



## Microencapsulação de óleo de linhaça através de emulsões multicamadas estabilizadas por hidrolisados proteicos de alfarroba e pectina

Palavras-chave: Microencapsulação, Emulsões multicamadas, Proteína vegetal

Aluna: Larissa Torres Gontijo

Orientador: Profa. Dra. Louise Emy Kurozawa

Co-orientador: Pedro Renann Lopes de França

### 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O consumo regular de ácido graxos poli-insaturados (PUFAs)  $\omega$ -3 está associado a diversos efeitos benéficos, principalmente em relação à prevenção de doenças cardiovasculares (VAZ et al., 2014). Entre as fontes vegetais de PUFAs da categoria  $\omega$ -3, pode-se citar o óleo de linhaça, cuja composição apresenta de 47 a 58% de ácido alfa-linolênico (ALA, C18:3) (ZHANG et al., 2011). Entretanto, a alta suscetibilidade deste óleo à oxidação lipídica limita suas aplicações em matrizes alimentares, visto que o processo de oxidação promove alterações sensoriais desfavoráveis, além de originar produtos reacionais potencialmente tóxicos e *off-flavours* indesejáveis (VELLIDO-PEREZ et al., 2021). Assim, a tecnologia de microencapsulação tem se demonstrado promissora, garantindo uma maior proteção do óleo contra as condições ambientais existentes no armazenamento e/ou processamento. A escolha de materiais de parede adequados, por sua vez, influencia diretamente na eficiência do encapsulamento e, conseqüentemente, na estabilidade das micropartículas (CHANG; NICKERSON, 2018). Estudos de Corstens et al. (2017) e McClements (2004) revelaram que o uso de emulsões multicamadas, formadas pela deposição eletrostática de duas ou mais camadas interfaciais, confere maior proteção aos compostos microencapsulados do que as emulsões tradicionais, compostas por uma única camada interfacial. Por outro lado, o emprego de proteínas de origem vegetal na formulação das micropartículas, como a proteína presente no gérmen de alfarroba, possibilita abranger a crescente demanda das dietas vegetarianas, veganas e flexitarianas. Além disso, sabe-se que a hidrólise proteica é capaz de melhorar as propriedades funcionais e nutricionais das proteínas vegetais, aumentando, por exemplo, as atividades antioxidantes e a capacidade emulsificante (CONDE; PATINO, 2007, CUI et al., 2022, WANG et al., 2022). Dessa forma, a presente pesquisa possui como objetivo analisar o uso da proteína hidrolisada de alfarroba na elaboração de emulsões multicamadas, que serão posteriormente utilizadas na microencapsulação de óleo de linhaça pelo processo de *spray drying*.

### 2. MATERIAIS E MÉTODOS

**2.1 Obtenção dos hidrolisados proteicos:** A hidrólise enzimática da proteína concentrada e desengordurada de alfarroba (CPC) foi monitorada utilizando o método do pH-stat (ADLER-NISSEN, 1986). Após a preparação da solução proteica (10 g/100 mL), ajustou-se o pH para 8,0 e agitou-se a suspensão por 1h a temperatura ambiente visando a hidratação das proteínas. Posteriormente, a suspensão foi condicionada a temperatura de 50°C e pH 8,0 e iniciou-se a hidrólise com a adição da protease de *Bacillus* sp. (2 g/100 g de proteína). Quando atingido um grau de hidrólise (GH) de 2%, a enzima foi inativada a 85°C por 10 min, seguido por resfriamento em banho de gelo. O produto obtido pela hidrólise foi denominado hidrolisado proteico de alfarroba (CPH).

**2.2 Obtenção das emulsões multicamadas:** As emulsões foram obtidas pela técnica de multicamadas. Primeiramente, preparou-se as soluções proteicas (CPC ou CPH) em água destilada e ajustou-se o pH para 2, abaixo do ponto isoeletrico da proteína de alfarroba. As soluções proteicas, assim como as dispersões de pectina (PE) e maltodextrina (MD), foram

agitadas durante a noite à temperatura ambiente. Após isso, a emulsão primária foi preparada pela mistura do óleo e suspensão proteica aquosa contendo CPC ou CPH e, então, homogeneizada a 20000 rpm durante 4 minutos em homogeneizador rotor-estator (Ultra-Turrax IKA, USA). A emulsão secundária foi obtida misturando a emulsão primária com as soluções de PE e MD, seguido de homogeneização semelhante. No caso das emulsões com uma única camada interfacial, não houve adição de PE. Por fim, ajustou-se o pH para 2 e submeteu-se a emulsão a uma nova homogeneização a 20000 rpm por 4 min. Dessa forma, obteve-se 4 formulações distintas: CPCME (ÓLEO+CPC+PE+MD); CPHME (ÓLEO+CPH+PE+MD); CPCSE (ÓLEO+CPC+MD); CPHSE (ÓLEO+CPH+MD). As emulsões multicamadas apresentaram em sua constituição 5% de proteína (CPH ou CPC), 1% de pectina, 29% de maltodextrina e 10% de óleo. Já as emulsões simples foram formadas por 5% de proteína (CPH ou CPC), 30% de maltodextrina e 10% de óleo.

### **2.3 Caracterização das emulsões multicamadas:**

**2.3.1 Tamanho de gota:** O tamanho médio das gotas de óleo foi determinado utilizando um dispositivo de difração à laser (Malvern Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). O diâmetro médio das gotas foi representado como o diâmetro médio da superfície do volume (D3,2 - Diâmetro de Sauter). O Índice de Polidispersividade (PDI) também foi determinado.

**2.3.2 Estabilidade da emulsão:** A estabilidade das emulsões foi avaliada pelo instrumento de varredura óptica Turbiscan ASG (Formulation, França). As medidas da intensidade da luz retroespalhada foram realizadas por 24 horas a 25°C e 880 nm. Visando estudar o processo de desestabilização da emulsão, avaliou-se os perfis de retroespalhamento (BS) nos seguintes períodos: 0, 10, 20, 30, 40 e 50 min; e 1, 2, 3, 4, 5 e 24h. O Índice de Turbiscan (TSI) após 5h de preparação da emulsão também foi medido.

**2.4 Microencapsulação do óleo de linhaça:** As emulsões foram secas em um *spray dryer* de escala laboratorial (Lab Plant SD-06A, Reino Unido) sob as seguintes condições: temperatura do ar de entrada de 180 °C ± 2 °C e temperatura de saída de 100 °C ± 2 °C, com vazão de líquido de 485 mL/h. A atomização das emulsões na câmara de secagem foi feita por ar comprimido a 2,8 bar, através de um bico atomizador duplo-fluido com diâmetro interno de 1,0 mm. O sistema foi alimentado com as emulsões por uma bomba peristáltica. A fim de avaliar o processo de microencapsulação, determinou-se a eficiência de encapsulação (EE), baseada na quantidade de óleo não encapsulado presente na superfície das micropartículas, sendo o teor de óleo superficial nas micropartículas quantificado de acordo com Bae e Lee (2008). Para isto, cerca de 1,5 g de pó foi disperso em 15 mL de hexano e submetido a agitação por 2 min. Então, filtrou-se a mistura em papel filtro e lavou-se a fase sólida retida duas vezes com 20 mL de hexano. O solvente foi evaporado em temperatura ambiente até peso constante. Por fim, calculou-se a eficiência de encapsulação como o percentual de óleo presente no interior da partícula em relação ao adicionado na emulsão.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Tamanho de gota**

Conforme a Tabela 1, as emulsões apresentaram valores de  $D_{3,2}$  na faixa de 3,89 a 5,37  $\mu\text{m}$ . Desse modo, pode-se afirmar que os emulsificantes utilizados na formulação foram devidamente adsorvidos na interface das gotas de óleo, formando um filme capaz de estabilizar a emulsão (OKURO et al., 2019).

**Tabela 1** - Diâmetro de Sauter ( $D_{3,2}$ ), Índice de Polidispersividade (PDI) e Índice de Turbiscan (TSI) das emulsões simples e multicamadas.

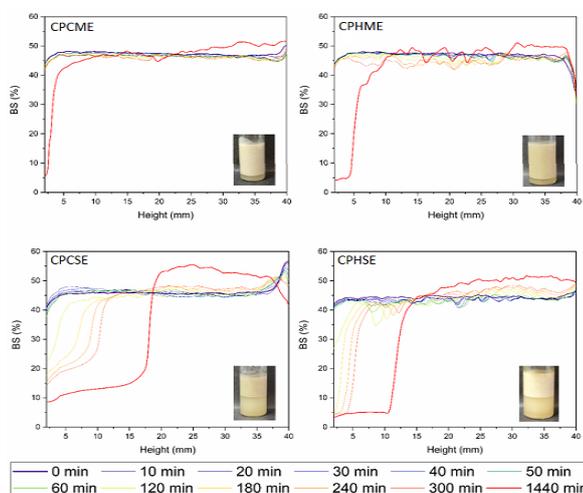
Amostras	D (3,2) ( $\mu\text{m}$ )	PDI	TSI(5h)
CPCME	4,20 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	4,82 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	1,26 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
CPHME	3,89 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	4,87 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>	2,59 $\pm$ 0,73 <sup>b</sup>
CPCSE	5,37 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	2,52 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	6,23 $\pm$ 0,52 <sup>c</sup>
CPHSE	4,81 $\pm$ 0,11 <sup>d</sup>	2,55 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	7,10 $\pm$ 0,47 <sup>d</sup>

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

No caso das emulsões multicamadas, observou-se menores valores de  $D_{3,2}$  quando comparado com as emulsões compostas por uma única camada interfacial, independente do processo de hidrólise. Entre os possíveis motivos para tanto, pode-se citar o aumento da viscosidade da emulsão devido a adição de pectina. Segundo Galves et al. (2021), viscosidades maiores reduzem a mobilidade e as interações entre as gotas de óleo, impedindo fenômenos de coalescência e floculação. Além disso, esses fenômenos também são inibidos pela presença de um revestimento secundário, o qual aumenta a repulsão eletrostática e estérica entre as gotas (XU et al., 2016).

### 3.2 Estabilidade das emulsões

Por meio dos perfis de retroespalhamento das emulsões (Figura 1) e dos valores de TSI após 5h (Tabela 1), verificou-se que as emulsões multicamadas são mais cineticamente estáveis que as emulsões simples. Esse resultado pode ser relacionado aos fatores citados anteriormente: redução da mobilidade das gotas devido à maior viscosidade do sistema multicamada (GALVES et al., 2021), além do aumento da repulsão eletrostática e estérica entre elas como consequência do revestimento secundário (XU et al., 2016).



**Figura 1** - Perfis de retroespalhamento das emulsões simples e multicamadas. Fotos das emulsões foram tiradas após 24h.

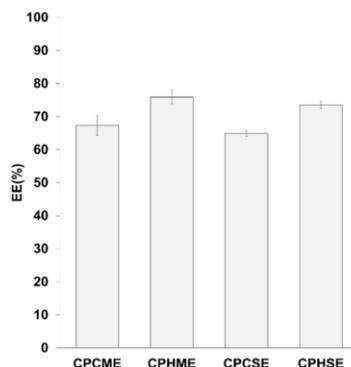
Além disso, nos sistemas multicamadas observou-se um aumento do tamanho das gotas logo depois do preparo das emulsões, devido aos processos de coalescência, floculação e amadurecimento de Ostwald (GOMES; KUROSZAWA, 2020). No caso da amostra CPCME isto ocorreu após 4h, sem migração das gotas para a parte superior do tubo, e a separação de fases tornou-se visível somente depois de 24 horas. Entretanto, para a amostra CPHME, verificou-se a migração das gotas com 4 horas de análise, o que indica a quebra da estrutura da emulsão.

É válido ressaltar ainda que a hidrólise diminuiu a estabilidade das emulsões (CPHME e CPHSE). Entre as possíveis causas deste fenômeno pode-se citar a perda da capacidade emulsificante, derivada da formação de peptídeos hidrofílicos durante o processo de hidrólise, o que a enfraquece a adsorção proteica na interface O/A e, conseqüentemente, favorece o fenômeno de coalescência das gotas de óleo (PANYAM; KILARA, 1996).

Todavia, de forma geral, a aplicação de multicamadas apresentou uma maior influência na estabilidade das emulsões do que o processo de hidrólise. No caso das emulsões simples verificou-se valores mais altos de TSI após 5h, e a separação de fases foi detectada a partir de 2 horas após o preparo.

### 3.3 Eficiência de encapsulação

Todas as amostras se mostraram adequadas para a microencapsulação do óleo de linhaça, apresentando valores de EE superiores a 64% (Figura 2). Sendo assim, a microencapsulação foi capaz de reter o óleo dentro da estrutura das micropartículas durante a secagem.



**Figura 2** - Eficiência de encapsulação do óleo de linhaça microencapsulado por *spray drying*.

A aplicação de sistemas multicamadas não foi capaz de melhorar a EE, visto que os valores de EE não exibiram diferença estatística entre as emulsões simples (CPCSE e CPHSE) e multicamadas (CPCME e CPHME). Isto, por sua vez, pode ser devido à alta variabilidade do parâmetro EE, o qual é fortemente dependente da relação óleo/material de parede (GALVES et al., 2021). Como essa proporção e as condições de secagem permaneceram semelhantes para todas as amostras, não se observou uma variação significativa da EE em função da quantidade de camadas interfaciais.

A hidrólise, por outro lado, aumentou a EE em cerca de 10% para as amostras CPHME e CPHSE. Esse resultado pode ser explicado pelo menor peso molecular da proteína hidrolisada, o que possibilita uma rápida difusão e formação de um filme de proteção do óleo durante o processo de secagem, evitando, assim, que o óleo encapsulado migre para a superfície das micropartículas (LIU et al., 2010).

## 4. CONCLUSÃO

Em comparação com as emulsões simples, as emulsões multicamadas demonstraram um tamanho de gota menor e uma maior estabilidade ao longo do tempo. As emulsões contendo a proteína hidrolisada apresentaram uma leve piora na estabilidade, visto que os peptídeos com menor peso molecular podem não ser capazes de formar um filme viscoelástico estável na superfície das gotas. Entretanto, a hidrólise gerou um aumento da EE durante a secagem por *spray drying*, ao possibilitar a rápida formação de um filme de proteção do óleo. Portanto, conclui-se que as emulsões multicamadas estabilizadas com hidrolisados são uma boa alternativa para a microencapsulação e proteção do óleo de linhaça.

## 5. REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic Hydrolysis of Food Protein**. [s.l.: s.n.]. v. 8.
- BAE, E. K.; LEE, S. J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. **Journal of Microencapsulation**, [S. l.], v. 25, n. 8, p. 549–560, 2008. DOI: 10.1080/02652040802075682. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02652040802075682>. Acesso em: 19 abr. 2021.
- CHANG, C.; NICKERSON, M. T. Encapsulation of omega 3-6-9 fatty acids-rich oils using protein-based emulsions with spray drying. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, p. 2850–2861, 2018. DOI: 10.1007/s13197-018-3257-0.
- CONDE, J. M.; PATINO, J. M. R. The effect of enzymatic treatment of a sunflower protein isolate on the rate of adsorption at the air-water interface. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 78, n. 3, p. 1001–1009, 2007. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2005.12.013.
- CORSTENS, M. N. et al. Emulsion-alginate beads designed to control in vitro intestinal lipolysis: Towards appetite control. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 319–328, 2017. DOI: 10.1016/j.jff.2017.05.003.
- CUI, Q. et al. Effect of two-step enzymatic hydrolysis on the antioxidant properties and proteomics of hydrolysates of milk protein concentrate. **Food Chemistry**, v. 366, p. 130711, 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130711.
- DING, Y. et al. Emulsifying and emulsion stabilizing properties of soy protein hydrolysates, covalently bonded to polysaccharides: The impact of enzyme choice and the degree of hydrolysis. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 106519, 2021. DOI: 10.1016/J.FOODHYD.2020.106519.
- GALVES, C. et al. Improving the emulsifying property of potato protein by hydrolysis: an application as encapsulating agent with maltodextrin. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 70, p. 102696, 2021. DOI: 10.1016/J.IFSET.2021.102696.
- GOMES, M. H. G.; KUROSZAWA, L. E. Improvement of the functional and antioxidant properties of rice protein by enzymatic hydrolysis for the microencapsulation of linseed oil. **Journal of Food Engineering**, v. 267, p. 109761, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109761>.
- LIU, S. et al. Entrapment of flaxseed oil within gelatin-gum arabic capsules. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, p. 809-815, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1560-7>.
- OKURO, P. K. et al. Formation and stability of W/O-high internal phase emulsions (HIPEs) and derived O/W emulsions stabilized by PGPR and lecithin. **Food Research International**, v. 122, p. 252–262, 2019. DOI: 10.1016/J.FOODRES.2019.04.028.
- PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 120–125, 1996. DOI: 10.1016/0924-2244(96)10012-1.
- VAZ, D. S. S. et al. A IMPORTÂNCIA DO ÔMEGA 3 PARA A SAÚDE HUMANA: UM ESTUDO DE REVISÃO. **Uningá Review Journal**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 48-54, 2014. ISSN 2178-2571.
- VELLIDO-PEREZ, J. A. et al. Novel emulsions-based technological approaches for the protection of omega-3 polyunsaturated fatty acids against oxidation processes – A comprehensive review. **Food Structure**, v. 27, p. 100175, 2021. DOI: 10.1016/j.foostr.2021.100175.
- WANG, Y. et al. Effect of hydrolysis on the emulsification and antioxidant properties of plant-sourced proteins. **Current Opinion in Food Science**, v. 48, p. 100949, 2022. DOI: 10.1016/j.cofs.2022.100949.
- XU, D. et al. Physicochemical stability, microrheological properties and microstructure of lutein emulsions stabilized by multilayer membranes consisting of whey protein isolate, flaxseed gum and chitosan. **Food Chemistry**, v. 202, p. 156–164, 2016. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2016.01.052.
- ZHANG, Z. S. et al. Characteristics of flaxseed oil from two different flax plants. **International Journal of Food Properties**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 1286–1296, 2011. DOI: 10.1080/10942911003650296.