



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. Lireny 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, Aláide, 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

SUMÁRIO

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

SUMÁRIO

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

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 MICROCÁPSULAS 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 MICROCÁPSULAS 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

SUMMARY

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

INTRODUÇÃO

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

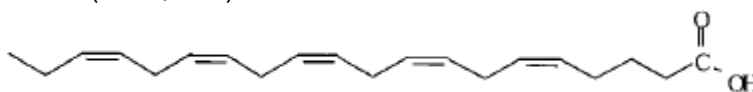
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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)

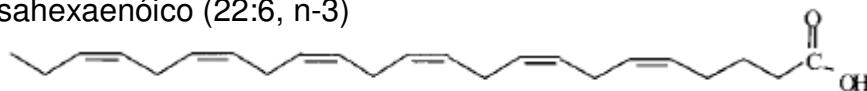


Figura 1. Estrutura do ácido eicosapentaenóico e do ácido docosahexaenóico.
(Fonte: Trautwein, 2001).

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).

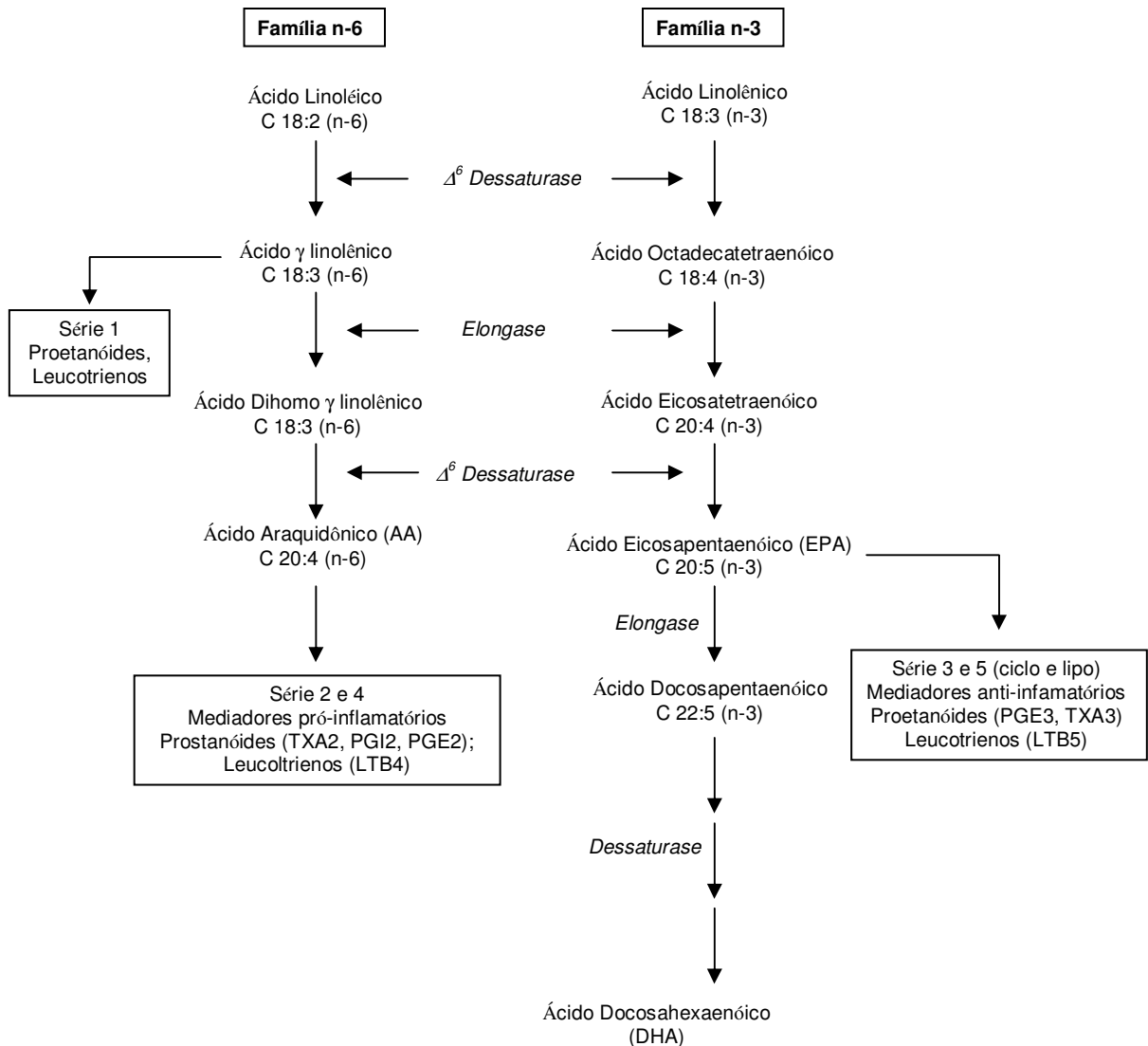


Figura 2. Metabolismo de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6.

(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 trombooses, 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 (GUILLOT 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 flamabilidade 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.

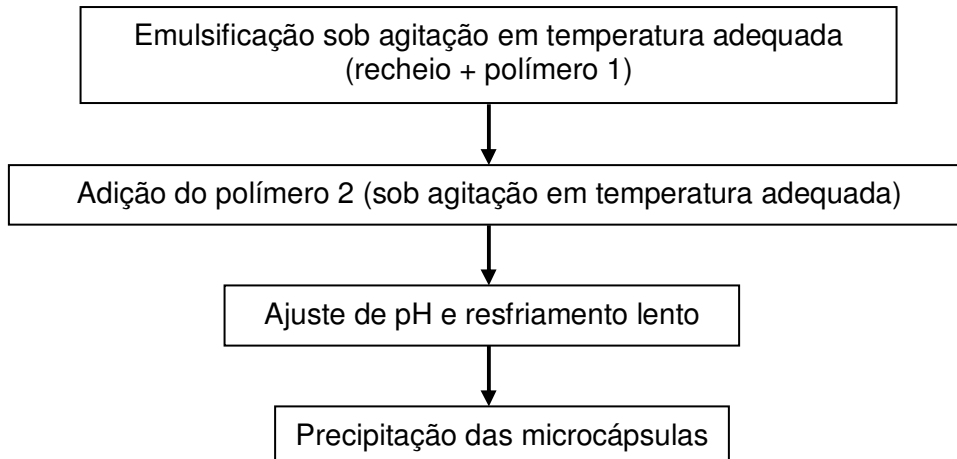


Figura 3. Modelo esquemático de microencapsulação por coacervação complexa.

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 enriquecimento 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 conseqüentemente 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; SERNASALDIVAR 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 ditiotreitol, 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 se 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).

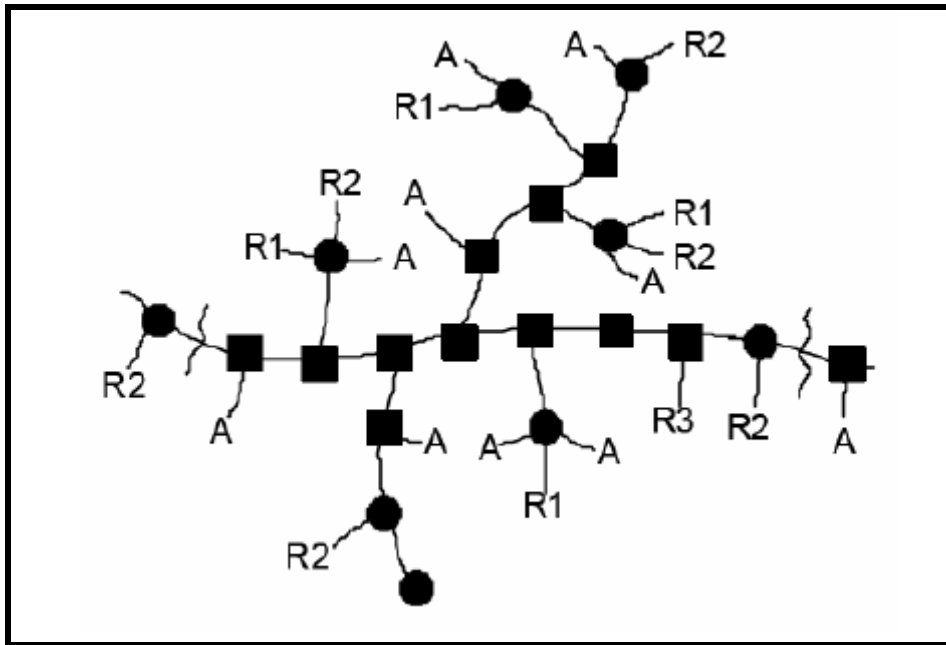


Figura 4. Estrutura molecular da goma arábica.

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 metaglicurônicos 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 conseqüentemente 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; KOLANOWSK et al., 2006; KOLANOWSK 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 Ducei 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 $m^2/V.s$. 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).

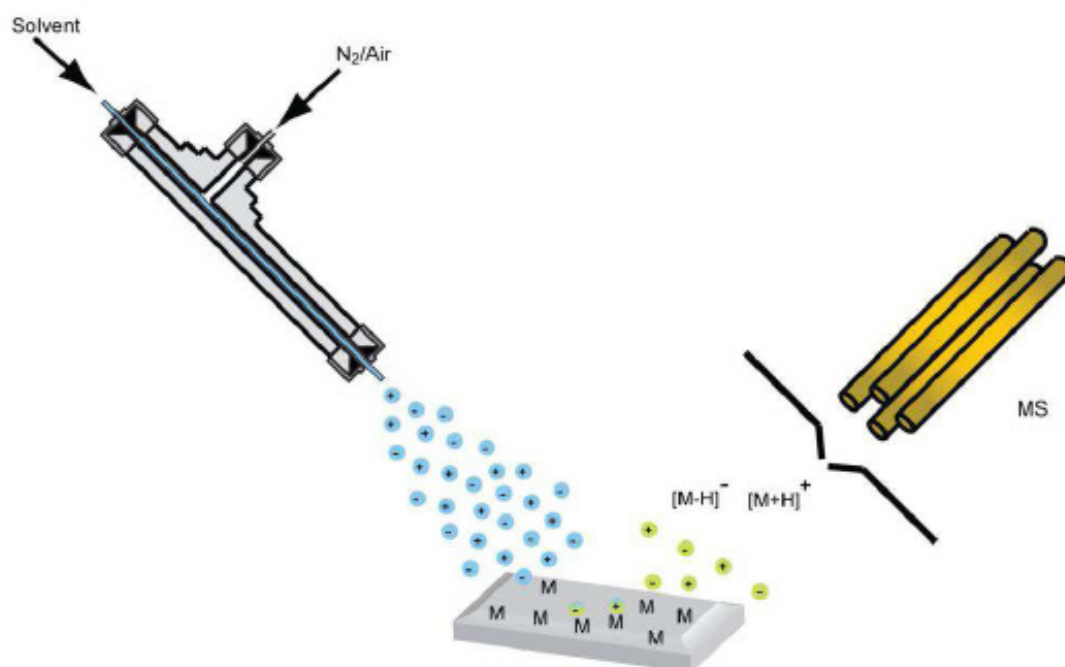


Figura 5. Esquema do processo de ionização EASI-MS.
(Fonte: SIMAS, 2010).

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.

BRENNA, 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.; DEMAIMAY, 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; SCHAFFER, 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 *Streptovercillium 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 o 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 ω -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; Lireny 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.

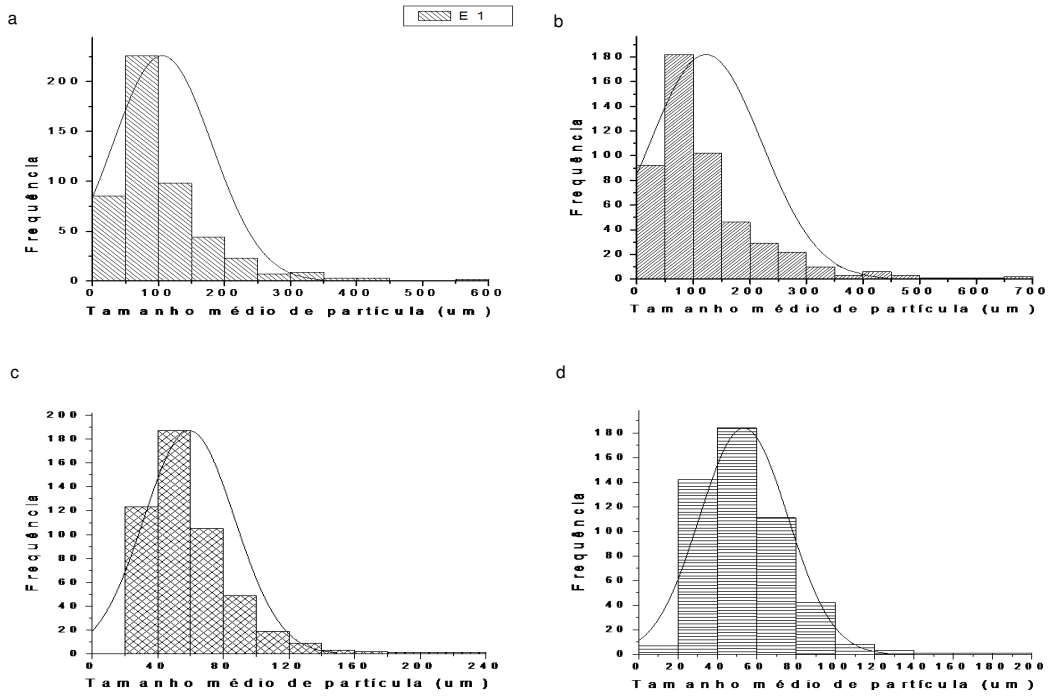


Figura 1. Distribuição de tamanho das microcápsulas liofilizadas obtidas por gelificação enzimática.

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.

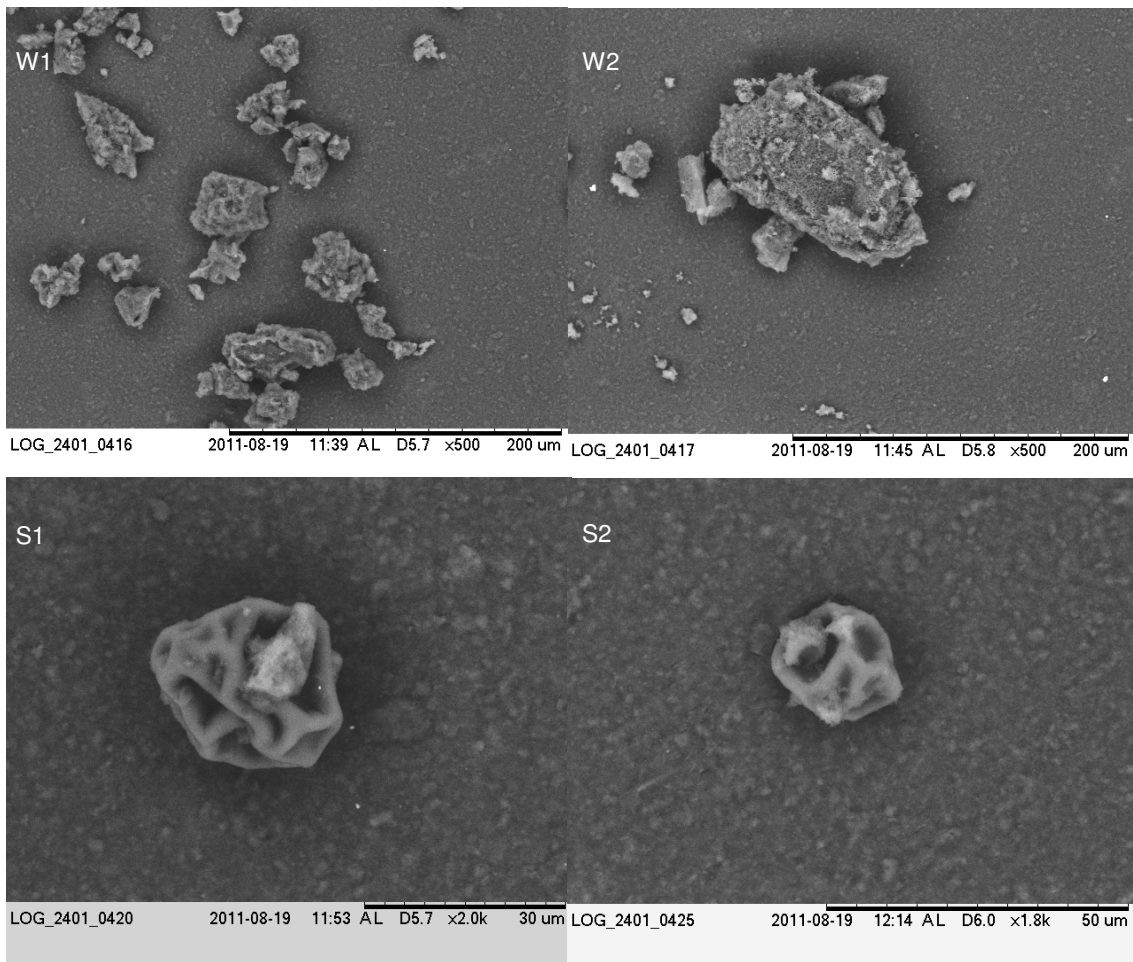


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas contendo éster etílico de óleo de peixe produzidas por gelificação enzimática.

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 ditionetol, 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

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

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

5
6 ¹ School of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP,
7 Brazil, ZIP CODE: 13083-862

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

10
11 **ABSTRACT**

12 The objective of this study was to evaluate the fatty matter encapsulated by the
13 enzymatic gelation process under different processing conditions, using soy protein
14 isolate as the wall material and the enzyme transglutaminase, studying six different
15 methods of extracting the core material (omega-3) to obtain less altered fatty
16 matter. The microcapsule wall degradation tests showed differences, degradation
17 being observed when using the acid methodology, alkaline enzymatic method and
18 the acid method with direct determination of the fatty acid composition. The
19 presence of triglycerides and ethyl ester was shown in the microcapsules by way of
20 easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS), high
21 performance size exclusion chromatography (HPSEC) and the fatty acid
22 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.

28 **1 INTRODUCTION**

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

36 According to Rubio-Rodríguez, Beltrán, Jaime, Diego, Sanz & Carballido
37 (2010), fish are the traditional sources of EPA and DHA-rich oils, and the
38 production of concentrated methyl or ethyl ester derivatives from fish oil stands out,
39 since these are more stable to oxidation. However, the application of fish oil and its
40 derivatives in food systems is limited by their oxidative instability during storage,
41 presenting off-flavors (Cho, Shim & Park, 2003). Thus techniques have been
42 developed aimed at protecting these compounds against oxidation, such as
43 microencapsulation, which simultaneously facilitates incorporation of these
44 ingredients into food formulations (Ackman, 2006).

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

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

57 The use of the enzyme transglutaminase (TG) as a protein reticulating
58 agent, which is permitted for use in foods, is a promising option. TG (E.C. 2.3.2.13)
59 catalyses acyl transference reactions, forming intra and intermolecular cross
60 linkages in proteins, peptides and primary amines, principally by way of covalent
61 bonds between the glutamine and lysine residues, its efficiency in forming these
62 cross links depending on the molecular structure of the protein (Griffin, Casadio &
63 Bergamini, 2002; Chambi & Grosso, 2006). Some studies on the use of
64 transglutaminase have been published in the literature, reporting on its capacity to
65 form cross linkages in various proteins, such as myofibrillar proteins (Kahn &
66 Cohen, 1981), milk proteins (Jaros, Partschefeld, Henle & Rohm, 2006), egg white
67 and yolk (Sakamoto, Kumazawa & Motoki, 1994; Lim, Mine & Tung, 1998), fish
68 proteins (Joseph, Lanier & Hamann, 1994), cereal proteins (Basman, Köksel & Ng,
69 2002) and soy proteins (Nio, Motoki & Takinami, 1985; Ikura, Kometani, Sasaki &
70 Chiba, 1980; Kang, Matsumura, Ikura, Motoki, Sakamoto & Mori, 1994; Babiker,
71 2000; Cho, Shim & Park, 2003; Serna-Saldivar, Zorrilla, La Parra, Stagnitti & Abril,
72 2006).

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

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

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

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

95

96 **2 MATERIAL AND METHODS**

97 **2.1 Materials**

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

102

103 **2.2 Methods**

104 **2.2.1 Microcapsule production**

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

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

110

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

114

115 (b) The first emulsion was formed by mixing the FOEE in the initial protein solution
116 for 10 minutes in a basic T18 Ultraturrax (Ika-Werk, Brasília, DF) at 11000 *rpm*.

117 The ratio of wall material to core material was 2:1 (w/w).

118

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

124

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

129

130 **2.2.2 Process yield and encapsulation efficiency**

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

133 The encapsulation efficiency was obtained after the acid degradation of the
134 capsules, where 0.2 g of sample was added to 4.5 mL of boiling deionized water
135 containing 5.5 mL 8 M hydrochloric acid, and maintained in a boiling water bath for
136 30 minutes (until complete degradation of the wall material). The mixture was
137 subsequently filtered and washed with 10 mL boiling deionized water. The filter
138 papers with the hydrolyzed samples were dried in an oven and then extracted
139 according to the methodology for the determination of the oil content (AOCS Ac 3-
140 44, 2009) of compounds with high protein content. The encapsulation efficiency

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

143
144
145
$$\% \text{ Encapsulation efficiency} = \frac{(\text{Total lipid content} - \text{free lipid content}) \times 100}{\text{Total lipid content}} \quad (1)$$

146
147

148

149 **2.2.3 Microcapsule morphology**

150 The morphology of the microcapsules was determined using a model TM
151 3000 high vacuum scanning electronic microscope (SEM) (Hitachi, Japan), with a
152 magnitude of x15 to x3000 (digital zoom 2, x4) and accelerating voltage of 15 kV
153 (Analy mode). The samples were arranged on aluminum stubs containing a
154 double-faced copper tape, using carbon glue to secure the material. The best fields
155 were selected, where the microcapsules were isolated.

156

157 **2.2.4 Size distribution and average size of the microcapsules**

158 The average size and size distribution of the microcapsules were
159 determined using a Mastersizer 2000 (Malvern Instrument LTDA, Worcestershire,
160 UK). Three readings were made giving a total of nine repetitions, with agitation at
161 3500 rpm and 25% of ultrasound to disperse the particles in the water.

162

163 **2.2.5 Extraction of the free fatty matter**

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

166 To determine the free oil content, 20 mL of petroleum ether were added to
167 0.8 g microcapsules and stirred for 15 minutes at 25°C. The microcapsules were
168 then filtered through anhydrous Na₂SO₄, the solvent evaporated and the samples
169 dried with nitrogen.

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

173

174 **2.2.6 Extraction of the encapsulated fatty matter**

175 The microcapsules obtained with 5% FOEE, 10% SPI, at 1100 rpm and with
176 3% of Span 80 (E3), due to their greater availability, were submitted to six different
177 extraction methods to extract the encapsulated material, so as to determine which
178 method extracted more material with higher quality. The amount of encapsulated
179 fatty matter extracted by the first five methods was determined using equation (2):

180

181
$$\% \text{ Encapsulated Matter} = \frac{\text{g fatty material extracted} \times 100}{\text{g microcapsules}} \quad (2)$$

182
183

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

186 photographing the images using a digital camera controlled by the image-pro plus
187 6.0 program, using the x12, x25 and x40 objectives.

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

189

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

201

202 TD2 = enzymatic degradation using the methodology described by Mascarenhas
203 (2010) with some adaptations, where 0.1 g of microcapsules free of surface oil
204 were dispersed in 4 mL of enzyme solution containing 0.5% Protex 6L liquid
205 bacterial protease (Genencor, Danisco, Cotia, SP, Brazil) and 0.5% liquid bacterial
206 α-amylase (Thermamyl 2X, Novozymes, Araucária, PR, Brazil) at pH 8. The
207 mixtures were placed in a water bath at 50°C for 1 hour, mixing the contents of the
208 tubes every 10 minutes for 20 s. The contents were then transferred to a
209 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

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

241

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

254

255 **2.2.7 Constitution of the free and encapsulated material**

256 **2.2.7.1 High performance size-exclusion chromatography to determine the**
257 **lipid group constituents (HPSEC)**

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

260 The presence of FOEE in the encapsulated and free fatty materials was
261 evaluated according to Moura, Gonçalves, Grimaldi, Soares & Ribeiro (2006),
262 using high performance size-exclusion chromatography (HPSEC) in a Perkin Elmer
263 250 liquid chromatograph equipped with a Sicon Analytic refractive index detector
264 and 300 x 7.8 mm JORDI GEL DVB columns at 500Å and 100Å. The mobile phase
265 was tetrahydrofuran (THF) with a flow rate of 1 mL/min, and the sample was
266 dissolved in 1% THF, injecting 20.0 µL.

267

268 **2.2.7.2 Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS)**

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

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

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

283

284 **2.2.7.3 Determination of the fatty acid constituents by gas chromatography**

285 **(CG)**

286 The encapsulated material was extracted as described by Ruben & Barclay
287 (1999) in order to analyze the fatty acid composition.

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

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

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

302

303 **2.2.8 The encapsulated fatty matter and FOEE contents**

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

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

317

318 **2.2.9 Statistical analysis**

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

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

324

325 **3 RESULTS AND DISCUSSION**

326 **3.1 Process yield and encapsulation efficiency**

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

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

338

339 **3.2 Free fatty matter content**

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

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

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

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

355

356 **3.3 Microcapsule morphology**

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

365

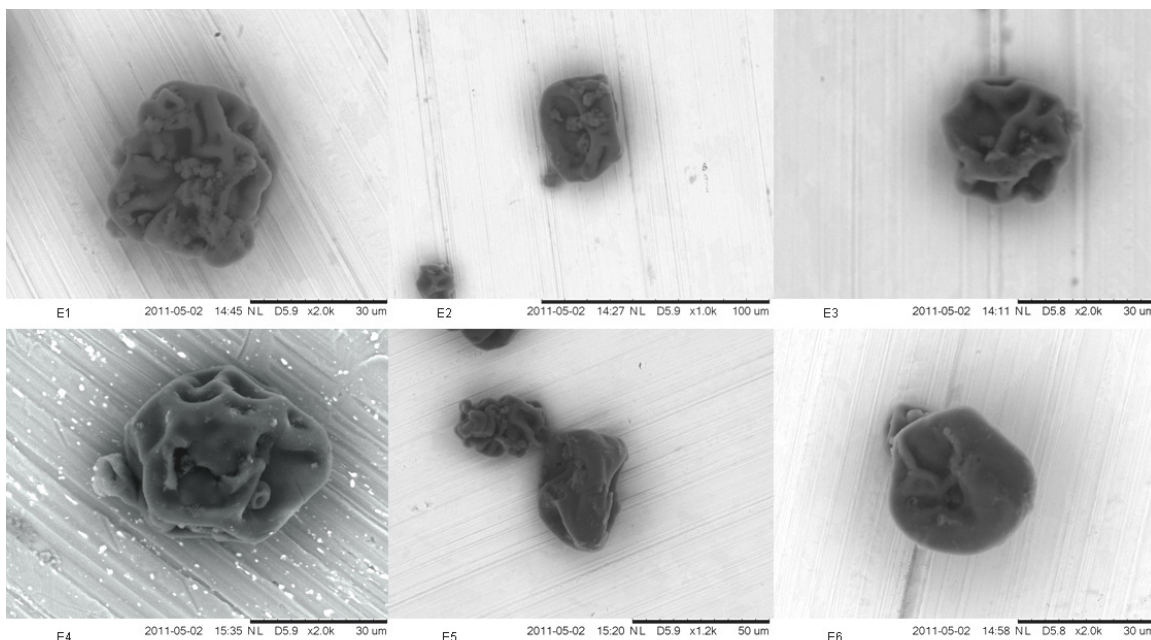
366 **Table 1.** Process yield and encapsulation efficiency, free and encapsulated fatty matter contents and mean particle size of
 367 the microcapsules obtained by enzymatic gelation according to the process variables

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



372

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

375 Where: EG1 = 0% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG2 = 2.5% of FOEE,
 376 11000 RPM, 5% of SPI, 3% of Span 80; EG3 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span
 377 80; EG4 = 5% of FOEE, 24000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG5 = 5% of FOEE, 11000
 378 RPM, 10% of SPI, 5% of Span 80; EG6 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 1% of Span 80.

379 **3.4 Size distribution and mean size of the microcapsules**

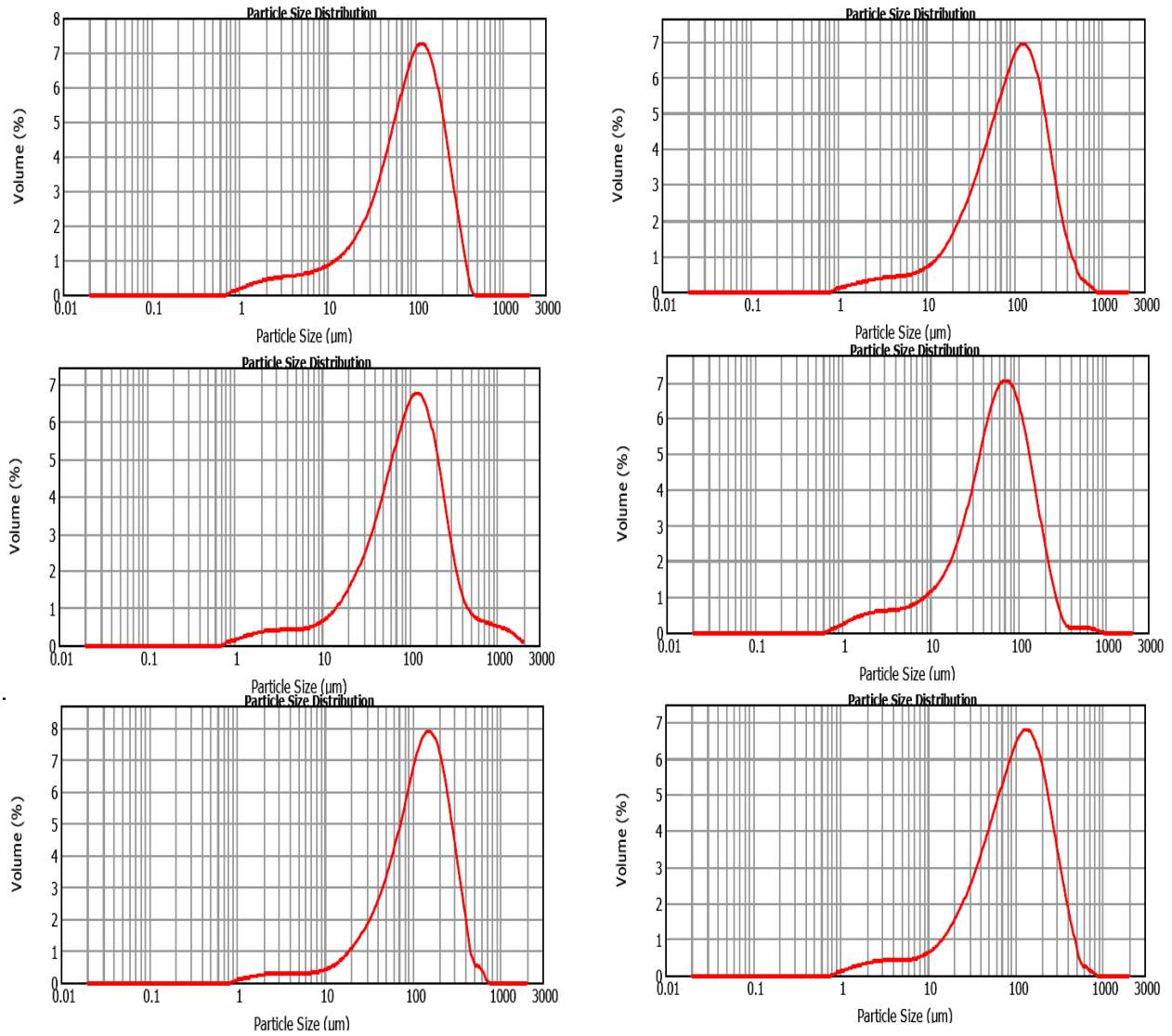
380 The particle size distribution followed a unimodal distribution, with a
381 tendency to normality in all the trials, as shown in Figure 2.

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

390

391 **3.5 Extraction of the encapsulated fatty matter**

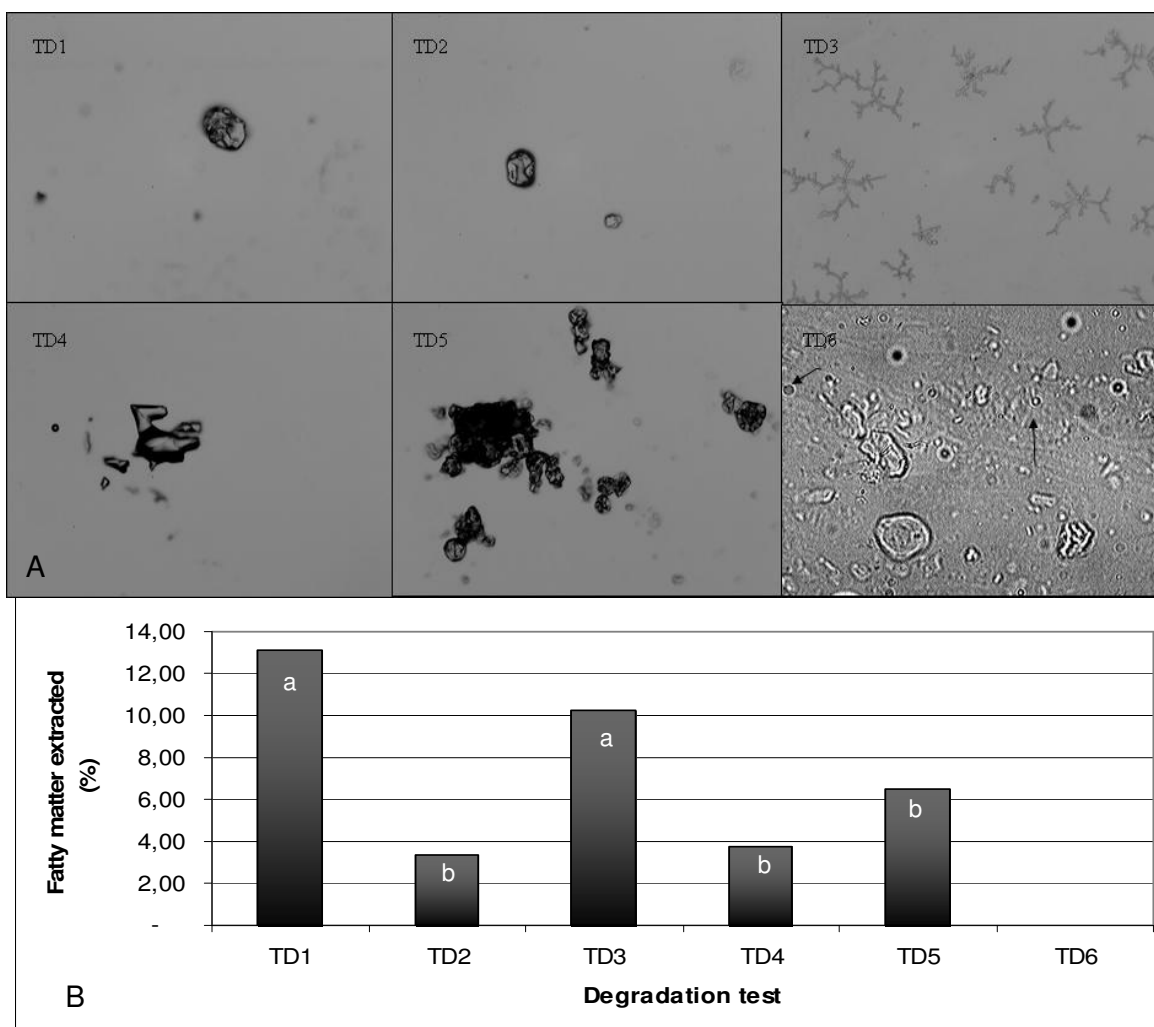
392 Figure 3A shows the effect of each extraction method tested, as shown by
393 optical microscopy. It can be seen that only TD3 showed complete degradation of
394 the wall material, and TD4 and TD6 showed partial degradation, the latter with the
395 visible presence of free oil (indicated by arrows).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



400
 401 **Figure 2.** Size distribution of the particles obtained by enzymatic gelation and
 402 freeze-dried

403 Where: EG1 = 0% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG2 = 2.5% of FOEE,
 404 11000 RPM, 5% of SPI, 3% of Span 80; EG3 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span
 405 80; EG4 = 5% of FOEE, 24000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG5 = 5% of FOEE, 11000
 406 RPM, 10% of SPI, 5% of Span 80; EG6 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 1% of Span 80.

407



408

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

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

414

415 The values obtained for the encapsulated fatty matter extracted by TD1
416 (alkaline degradation) and TD3 (acid degradation) did not differ statistically ($p >$
417 0.05), and the values obtained by the other methods varied from these two ($p \leq$
418 0.05) but not from each other (Figure 3B).

419 Although acid degradation (TD3) presented elevated values for the
420 extraction of the encapsulated material and total degradation of the microcapsule
421 walls, it can not be used for the steps of evaluating the encapsulated material,
422 since this method degrades the internal fatty matter, a fact proven by the presence
423 of methyl esters of very short chain fatty acids in the fatty acid composition
424 analysis. However, this method is more indicated for analyses such as
425 encapsulation efficiency. The method of alkaline enzymatic degradation method
426 (TD4) showed less damage to the fatty acid structure and recovery of the
427 encapsulated fatty matter, and can therefore be used for the analyses described in
428 2.2.7.1 and 2.2.7.2. The acid degradation method with direct determination of the
429 fatty acids maintained the fatty acids present unaltered, and is therefore
430 recommended for the analysis described in 2.2.7.3.

431

432 **3.6 Constitution of the encapsulated and free fatty matter**

433 **3.6.1 High performance size-exclusion chromatography of the lipid group** 434 **constituents (HPSEC)**

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

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

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

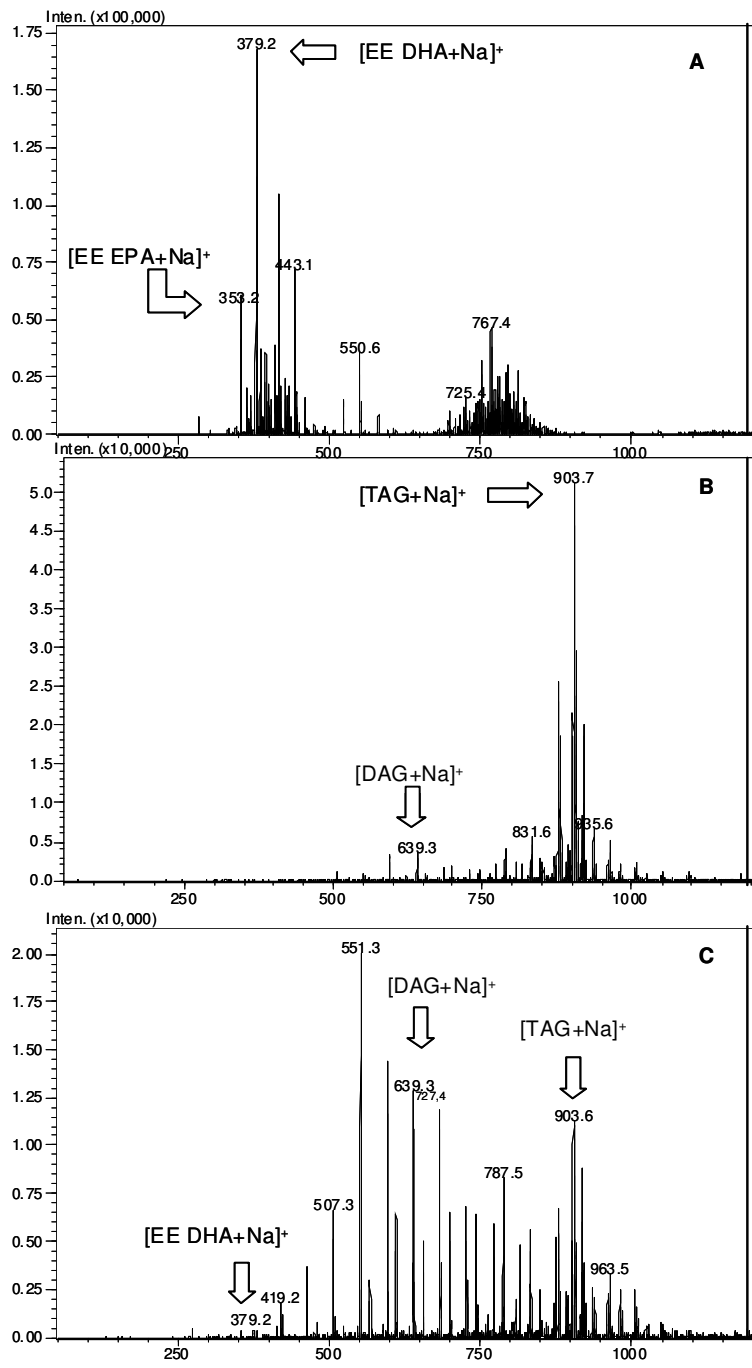
444

445 **3.6.2 Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS)**

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

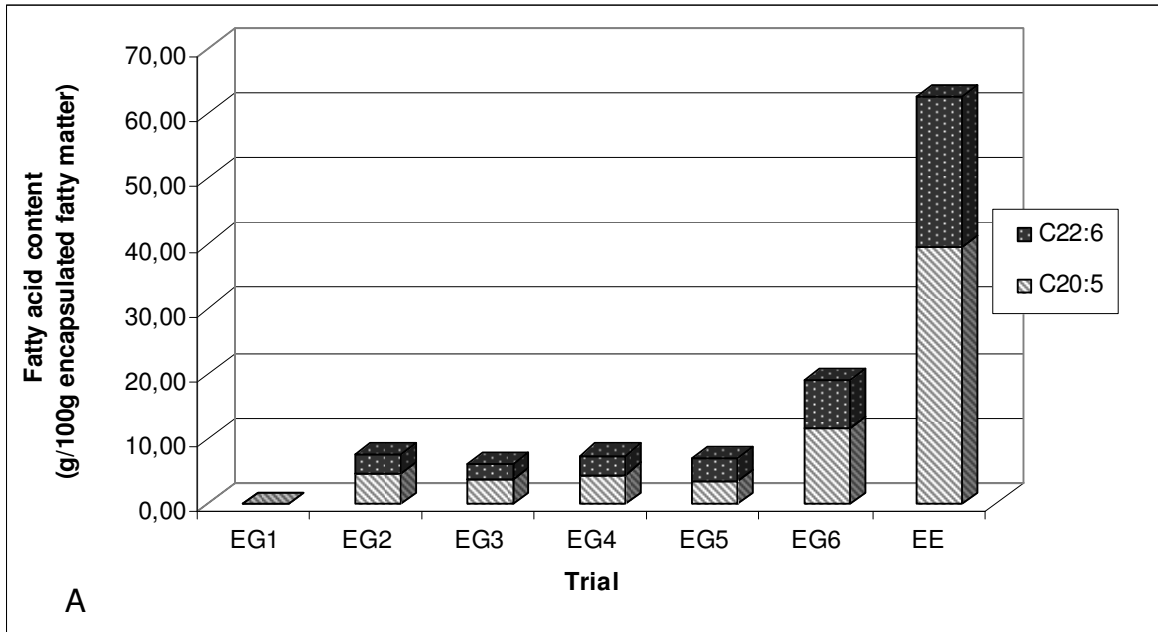
452 Peaks of the ethyl esters $[EE + Na]^+$ of EPA (m/z 353) and of DHA (m/z 379)
453 were identified in Figure 4 A. According to Simas et al. (2010), the main
454 triacylglycerol peaks identified in EG1 (B) were PLL (C52:4, m/z 877), PLO (C52:3,
455 m/z 879), POO (C52:2, m/z 881), LLL or OLLn (C54:6, m/z 901), OLL or OOLn
456 (C54:5, m/z 903), OOL (C54:4, m/z 905) and the presence of oxidation products
457 $[TAG + OOH + Na]^+$ m/z 935 (OLL), where: O = oleic acid, L = linoleic acid, Ln =
458 linolenic acid and P = palmitic acid. These data can be confirmed together with the
459 results obtained for the fatty acid composition of EG1, presented in the next item.

460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477

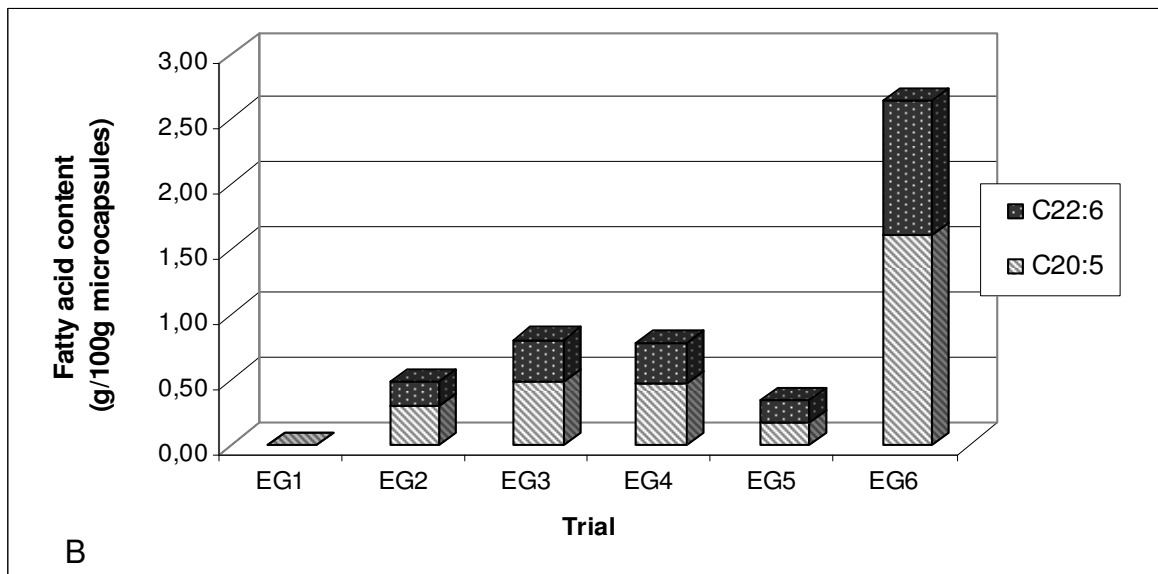


478 **Figure 4.** EASI(+)-MS from the samples of the original raw material (ethyl ester –
479 A), EG1 (B) and EG4 (C) showing the the Triacylglycerols (TG), diacylglycerols
480 (DG), EPA ethyl esters (EE EPA), DHA ethyl esters (EE DHA), and dimmers.

481 Where: EG1 = 0% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; and EG4 = 5% of FOEE,
482 24000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80.



483



484

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

488 Where: EG1 = 0% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG2 = 2.5% of FOEE,
 489 11000 RPM, 5% of SPI, 3% of Span 80; EG3 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span
 490 80; EG4 = 5% of FOEE, 24000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG5 = 5% of FOEE, 11000
 491 RPM, 10% of SPI, 5% of Span 80; EG6 = 5% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 1% of Span 80.

492 **3.6.3 Determination of the fatty acid constituents by gas chromatography**
493 **(CG)**

494 In the gas chromatographic analysis of the fatty acids, the values for EPA
495 and DHA in the samples after extraction were much lower than expected, since the
496 FOEE presented a total of 61.56% for EPA + DHA, whereas values with a
497 maximum of 18.82% (Figure 5a) were found after extraction. Moura et al. (2006)
498 found a value of 34.87% for EPA + DPA + DHA in fish oil ethyl esters, as well as a
499 relevant increase in the values for the principal fatty acids found in corn oil, such as
500 oleic acid (C18:1): from 10.27% in the FOEE to 31,95% (EG2), 31.54% (EG3),
501 29.70% (EG4), 25.24% (EG5) and 24.33% (EG6); and linoleic acid (C18:2): from
502 0.99% in the FOEE to 42.68% (EG2), 40.97% (EG3), 30.97% (EG4), 23.15%
503 (EG5) and 24.97% (EG6). These data also prove the presence of corn oil on the
504 inside of the microcapsules.

505

506 **3.7 The encapsulated fatty matter and FOEE contents**

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

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

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

521 On the basis of the whole microcapsules produced with 5% FOEE at 11000
522 rpm with 10% SPI and 1% Span 80 (EG6), these also showed the highest values
523 for EPA (1.62 g / 100 g microcapsules) and DHA (1.02 g / 100 g microcapsules),
524 giving a total of 2.64 g omega-3 fatty acids / 100 g microcapsules. Thus, according
525 to the Brazilian National Agency for Sanitary Vigilance (ANVISA, 2008), 3.79 g of
526 the microcapsules would be required per portion or in 100 g or 100 mL of food, in
527 order to warrant the appeal of being a functional food, since, according to the
528 legislation, a food must contain at least 0.1 g EPA and/or DHA per portion or per
529 100 g or 100 mL, to permit this allegation (ANVISA, 2009).

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

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

544

545 **4 CONCLUSIONS**

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

552 The presence of triacylglycerols inside the microcapsules was proven
553 indicating that corn oil from the second emulsion was encapsulated. For the
554 microcapsules produced with 5% FOEE at 11,000 rpm with 10% SPI and 1% Span
555 80 (EG6), 3.79 g of microcapsules would be required per portion or in 100 g or 100
556 mL of food for the product to warrant the appeal of having a functional property,
557 based on the regulation of the National Agency for Sanitary Vigilance (ANVISA,
558 2008), Brazil.

559

560 **5 ACKNOWLEDGEMENTS**

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

565

566 **6 REFERENCES**

567 Alberici, R.M., Simas, R.C., Sanvido, G. B., Romão, W., Lalli, P. M., Benassi, M.,
568 Cunha, I. B. S., & Eberlin, M. N. (2010). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*,
569 *398*, 265-294.

570

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

573

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

577

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

580

581 Arshady, R. (1990). Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing
582 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

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

706

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

710

711 Velasco, J., Dobarganes, M. C., & Márquez-Ruiz, G. (2000). Oxidation of free and
712 encapsulated oil fractions in dried microencapsulated fish oil. *Grasas y Aceites*, *51*,
713 439-446.

714

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

717

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

721

722 **Figure Captions**

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

725 Where: EG1 = 0% of FOEE, 11000 RPM, 10% of SPI, 3% of Span 80; EG2 = 2.5%
726 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

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.

27 **1 INTRODUCTION**

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

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

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

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

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

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

73 between glutamine and lysine residues, and its efficiency in forming cross links
74 depends on the molecular structure of the protein (Griffin, Casadio & Bergamini,
75 2002; Chambi & Grosso, 2006).

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

82

83 **2 MATERIAL AND METHODS**

84 **2.1 Materials**

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

90

91 **2.2 Methods**

92 **2.2.1 Microcapsule production**

93 In order to produce the multinucleated microcapsules by complex
94 coacervation, the conditions were pre-determined in relation to the raw materials
95 and process according to Table 1. The processing steps are described below, the
96 processing parameters being adapted from those of Jun-Xia, Hai-Yan & Jian
97 (2011).

98

99 1 – The soy protein isolate was added to 70 mL deionized water to give the
100 concentration determined by the experimental design (Table 1) and stirred in an
101 ultrasound bath for 10 minutes for dissolution.

102 2 – The first emulsion was made with the core material (FOEE) and dissolved soy
103 protein isolate in an Ultra-turrax homogenizer (IKA-Werke Ultra-turrax model T18
104 basic, Germany), with agitation at 20,000 rpm for 1 minute.

105 3 – 50 mL of a 7% solution of gum Arabic was then added to the emulsion, the
106 volume completed to 150 mL with deionized water, and the mixture heated at 45°C
107 with magnetic stirring.

108 4 – As indicated by Jun-Xia, Hai-Yan & Jian (2011), the pH was adjusted to the
109 coacervation pH (4.0) by adding 0.5M and 0.1M HCl solutions with magnetic
110 stirring.

111 5 – The coacervation system was cooled in an ice bath to 10°C with magnetic
112 stirring, in approximately 3 hours.

113 6 – The reticulation process was carried out by adding the enzyme TG to the
114 system, dissolved in 100 mL deionized water at the concentration described in the
115 experimental design (Table 1), maintaining the system at 10°C for 20 h in a BOD
116 chamber (Eletrolab, Brazil).

117 7 – The microcapsules were washed three times with deionized water and once
118 with ethanol, filtering through Whatman qualitative filter paper nº4 (porosity 20 µm).

119 8 – The microcapsules were dried in a Pirani 50 freeze dryer (Edwards,
120 USA), where the temperature was lowered to -40°C under a pressure of 0.1 mmHg
121 for 24 h.

122

123 **2.2.2 Process yield and encapsulation efficiency**

124 The process yield was determined using equation 1:

$$125 \quad \% \text{ Yield} = \frac{\text{Mass of the freeze dried microcapsules (dwb)} \times 100}{126 \quad \text{Initial mass of the polymers and core material (dwb)}} \quad (1)$$

127 The encapsulation efficiency was obtained after acid degradation of the
128 capsules by adding 0.2 g of sample to 4.5 mL boiling deionized water plus 5.5 mL
129 8 M HCl, and leaving in a boiling water bath for 30 minutes (until complete
130 degradation of the wall material). The mixture was then filtered and washed with 10
131 mL boiling deionized water. The filter paper with the hydrolyzed sample was dried

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

$$136 \quad \% \text{ Encap. efficiency} = \frac{(\text{Total lipid content} - \text{free EE content}) \times 100}{\text{Total lipid content}} \quad (2)$$

137

138 **2.2.3 Morphology of the microcapsules**

139 The morphology of the microcapsules was determined using a model TM
140 3000 high vacuum scanning electronic microscope (SEM) (Hitachi, Japan), with a
141 magnitude of x15 to x3000 (digital zoom 2, x4) and accelerating voltage of 15 kV
142 (Analy mode). A high sensitivity BSE detector of the semi-conductor was used with
143 a turbomolecular pump: 30L/sx1 units, diaphragm pump. The samples were
144 arranged on aluminum stubs containing a double-faced copper tape to secure the
145 material. The best fields were selected, where the microcapsules were isolated.

146

147 **2.2.4 Extraction of free FOEE**

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

150 To determine the free oil, 0.8 g of microcapsules were added to 20 mL of
151 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.

154

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.

160

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

173 24 cm/sec; detector temperature of 280°C; injector temperature of 250°C; oven
174 temperature of 110°C-5min / 110-215°C – 5°C/min / 215°C = 34 min; stripping gas:
175 helium; volume injected 1.0 µL; split 1:50.

176

177 **2.2.7 Amount of n-3 encapsulated**

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

182

183 **2.2.8 Statistical analysis**

184 The evaluation of the effects of different concentrations of wall material
185 (SPI:GA – x_2), core material (wall:core – x_2) and reticulating agent (TG – x_3) on the
186 characteristics of the FOEE microcapsules, was carried out using the STATISTICA
187 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) software, verifying the possibility of analyzing
188 the results by response surface methodology. The same program was used for the
189 means comparison test (verifying differences between trials 19 and 20) by the
190 analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test, at a significance level of 95% ($p \leq$
191 0.05).

192

193 **3 RESULTS AND DISCUSSION**

194 **3.1 Process yield and encapsulation efficiency**

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

198 Equation 3 shows the complete regression model ($R^2 = 0.92$; $F_{calc}/F_{tab} =$
199 2.98) obtained for the process yield. Based on the coefficient of determination (R^2),
200 the regression model explained 92% of the responses.

201 $EY = y_i = 47.56 - 3.91 x_1 - 1.72 x_1^2 - 2.91 x_2 - 1.22 x_2^2 + 0.11 x_3 - 0.43 x_3^2 + 1.21$
202 $x_1x_2 - 0.48 x_1x_3 - 0.68 x_2x_3$ (3)
203
204

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

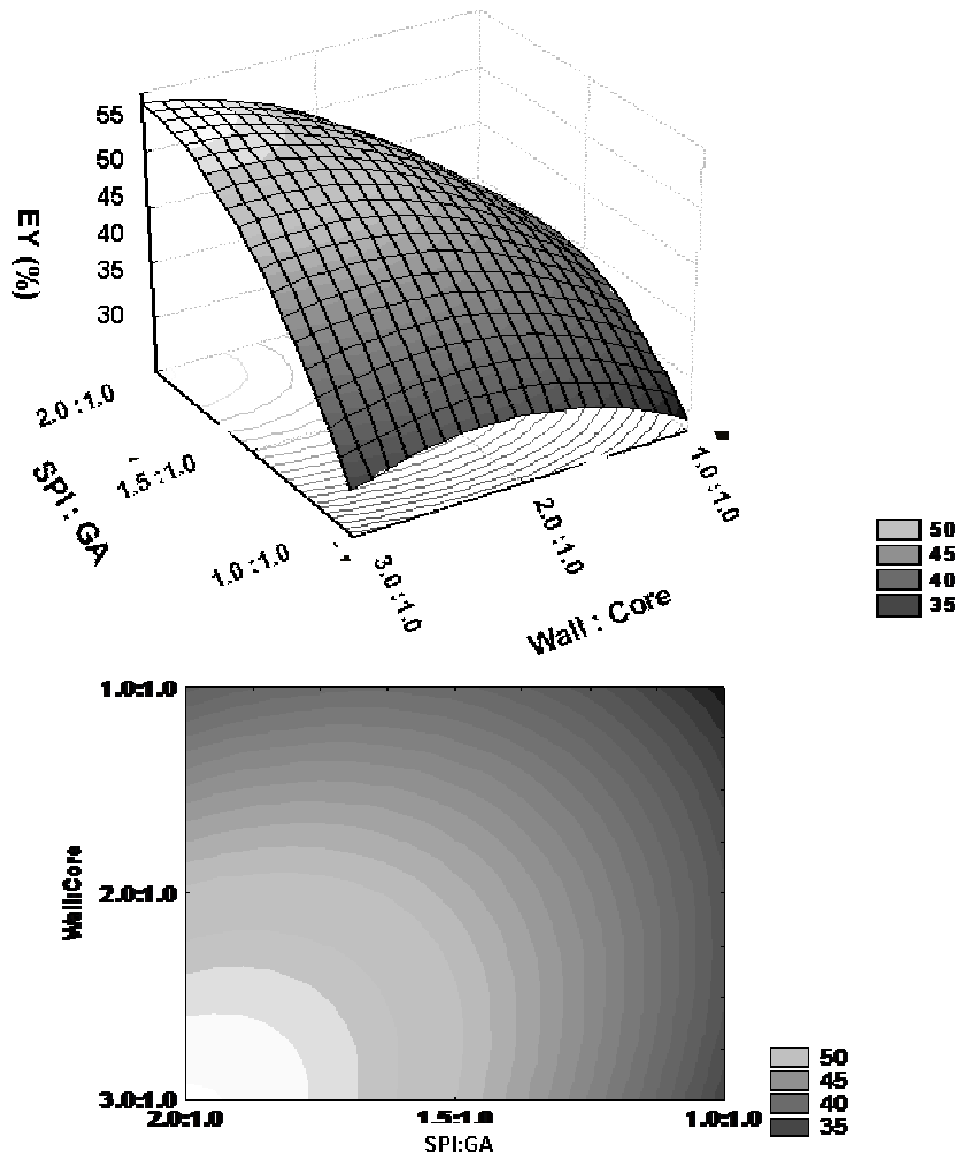
217 obtained at concentrations of 1.0:1.0 of wall material:core material, and when they
218 increased the concentration of core material, the yield declined.

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

230 The analyses of the effects of the concentration of the wall materials
231 (SPI:GA), the wall material to core material ratio (wall:core) and the TG
232 concentration on the encapsulation efficiency, failed to present acceptable
233 regression coefficients ($R^2 < 55\%$) for obtaining mathematical models considering
234 the independent variables under study, even though the repeatability of the results
235 was proven by the central point trials (C15, C16, C17 and C18 – 1.5:1.0 SPI:GA;
236 2.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g), which did not present statistical differences
237 between them ($p > 0.05$).

238

239



240
 241
 242
 243
 244

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

245 **Table 1.** Matrix of the experimental design for the variables of SPI:GA, core material and TG concentration in the
 246 production of omega-3 fatty acid ethyl ester microcapsules by complex coacervation, with the respective results for
 247 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

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

249 ^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
 250 Tukey's test.

251 ^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
 252 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% ($p \leq 0.05$)

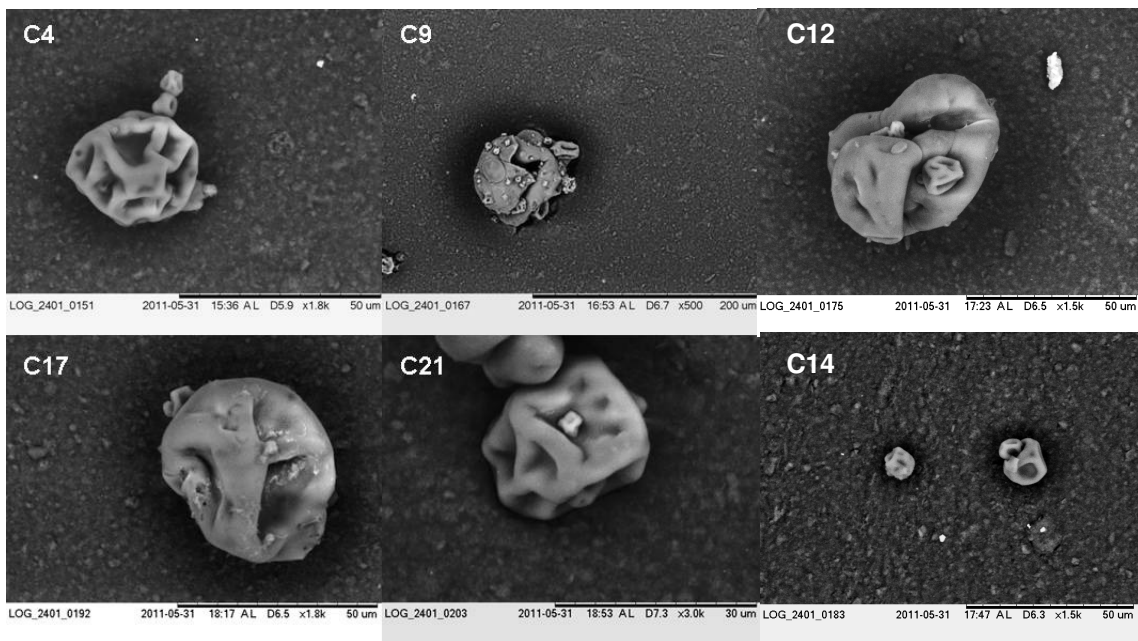
257 In the comparison of the experimental trials with the control trials (C19 –
258 without core material; C20 – without TG), the trial C14 (1.5:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0
259 wall:core; 10 UA/g TG) showed the highest encapsulation efficiency of
260 approximately 70%, differing statistically from the others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

265

266 **3.2 Microcapsule morphology**

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

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



276

277

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

280 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
 281 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
 282 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
 283 TG/g; C20 = 1.0:1.0 SPI:GA; 2.0:1.0 wall:core; 0 UA of TG/g.

284

285

286 **3.3 Free FOEE content**

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

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

297 Lamprecht, Schäfer & Lehr (2001) obtained different results for free FOEE
298 after reticulation with different chemical agents and by spray drying, varying from
299 4.3 to 28.2%. Davidov-Pardo et al. (2008), working with soy protein isolate by the
300 enzyme jellification process obtained values above 5% for free fish oil.

301

302 **3.4 Microcapsule size distribution and mean size**

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

308 proven by the central point trials (C15, C16, C17 and C18 – 1.5:1.0 SPI:GA;
309 2.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g), which did not present statistical differences
310 between them ($p > 0.05$). The values obtained for the mean particle size can be
311 seen in Table 1.

312 In the present study, particle sizes between 12.2 μm (minimum diameter)
313 and 235.9 μm (maximum diameter) were found, and mean values varying between
314 44 and 56 μm , the control trials (C19 and C20) being situated within this range.

315 The size of microparticles produced by complex coacervation using the
316 polymer pair of gelatin and gum Arabic is affected by many parameters, such as
317 the stirring rate, solution viscosity, core/polymer ratio, amount of water, etc. (Inoue,
318 Kawai, Kanbe, Saeki & Shimoda, 2002). According to Mascarenhas (2010), a
319 reduced relative dispersion of the particle size can be noted when the
320 microcapsules are produced under controlled conditions, when compared to those
321 produced in the ice bath, that is, controlling the cooling rate resulted in particles
322 with greater uniformity of size amongst them. However, according to Mukai-Correa
323 (2003), the particles produced by complex coacervation can vary from 1 to 500 μm .
324 The variation in mean particle size obtained in this study could possibly be
325 explained by small differences in the cooling temperature during the production
326 process, and by variations in the concentrations of the polymers and core material
327 used, altering the viscosity of the dispersions.

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

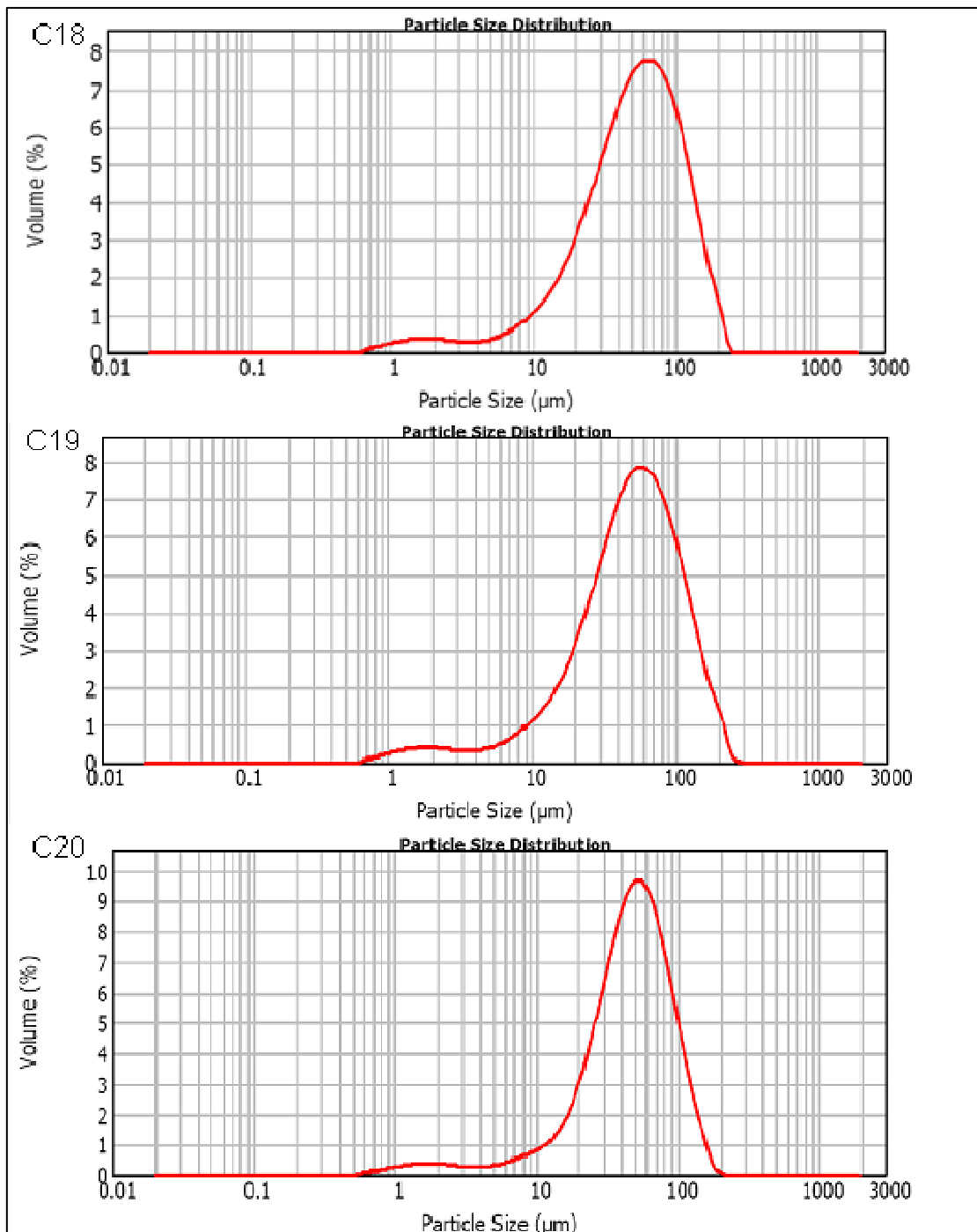
331 result of 7.57 μm for microcapsules produced with SPI:GA by coacervation. These
332 differences could be justified by the different process conditions used by each
333 author, principally the stirring velocities used (6000 rpm / 5 minutes). Many studies
334 have shown that the greater the stirring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

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

341

342 **3.5 Constitution of the FOEE**

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



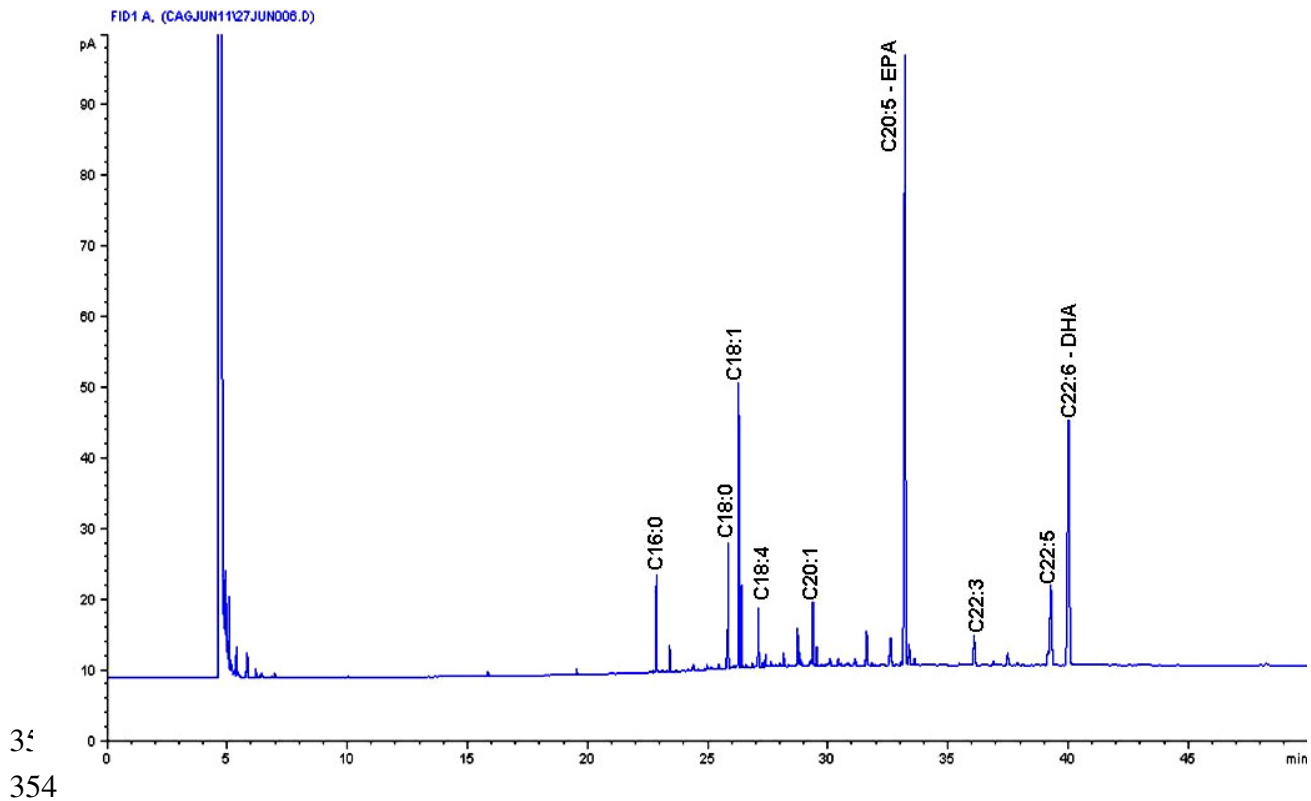
347

348

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

351 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

352 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.



34
354

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

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

361

362 **3.6 Amount of n-3 in the microcapsules**

363 The analyses of the effects of the concentration of the wall materials
364 (SPI:GA), the wall material to core material ratio (wall:core) and the TG
365 concentration on the amount of n-3 in the microcapsules, failed to present
366 acceptable regression coefficients ($R^2 < 70\%$) for obtaining mathematical models
367 considering the independent variables under study. Table 1 shows the final values
368 obtained for omega-3 (EPA + DHA) in each trial, and it can be seen that trial C12
369 (1.5:1.0 SPI:GA; 1.0:1.0 wall:core; 6.0 UA of TG/g) presented approximately 25 g
370 of EPA + DHA in 100 g of microcapsules, followed by trial C14 (1.5:1.0 SPI:GA;
371 2.0:1.0 wall:core; 10.0 UA of TG/g), with 22.3 g of EPA + DHA in 100 g of
372 microcapsules. Thus based on the National Agency for Sanitary Vigilance (ANVISA
373 – BRASIL, 2009), one would need to add 0.40 g (C12) or 0.45 g (C 14) of
374 microcapsules to 100 g or 100 mL portions of food in order to consider that it had
375 the appeal of a functional property, since the regulation states that foods should
376 present a minimum of 0.1 g EPA and/or DHA per 100 g or 100 mL portion to allow
377 this allegation (ANVISA, 2009).

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

385 Organization (WHO), 1 to 2% of the calories coming from omega-3 fatty acids; in
386 2004, the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, ≥ 500
387 mg/day of EPA + DHA. In 2004, the Food and Drug Administration (FDA) of the
388 USA allowed the allegation of functional property for foods enriched with omega-3
389 fatty acids, although also suggesting that the consumption of EPA + DHA not
390 exceed 3 g/day due to possible adverse effects in the control of glycemia, increase
391 in bleeding time and of LDL-cholesterol.

392

393 **4 CONCLUSIONS**

394 The dependent variable of process yield allowed one to obtain a
395 representative model, which was inversely proportional to the concentration of core
396 material and directly proportional to the SPI:GA ratio. The trials carried out with
397 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
398 wall:core and 10.0 UA of TG/g presented approximately 25 g and 22 g of EPA +
399 DHA n 100 g of microcapsules, respectively. Thus it would be necessary to add 0.4
400 g or 0.45 g of microcapsules to 100 g or 100 mL portions of foods to consider the
401 food as having the appeal of a functional property according to the determinations
402 of the national Agency of Sanitary Vigilance (Brazil).

403

404 **5 ACKNOWLEDGEMENTS**

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

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

410

411 **6 REFERENCES**

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

414

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

417

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

421

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

424

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

429

430 Burgess, D.J., & Ponsart, S. (1998). b-gluconidase 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., Rocca, 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.

526 **Figure captions:**

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

529

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

532 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

533 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;

534 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=

535 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

536 wall:core; 0 UA of TG/g.

537

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

540 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

541 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

542 UA of TG/g.

543

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

546 Where: C16:0 = palmitic acid; C18:0 = stearic acid; C18:1 = oleic acid; C18:4 =

547 stearidonic acid; C20:1 = gadoleic acid; C20:5 = eicosapentanoic acid; C22:3 =

548 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

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

28

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

31

32 **1 INTRODUÇÃO**

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

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

44 2004). Segundo Ma, Yu, Branford-White, Nie, Fan e Zhu (2009), a coacervação
45 complexa é um processo de separação de fases, produção de complexos
46 insolúveis, baseado na dissolução simultânea de polieletrólitos de cargas opostas
47 induzida por mudanças do meio, atingindo um equilíbrio estequiométrico.
48 Normalmente os dois biopolímeros utilizados incluem uma molécula protéica e
49 uma molécula de polissacarídeo (Jun-Xia, Hai-Yan & Jian, 2011).

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

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

67 em $m^2/V.s$. Através de equação matemática esse valor se transforma em potencial
68 zeta. Aparelhos de concepção mais moderna usam um laser modulado e medem
69 o deslocamento *doppler* na luz espalhada pelas partículas (Hobeco, 2004).

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

75

76 **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

77 **2.1 Materiais**

78 Éster etílico de óleo de peixe – (EE) - (62% de EPA + DHA, Vital Atman,
79 Uchoa, SP), isolado protéico de soja – (IPS) - (The Solae Company, Esteio, RS,
80 88% proteína b.u.), goma arábica Instatgum AA – (GA) - (Acácia Senegal – CNI
81 Colloides Naturais Brasil Comercial Ltda, São Paulo, SP), Transglutaminase Activa
82 TG-S® - (TG) - (Ajinomoto, Limeira, SP).

83

84 **2.2 Métodos**

85 **2.2.1 Determinação do potencial zeta**

86 Para a determinação do potencial zeta das suspensões de IPS, GA e EE
87 separadamente e em conjunto formando dispersões, baseando-se em proporções
88 sugeridas em estudos anteriores (P1 = 1,0:0,0 IPS:GA e 2,0:1,0 parede:recheio;
89 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
90 parede:recheio; P4 = 1,8:1,0 IPS:GA e 2,6:1,0 parede:recheio), foi utilizado Zeta
91 Sizer Nano Series Nano ZS – Malvern Instruments (Inglaterra), com pH variando
92 de 7,0 a 3,0. Estas relações foram utilizadas para a produção das dispersões e
93 seguiram o processo de produção que foi realizado até a etapa 3 do item 2.2.3.
94 Devido limitações operacionais do equipamento, fez-se necessária a diluição das
95 misturas em água deionizada, a 45 °C, até a faixa de detecção do equipamento,
96 sendo uma alíquota de 0,5 mL da dispersão e adição de água para se obter uma
97 concentração de 0,05% da mistura.

98

99 **2.2.2 Variáveis independentes testadas**

100 As variáveis independentes testadas para a produção das microcápsulas
101 estão expostas na Tabela 1, onde foram avaliados os efeitos da variação do pH,
102 conforme resultados obtidos por cálculos matemáticos na determinação do
103 potencial zeta (2.2.1) e diferentes concentrações dos materiais de parede
104 (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 ultrassom 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;

124 5 - O sistema coacervado foi resfriado em banho de gelo com agitação
125 magnética até 10°C, em aproximadamente 3 horas;

126 6 - O processo de reticulação foi feito adicionando-se 10 UA/g da enzima TG,
127 dissolvida em 100 mL de água deionizada ao sistema e mantido por 20h a
128 temperatura de 10 °C em BOD (Eletrolab, Brasil);

129 7 - Três lavagens com água deionizada e uma lavagem com etanol 97%
130 foram feitas e as microcápsulas foram filtradas em papel de filtro qualitativo
131 Whatman nº4 (porosidade 20 µm);

132 8 - As microcápsulas foram secas em liofilizador Pirani 50 (Edwards, US), por
133 24h.

134

135 **2.2.4 Rendimento do processo e eficiência de encapsulação**

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

$$138 \quad \% \text{ Rendimento} = \frac{\text{Massa de microcápsulas liofilizadas (b.s.)} \times 100}{\text{Massa inicial de polímeros e recheio (b.s.)}} \quad (1)$$

139 A eficiência de encapsulação foi obtida após a degradação ácida das
140 cápsulas, onde 0,2 g de amostra foram adicionadas de 4,5 mL de água deionizada
141 fervente e 5,5 mL de ácido clorídrico 8 M e deixadas em banho-maria fervente por
142 30 minutos (até a degradação completa do material de parede). Posteriormente a

143 mistura foi filtrada e lavada com 10 mL de água deionizada fervente. O papel de
144 filtro com as amostras hidrolisadas foram secas em estufa e colocadas para
145 extração segundo a metodologia de determinação de teor de óleo da AOCS Ac 3-
146 44 (2009), para alimentos ricos em proteínas. A eficiência de encapsulação foi
147 determinada segundo a equação (2), conforme descrito por Davidov-Pardo,
148 Roccia, Salgado, León e Pedroza-Islas (2008).

149

$$150 \quad \% \text{ Eficiência de Encapsulação} = \frac{(\text{Total de lipídios} - \text{EE superficial}) \times 100}{\text{Total de lipídios}} \quad (2)$$

151

152 **2.2.4 Teor de EE superficial**

153 Os procedimentos para extração do material superficial seguiram a
154 metodologia descrita por Velasco, Dobarganes e Márquez-Ruiz (2000), com
155 algumas adaptações na escala.

156 Para a determinação do óleo livre, 0,8 g de microcápsulas foram
157 adicionadas de 20 mL de éter de petróleo e agitadas por 15 minutos a 25 °C.
158 Posteriormente, as microcápsulas foram filtradas em Na₂SO₄ anidro, o solvente foi
159 evaporado e as amostras secas com nitrogênio.

160

161 **2.2.5 Morfologia das microcápsulas**

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

170

171 **2.2.6 Distribuição de tamanho e tamanho médio das microcápsulas**

172 A determinação de tamanho médio e a distribuição de tamanho das
173 microcápsulas foram obtidas através do equipamento Mastersizer 2000 (Malvern
174 Instrument LTDA, Worcestershire, UK). Foram realizadas três leituras, com três
175 repetições totalizando nove avaliações, sob agitação de 3500 rpm e 25% de
176 ultrassom para dispersão das microcápsulas.

177

178 **2.2.7 Teor de ômega-3**

179 Para a determinação do teor de ômega-3 foram utilizados os resultados do
180 teor lipídico médio total das microcápsulas obtido pela determinação da eficiência

181 de encapsulação (2.2.2) multiplicado pela concentração de EPA + DHA observado
182 na composição em ácidos graxos. Tal composição foi determinada conforme
183 metodologia descrita por Ruben e Barclay (1999). Três amostras (300 mg) foram
184 pesadas em tubos tarados de 50 mL e adicionadas de 4 mL de solução de
185 metanol contendo ácido sulfúrico (4%), sendo a mistura agitada em vórtex por
186 15 s. Em seguida as misturas foram inertizadas com nitrogênio gasoso e agitadas
187 novamente. Por uma hora as amostras foram deixadas em bloco digestor a 110 °C
188 sob agitação a cada 20 minutos. Após este período as amostras foram resfriadas
189 a temperatura ambiente, adicionadas de 1 mL de água deionizada e 1 mL de
190 hexano, agitadas por 20 segundos e centrifugadas a 1000 g por 3 minutos. O
191 sobrenadante das amostras foi utilizado para a composição em ácidos graxos.

192 O éster metílico do ácido graxo serviu para a determinação da composição
193 em ácidos graxos realizada em Cromatógrafo Gasoso Capilar – CGC Agilent 6850
194 Series GC System. Coluna Capilar: DB-23 Agilent (50% cyanopropyl) –
195 methylpolysiloxane, dimensões 60 m, diâmetro interno 0,25 mm, filme 0,25 mm.
196 Condições de operação do cromatógrafo: fluxo coluna = 1,0 ml/min; velocidade
197 linear 24 cm/seg; temperatura do detector 280 °C; temperatura do injetor 250 °C;
198 temperatura forno 110 °C-5 min / 110-215 °C – 5 °C/min / 215 °C = 34 min; Gás de
199 arraste: Hélio; volume injetado 1,0 µL; split 1:50.

200

201 **2.2.8 Análise estatística**

202 Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos
203 foram submetidos à análise estatística utilizando-se a análise de variância
204 (ANOVA) para verificar os efeitos das variáveis independentes, com suas
205 interações e análise de diferença de médias por Teste de Tukey, empregando-se
206 o software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA), com nível de
207 significância de 95% ($p < 0,05$).

208

209 **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

210 **3.1 Potencial zeta**

211 Na Figura 1 estão expostas as curvas do potencial zeta obtidas para o
212 material de recheio e biopolímeros estudados isoladamente. Para cada reta se
213 obteve o modelo matemático mais adequado ($R^2 > 0,95$), tais modelos seguem
214 nas Equações 1, 2 e 3.

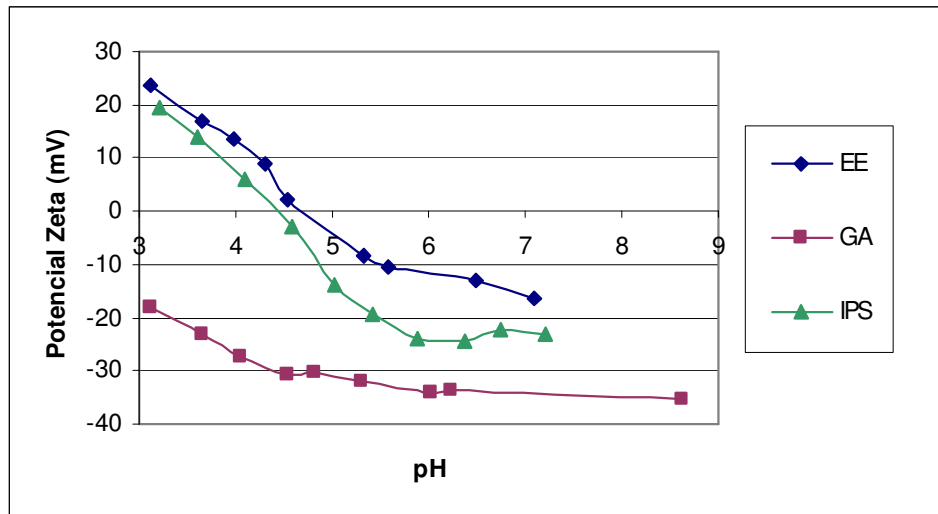
$$215 \quad y_{(EE)} = 2,1582x^2 - 32,779x + 107,35 \quad (1)$$

$$216 \quad y_{(IPS)} = 3,6091x^2 - 49,25x + 143,65 \quad (2)$$

$$217 \quad y_{(GA)} = 0,9285x^2 - 13,679x + 14,127 \quad (3)$$

218

219 A curva obtida para IPS assemelha-se a dados encontrados na literatura,
220 onde o valor do potencial zeta atinge o valor zero entre pH 4,4 e 4,6 (Lam, Shen,
221 Paulsen & Corredig, 2007; Jaramillo, Roberts & Coupland, 2011).



222

223 **Figura 1.** Gráficos dos potenciais zeta para soluções de goma arábica (GA), éster
224 etílico de óleo de peixe (EE) e isolado protéico de soja (IPS).

225 Com base nos cálculos matemáticos, considerando as três equações
226 anteriores se determinou o pH em que a densidade de cargas dos dois
227 biopolímeros e o material de recheio ficam estequiometricamente balanceadas
228 para cada proporção testada (P1 = 1,0:0,0 IPS:GA e 2,0:1,0 parede:recheio; P2 =
229 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
230 parede:recheio; P4 = 1,8:1,0 IPS:GA e 2,6:1,0 parede:recheio). Estes valores
231 obtidos receberam a codificação Z seguidos de número correspondente para
232 etapas posteriores de produção e caracterização das microcápsulas (Tabela 1).

233 A Figura 2 apresenta os resultados do comportamento eletrocinético de
234 dispersões contendo IPS e EE (P1) e IPS, GA, e EE em diferentes concentrações
235 (P2, P3 e P4). Nesta se pode observar que apenas o ensaio P1 (IPS:EE = 2:1)
236 atingiu o potencial zeta zero, em valor próximo ao estimado pelos modelos
237 anteriores (4,4 na mistura e 4,5 pela análises dos materiais isolados), sendo
238 necessário ajustar modelos matemáticos preditivos para os demais ensaios.

239 Segundo Jun-Xia, Hai-Yan e Jian (2011), o pH 4,0 foi ponto elétrico
240 equivalente para sistemas formados pelos biopolímeros IPS:GA na concentração
241 1:1, encapsulando óleo essencial de laranja, sendo este o possível pH em que a
242 densidade de cargas dos dois biopolímeros ficam estequiometricamente
243 balanceadas, porém esta determinação foi baseada no rendimento do proceso e
244 absorbância do sobrenadante observados em uma faixa de pH entre 2,5 e 4,5.
245 Para o ensaio testado nas mesmas condições, entretanto com éster etílico de óleo
246 de peixe (Figura 2B), através do potencial zeta foram obtidos resultados de pH de

247 1,4, utilizando cálculos matemáticos aproximados. Entretanto considerando os
248 resultados da Figura 1 e equações 1, 2 e 3 este valor foi de 3,8. Tais diferenças
249 possivelmente são explicadas pela interação das cargas dos compostos testados
250 e para certificação dos resultados teóricos se seguiu para a verificação das
251 características das microcápsulas formadas em ambos os pH (1,4 – M2 e 3,8 –
252 Z2).

253 Nas Figuras 2C e 2D (P3 e P4) observam-se comportamentos diferenciados
254 com a alteração do pH, apresentando um decréscimo nos valores do potencial
255 zeta até próximos a -40 com pH em torno de 5,5 e posterior elevação nos valores.
256 Ainda na Figura 2D, pode-se observar que no pH 6,5 ocorreu uma aproximação da
257 curva ao ponto de cargas zero, tornando-se este um valor para os testes das
258 microcápsulas.

259 Segundo Jaramillo, Roberts e Coupland (2011), o isolado protéico de soja é
260 uma mistura de proteínas e agregados protéicos, conseqüentemente a medida do
261 potencial zeta para esta é apenas um valor indicativo para estas, podendo
262 partículas individuais apresentarem valores diferentes de potencial zeta em
263 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

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

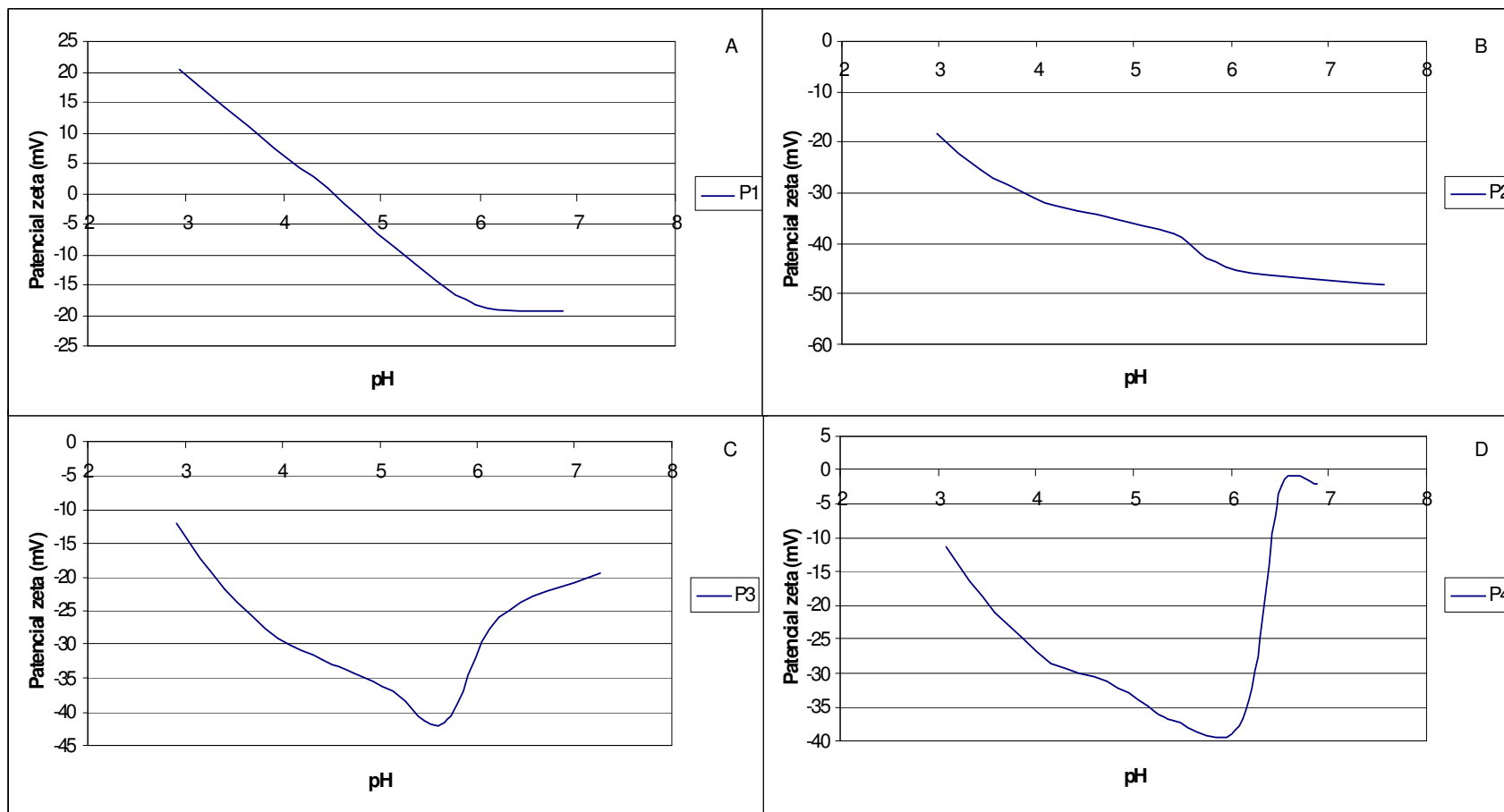


Figura 2. Gráficos dos potenciais zeta para as misturas de goma arábica, éster etílico de óleo de peixe e isolado protéico de soja.

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.

285 **3.2. Rendimento do processo e eficiência de encapsulação**

286 Na Tabela 1 estão expostos os valores de rendimento do processo e
287 eficiência de encapsulação obtidos. Nestes podem ser observados que os
288 rendimentos dos processos foram superiores nos ensaios onde não foram
289 adicionados goma arábica (Z1 e M1), com valores próximos a 90%, seguidos do
290 ensaio com 1,5:1,0 IPS:GA e 2:1 material de parede:material de recheio (M3), com
291 70% de rendimento do processo. Característica semelhante foi verificada
292 anteriormente, onde os melhores resultados de rendimento foram observados nas
293 maiores proporções de IPS em relação a GA. O menor valor de rendimento
294 observado foi para o ensaio que testou um pH ácido extremo (1,42), as perdas
295 podem ter ocorrido pela desnaturação dos biopolímeros testados e também pela
296 perda de atividade da enzima transglutaminase utilizada como agente reticulante.

297 Jun-Xia, Hai-Yan e Jian (2011), observaram valores máximos de
298 rendimento de encapsulação quando trabalharam utilizando apenas 10% de
299 material de recheio (óleo essencial de laranja) em relação ao material de parede
300 (SPI:AG), decaindo os valores com o aumento desta concentração. Lamprecht,
301 Schäfer e Lehr (2001), obtiveram resultados próximos a 90% de rendimento de
302 encapsulação para cápsulas de éster etílico de óleo de peixe encapsulado em
303 matriz de gelatina e GA por coacervação complexa, resultados obtidos em
304 concentrações de 1,0:1,0 de material de parede:material de recheio, porém
305 quando aumentaram a concentração do material de recheio, este resultado
306 decaiu.

307 As eficiências de encapsulação observadas diferiram estatisticamente entre
308 si ($p \leq 0,05$), variando de 22,2 (Z1) a 78,7% (M2). Os ensaios M2, Z5, M4 e M5
309 não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), entretanto se observou um
310 antagonismo entre os resultados de rendimento do processo e eficiência de
311 encapsulação.

312 Os baixos valores de rendimento do processo e eficiência de encapsulação
313 observados podem ser explicados pelo fato do IPS apresentar baixa solubilidade,
314 limitando sua aplicação em sistemas alimentícios, mesmo tendo se recorrido ao
315 uso de ultrassom para melhor solubilização da proteína (Mendanha, Molina-Ortiz,
316 Favaro-Trindade, Mauri, Monterrey- Quintero & Thomazini, 2009; Molina Ortiz et
317 al., 2009).

318

319 **3.3 Teor de EE superficial**

320 Na Tabela 1 estão expostos os valores de teor de EE superficial obtidos,
321 onde se observa diferença estatisticamente significativa entre os ensaios ($p \leq$
322 0,05).

323 Os ensaios Z1, M1 e M3 apresentaram valores superiores a 20% de EE
324 superficial, estes mesmos ensaios apresentaram elevados resultados de
325 rendimento do processo. Os ensaios Z4 (4,5%), M2 (3,9%) e M5 (6,12%)
326 apresentaram os menores valores de éster etílico de óleo de peixe livre.
327 Lamprecht, Schäfer e Lehr (2001), obtiveram diferentes resultados de EE

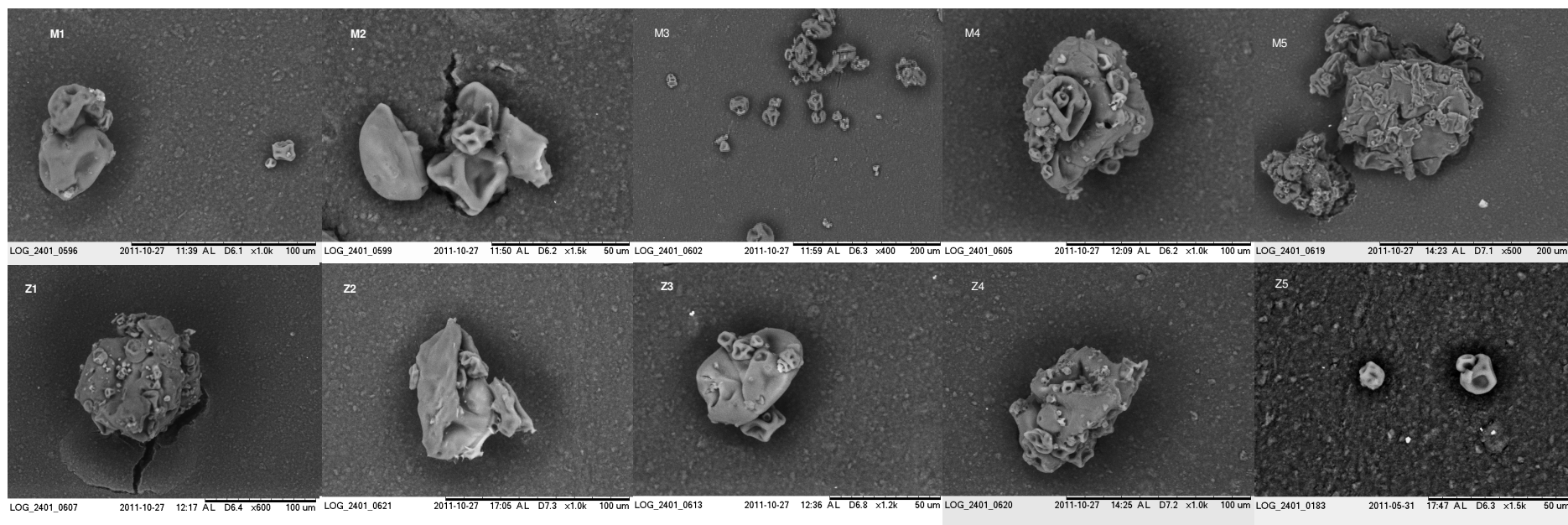
328 superficial após a etapa de reticulação com diferentes agentes químicos e por
329 *spray drying*, variando de 4,3 a 28,2%. Davidov-Pardo et al. (2008), trabalhando
330 com isolado protéico de soja pelo processo de gelificação enzimática encontraram
331 valores de óleo de peixe superficial superiores a 5%.

332

333 **3.4 Morfologia das microcápsulas**

334 A formação das microcápsulas de éster etílico de óleo de peixe foi
335 confirmada pela observação em MEV. Todos os ensaios apresentaram a mesma
336 conformação topográfica, com rugosidade acentuada e presença de
337 microcápsulas menores aderidas nas superfícies, sendo que estas características
338 podem ser observadas na Figura 3.

339 Jun-Xia, Hai-Yan e Jian (2011), obtiveram microcápsulas circulares com
340 pequenas ondulações e perceberam fissuras na superfície das cápsulas obtidas
341 com IPS e GA por processo semelhante ao utilizado neste trabalho. Tang e Li
342 (2012) também observaram a presença de rugosidades na superfície de
343 microcápsulas produzidas com isolado protéico de soja pelo processo de *spray*
344 *drying*, muito semelhantes às microcápsulas encontradas nesse trabalho, e
345 justificaram tal fato pelo encolhimento desigual da cápsula durante o processo de
346 secagem e/ou pelo elevado teor protéico da sua parede.



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.

354 **3.5 Distribuição de tamanho e tamanho médio das microcápsulas**

355 A distribuição do tamanho de partículas seguiu uma distribuição unimodal
356 com tendência à normalidade em todos os ensaios. Neste trabalho foram
357 observadas variações entre 12,2 μm (diâmetro mínimo) e 360,6 μm (diâmetro
358 máximo), e valores médios variando de 50,7 a 121,5 μm , sendo este valor elevado
359 encontrado no ensaio M5 (diferente estatisticamente dos demais, $p \leq 0,05$), cujo
360 pH utilizado foi de 6,4. Este fato pode ser explicado pelo fato de ser o único pH
361 considerado ideal para a atuação da enzima transglutaminase utilizada para a
362 reticulação das microcápsulas.

363 A transglutaminase (TG) (E.C. 2.3.2.13; R-glutamil-peptídeo: amina g-
364 glutamil transferase) catalisa reações de acil transferência, formando ligações
365 cruzadas intra e intermoleculares em proteínas, peptídeos e aminas primárias,
366 principalmente através de ligações covalentes entre resíduos de glutamina e lisina.
367 A enzima transglutaminase, obtida a partir de microorganismos apresenta uma
368 faixa ampla de pH para ação (4 - 9), sendo valor de ótima atividade entre pH 5 - 8
369 e temperatura de 40 °C (Aboumahmound & Savello, 1990; Folk & Finlayson, 1977;
370 Griffin, Casadio, & Bergamini, 2002; Ando, Adachi, Umeda, Matsuura, Nonaka,
371 Uchio, Tanaka & Motoki, 1989).

372

373 **3.6 Teor de ômega-3 encapsulados**

374 Na Tabela 1 estão apresentados os valores finais de ômega-3 (EPA + DHA)
375 em cada ensaio, podendo se observar que os ensaios Z5 e M1 apresentaram
376 valores superiores a 20 g de EPA + DHA / 100 g de microcápsula. . Sendo assim,
377 com base na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA – BRASIL, 2009),
378 seria necessária a adição de 0,50 g de microcápsulas em porções ou em 100 g ou
379 100 mL de alimentos para considerar este com apelo de propriedade funcional,
380 visto que é regulamentado que alimentos devem apresentar no mínimo 0,1 g de
381 EPA e/ou DHA na porção ou em 100 g ou 100 mL, para se permitir esta alegação
382 (ANVISA, 2009).

383 Todavia, existem inúmeras recomendações de ingestão diária de ácidos
384 graxos ômega-3 divulgadas por diversos autores e Entidades, algumas listadas
385 por Whelan e Rust (2006):

386 A British Nutrition Foundation, do Reino Unido, recomendou o consumo de
387 1,25 g/dia de ácidos graxos ômega-3 totais (1999); Simopoulos, Leaf e Salem, 650
388 mg/dia de EPA + DHA (2000); o Scientific Advisory Committee on Nutrition,
389 também do Reino Unido, > 0,2 g/dia ácidos graxos ômega-3 (2002); a
390 Organização Mundial da Saúde (OMS), 1 a 2% das calorias provenientes de
391 ácidos graxos ômega-3 (2003); a International Society for the Study of Fatty Acids
392 and Lipids, ≥ 500 mg/dia de EPA + DHA (2004). Ainda em 2004, a Food and Drug
393 Administration (FDA), dos Estados Unidos, permitiu a alegação de propriedade
394 funcional para alimentos enriquecidos com ácidos graxos ômega-3, porém

395 também sugeriu que o consumo EPA + DHA não exceda 3 g/dia devido a
396 possíveis efeitos adversos no controle glicêmico, aumento do tempo de
397 sangramento e do LDL-colesterol.

398

399 **4 CONCLUSÃO**

400 Ao término deste trabalho conclui-se que cada componente estudado
401 apresenta comportamento típico quando avaliado através do potencial zeta, em
402 especial o IPS que causa variação devido sua constituição como proteínas
403 isoladas e agregados protéicos, com baixa solubilidade, sendo assim difícil
404 determinar exatamente o valor de potencial zeta zero para as misturas estudadas.

405 As microcápsulas produzidas com 1,5:1,0 IPS:GA, 2,0:1,0 parede:recheio e
406 pH 4,0 (Z5) apresentou em torno de 20 g / 100 g de microcápsulas, sendo
407 recomendada uma adição de 0,50 g em porções ou em 100 g ou 100 mL de
408 alimentos para considerar este com apelo de propriedade funcional pelas
409 determinações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil).

410

411 **5 AGRADECIMENTOS**

412 Os autores agradecem o suporte financeiro dos órgãos governamentais
413 brasileiros (Capes e CNPq) pela bolsa de doutorado cedida aos membros
414 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

CONCLUSÕES GERAIS

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.

