 1,5:1,0 IPS:GA, 2,0:1,0 parede:recheio e pH 4,0 (Z5) apresentou em torno de 20 g / 100 g de microcápsulas, sendo recomendada uma adição de 0,50 g em porções ou em 100 g ou 100 mL de alimentos para considerar este com apelo de propriedade funcional pelas determinações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil).

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro dos órgãos governamentais brasileiros (Capes e CNPq) pela bolsa de doutorado cedida aos membros participantes da pesquisa. Agradecem aos fornecedores das matérias primas

415 utilizadas no trabalho Vital Atman, The Solae Company, CNI Colloides Naturais
416 Brasil Comercial Ltda e Ajinomoto.

417

418 **6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

419 Aboumahmound, R. & Savello, P. (1990). Crosslinking of whey protein by
420 Transglutaminase. *Journal of Dairy Science*, 73, 256-263.

421 Ackman, R.G. Marine lipids and omega-3 fatty acids. (2006) .In: Akoh, C. C.
422 *Handbook of functional lipids*. Boca Raton: CRC.

423 Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H.
424 & Motoki, M. (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase
425 derived from microorganism. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2613-2617.

426 ANVISA. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Alimentos Comissões
427 Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos.
428 Disponível em: www.anvisa.gov.br. Access in: 25/10/2009.

429 AOCS (2009). *Official methods and recommended practices of the American Oil*
430 *Chemists' Society*. 6th ed. AOCS, Champaign, IL.

431 Davidov-Pardo, G., Roccia, P., Salgado, D., León, A. E., & Pedroza-Islas, R.
432 (2008). Utilization of different wall materials to microencapsulate fish oil evaluation
433 of its behavior in bread products. *American Journal of Technology*, 3, 384-393.

434 Ducel, V., Richard, J., Saulnier, P., Popineau, Y., & Boury, F. (2004). Evidence and
 435 characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to
 436 the microencapsulation of oil droplets. *Colloids and Surfaces A - Physicochemical
 437 and Engineering Aspects*, 232, 239-247.

438 Folk, J.E., & Finlayson, J.S. (1977) The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink
 439 and the catalytic role of transglutaminases. *Adv. Protein Chem.* 31: 1.33.

440 Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies
 441 and trends. *Food Science and Technology*, 15, 330-347.

442 Griffin, M., Casadio, R., & Bergamini, C. M. (2002). Transglutaminases: Nature's
 443 biological glues. *Biochemical Journal*, 368, 377-396.

444 Hobeco. Corrente de Fluxo. 2004. Disponível em: <www.hobeco.net>. Acesso em:
 445 outubro de 2011.

446 Jaramillo, D. P., Roberts, R. F. & Coupland, J. N. (2011). Effect of pH on the
 447 properties of soy protein-pectin complexes. *Food Research International*. 44, 911 –
 448 916.

449 Jun-Xia, X., Hai-Yan, Y & Jian, Y. (2011) Microencapsulation of sweet orange oil
 450 by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food
 451 Chemistry*, 125, 1267–1272.

452 Lam, M., Shen, R., Paulsen, P. & Corredig, M. (2007) Pectin stabilization of soy
 453 protein isolate at low pH. *Food Research International*, 40(1), 101-110.

454 Lamprecht, A., Schafer, U. F., & Lehr, C. M. (2001). Influences of process
 455 parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for O - 3
 456 unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. *Journal of*
 457 *Microencapsulation*, 18, 347-357.

458 Ma, Z. H., Yu, D. G., Branford-White, C. J., Nie, H. L., Fan, Z. X., & Zhu, L. M.
 459 (2009). Microencapsulation of tamoxifen: Application to cotton fabric. *Colloids and*
 460 *Surfaces B Biointerfaces*, 69, 85 - 90.

461 Mendanha, D. V., Molina-Ortiz, S. E., Favaro-Trindade, C. S., Mauri, A.,
 462 Monterrey-Quintero, E. S., & Thomazini, M. (2009). Microencapsulation of casein
 463 hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*,
 464 42, 1099–1104.

465 Molina-Ortiz, S. E., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A., Santana,
 466 A. S., & Favaro-Trindade, C. S. (2009). Production and properties of casein
 467 hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. *LWT*
 468 – *Food Science and Technology*, 42, 919–923.

469 Ruben, A., & Barclay, B. (1999). Fatty acid analysis of egg yolk as methyl esters.
 470 *Omega Tech*, Inc.

471 Salopek, B., Krasic, D., & Filipovic, S. (1992). Measurement and Application of
 472 Zeta-Potential. *Rudarsko-geoloiko-naftni zbornik*, 4, 147-151.

473 Tang, C.-H. & Li, X.-R. (2012). Microencapsulation properties of soy protein isolate
474 and storage stability of the correspondingly spray-dried emulsions. *Food Research*
475 *International*, doi: 10.1016/j.foodres.2012.09.010

476 Velasco, J., Dobarganes, M. C., & Márquez-Ruiz, G. (2000). Oxidation o free and
477 encapsulated oil fractions in dried microencapsulated fish oil. *Grasas y Aceites*, 51,
478 439-446.

479 Whelan, J., & Rust, C. (2006). Innovative dietary sources of n-3 fatty acids. Annual
480 *Review of Nutrition*, 26, 75–103.

481

482

CONCLUSÕES GERAIS

A produção de microcápsulas contendo éster etílico de óleo de peixe através dos processos de gelificação enzimática e coacervação complexa foi conseguida observando os efeitos das principais suas variáveis.

Pelo processo de gelificação enzimática, o tipo de proteína utilizado como material de parede para a obtenção das microcápsulas influenciou em todas as variáveis dependentes estudadas. Sendo que o ensaio realizado com 10% de isolado protéico de soja em proporção de 2:1 (material de parede: material de recheio) apresentou o maior valor de rendimento e boa eficiência de encapsulação, aproximadamente 88% e 47%, respectivamente, em torno de 8% de material lipídico livre, o menor diâmetro médio (53,47 μm) e menos de 5% de éster etílico de óleo de peixe no resíduo, ainda se observou uma elevada resistência à degradação das cápsulas formadas, se considerado este o melhor dentre os ensaios realizados nos ensaios iniciais.

Quando estudadas mais detalhadamente as características das microcápsulas produzidas por gelificação enzimática em diferentes condições de processo, a análise do material encapsulado constatou a presença de triacilgliceróis, indicando que ocorreu a encapsulação de óleo de milho da segunda emulsão utilizada durante o processamento, reduzindo assim a eficiência real de encapsulação, mostrando-se assim uma técnica não eficaz, mesmo se

obtendo cápsulas com resistência à degradação da parede. Porém, 3,79 g das microcápsulas produzidas com 5% de éster etílico, a 11000 rpm com 10% de isolado protéico de soja e 1% de Span 80 podem ser adicionadas em porções de 100 g ou 100 mL para que o alimento seja considerado funcional pela ANVISA.

Comparando-se as metodologias de degradação das cápsulas produzidas por gelificação enzimática, foi observada a total degradação da parede para a metodologia de degradação ácida e a parcial para a metodologia de degradação enzimática alcalina, entretanto a melhor metodologia de degradação para se determinar a composição do material encapsulado foi a degradação ácida com determinação direta da composição em ácidos graxos.

No estudo estatístico das variáveis de processo para a produção de microcápsulas contendo éster etílico de óleo de peixe obtidas por coacervação complexa utilizando isolado protéico de soja e goma arábica como material de parede, apenas a variável dependente “rendimento do processo” apresentou resultados que possibilitaram a obtenção de modelo matemático e superfície de resposta para descrever seu o comportamento, as demais variáveis dependentes observadas diferiram muito entre si não possibilitando descrever um comportamento factível de ser modelado.

As microcápsulas quando produzidas com 1,5:1,0 isolado protéico de soja: goma arábica, 1,0:1,0 material de parede: material de recheio e 6,0 UA de transglutaminase/g e 1,5:1,0 isolado protéico de soja: goma arábica, 2,0:1,0 material de parede: material de recheio e 10,0 UA transglutaminase/g pelo processo de coacervação complexa, se obtiveram cápsulas contendo mais de 20 g de EPA + DHA / 100 g microcápsulas, sendo necessária a adição de menos de

0,5 g de microcápsulas em porções de 100 g ou 100 mL de alimentos para este poder ser considerado funcional.

Devido à grande variação nas respostas observadas dos ensaios do Artigo III, um estudo mais aprofundado do processo de coacervação através do potencial zeta dos materiais de parede e de recheio separadamente e em diferentes misturas foi necessário. Neste estudo ficou constatado que o isolado protéico de soja, por possuir variação na sua constituição (componentes de diferentes tamanhos e cargas) e baixa solubilidade, dificulta a determinação exata do potencial zeta zero das misturas, sendo a máxima eficiência de encapsulação encontrada quando se testou as misturas de 1,5:1,0 isolado protéico de soja:Goma arábica e 2,0:1,0 material de parede:material de recheio em pH 4,0.

Com os resultados expostos neste trabalho considera-se necessária a continuação dos trabalhos na linha de pesquisa de microencapsulação de éster etílico de óleo de peixe e aplicação destas cápsulas em produtos alimentícios e estudos dirigidos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Neste Capítulo Final procura-se indicar alguns novos trabalhos para complementar os estudos apresentados nesta tese, conforme itens listados a seguir:

- Otimização do processo de gelificação enzimática, visando reduzir o tempo de produção e perdas no processamento das microcápsulas;
- Estudos referentes à utilização da técnica de gelificação enzimática como segunda parede em nanocápsulas produzidas por coacervação;
- Avaliação da biodisponibilidade de microcápsulas produzidas com isolado protéico de soja como material de parede contendo éster etílico de óleo de peixe;
- Acompanhamento da estabilidade das microcápsulas que contém éster etílico de óleo de peixe, antes e após a aplicação em produtos alimentícios;
- Avaliação da aceitabilidade de produtos enriquecidos com microcápsulas produzidas por coacervação complexa de isolado protéico de soja e goma arábica contendo éster etílico de óleo de peixe.

