

PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE CHIA ENCAPSULADO EM PARTÍCULAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO

M. F. SOUZA¹, J. L. SANCHEZ¹, E. BONA², A. A. C. TANAMATI¹, F. V. LEIMANN², O. H. GONÇALVES^{2*}

¹ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento de Alimentos

² Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

*odinei@utfpr.edu.br

RESUMO – A encapsulação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA, *Poly-UnsaturatedFattyAcid*) é descrita na literatura como uma alternativa para aumentar sua estabilidade durante processamento e armazenamento. Fontes alternativas de PUFAs, como a chia (*Salviahispanica L.*), possuem propriedades promissoras, contudo a sua encapsulação necessita ser melhor avaliada. Nesse trabalho, óleo de chia foi extraído e encapsulado em micropartículas lipídicas (ácido esteárico como encapsulante) obtidas por homogeneização a quente utilizando ultrassom (120 W, 3 minutos de sonicação). Após liofilização, o perfil de ácidos graxos das partículas foi analisado por cromatografia gasosa (padrão interno de tricosanoato de metila) e comparado ao perfil do óleo de chia *in natura*. O óleo *in natura* apresentou elevados teores de ômega-3 e ômega-6, que foram efetivamente encapsulados nas partículas de ácido esteárico.

1. INTRODUÇÃO

A escolha por parte dos consumidores de alimentos funcionais tem direcionado o mercado no sentido de ampliar a oferta de produtos acrescidos de ômega-3, antioxidantes, fibras dietéticas e outros componentes com alto valor nutritivo. As sementes da *Salviahispanica L.* ou chia tem sido estudada principalmente por causa da qualidade de seu óleo (Capitaniet *al.*, 2012; Rodea-González *et al.*, 2012). O óleo da chia tem alto valor nutricional, pois a maior parte de seus constituintes são triglicerídeos, nos quais ácidos graxos poli-insaturados estão presentes em maiores proporções, como por exemplo, o conteúdo de ácido linolênico (Ômega-3) está entre 60 e 68% (Capitaniet *al.*, 2012). Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) tais como o Ômega-3 têm ajudado na redução de triacilglicerol e concentração de colesterol no soro sanguíneo. Observou-se seu efeito benéfico em relação a doenças coronárias, hipertensão, e desordens inflamatórias, tais como a colite ulcerativa (Borneoet *al.*, 2007).

Contudo, os ácidos graxos poli-insaturados são suscetíveis à oxidação durante o processamento e armazenamento, resultando em diminuição do valor nutricional e da qualidade sensorial. A

encapsulação mostra-se como uma alternativa de proteção destes lipídios contra a oxidação (Gökmen *et al.*, 2011) já que através da encapsulação, aditivos reativos, sensíveis ou voláteis como os PUFA's podem tornar-se estáveis. Existem várias metodologias para obtenção de micropartículas ou nanopartículas lipídicas tais como a homogeneização de alto cisalhamento e ultrassom, homogeneização sob alta pressão, homogeneização a quente, homogeneização fria e emulsificação com evaporação de solvente (Tamjidiet *al.*, 2013; Mehnert e Mäder, 2001). O processo de cristalização ou recristalização do lipídio reduz a solubilidade do composto a ser encapsulado, levando geralmente à sua expulsão quando em altas concentrações (Tamjidiet *al.*, 2013). No caso da incorporação de PUFA's, a cristalização completa do lipídio sólido encapsulante é desfavorecida pela presença do óleo, gerando uma estrutura cristalina menos ordenada ou uma estrutura de um sólido amorfo (Tamjidiet *al.*, 2013).

Borneo *et al.* (2007) aplicaram ácidos graxos ômega-3 encapsulados em biscoitos recheados com creme, os trabalhos demonstraram que foi possível fazer alimentos fortificados com vida de prateleira estável contendo altos níveis de ômega-3, sem qualquer efeito adverso sobre as propriedades sensoriais. Gökmen *et al.* (2011) observaram uma redução na termoxidação dos ácidos graxos ômega-3 nanoencapsulados provindos de óleo de linho durante a confecção de produtos de panificação. Alguns autores relatam que a encapsulação também minimizou o odor e sabores indesejáveis de peixe (Muchowet *et al.*, 2009). Rodea-González *et al.* (2012) produziram micropartículas contendo óleo de chia através da técnica encapsulação por *spray dry*, utilizando proteína de soro de leite e polissacarídeo concentrado como matrizes.

No caso do óleo de chia, é preciso determinar a eficiência de encapsulação dos seus principais ácidos graxos, o ômega-3 e o ômega-6, a fim de verificar se ambos são encapsulados nas mesmas proporções na matriz sólida. Além disso, é preciso verificar ainda se as condições de obtenção, como a aplicação de ultrassom, pode levar à degradação de algum destes compostos.

2. METODOS E PROCEDIMENTOS

2.1 Material

As sementes de chia (app. 200g) foram adquiridas no comércio local. Ácido esteárico (Vetec, 95%) e Tween 80 (Dinâmica, 97%) foram utilizados como lipídio sólido e surfactante na formulação das partículas, respectivamente. Água destilada, fosfato de sódio monobásico e dibásico (Vetec, 99,5%) foram utilizados no preparo da solução tampão. Metanol (Isotar, 99,8%), clorofórmio (Proquimicos, 99,8%), cloreto de amônio (Proquimicos, PA), ácido sulfúrico (Vetec, 95%) foram utilizados na transesterificação e brometo de potássio (Sigma-Aldrich, padrão espectrofotométrico) foi empregado nas análises no FTIR.

2.2 Extração do óleo de chia

Primeiramente a umidade das sementes de chia triturada foi determinada através de um analisador de umidade por infravermelho (Gehaka, IV2000). A umidade foi corrigida para 80% de umidade pela adição de água destilada. Em seguida, a extração foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bligh&Dyer (1959). Pesou-se 15g de semente de chia triturada e acrescentou-se 30 mL de metanol e 15 mL de clorofórmio sob agitação magnética por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 15 mL de clorofórmio e agitou-se novamente por 2 minutos; por fim, 15 mL de água foram acrescentados e agitou-se por 5 minutos. A solução foi filtrada em funil de Büchner adicionando 10 mL de clorofórmio na torta e agitando por 5 minutos e, em seguida, filtrando novamente a torta. Esse procedimento foi realizado duas vezes. Por fim, o filtrado foi transferido a um funil de separação e o sistema foi mantido em repouso por 24h, quando a fase orgânica foi separada e evaporada em evaporador rotativo (-400 mmHg e 35°C). O óleo de chia foi armazenado em frasco protegido da luz a -10°C.

2.3 Obtenção das nanopartículas

A obtenção de partículas contendo óleo de chia encapsulado foi realizada pela técnica de dispersão a quente conforme descrito por Gonzalez-Mira et al. (2010) com algumas modificações. A fase aquosa foi preparada dissolvendo 0,300 g de Tween 80 em 25 g de solução tampão fosfato (pH = 7,4) e aquecendo a 75°C sob agitação branda. Separadamente, um reator encamisado de borossilicato foi conectado a um banho termostático a 75°C e 0,625 g de ácido esteárico foi adicionado e fundido. O óleo de chia foi então adicionado ao reator e mantido sob agitação branda por 1 minuto. Em seguida, a fase aquosa foi adicionada ao reator e mantida sob agitação branda por 3 minutos a fim de se formar a macroemulsão da fase lipídica na fase aquosa. Asonicação (Fisher-Scientific – Ultrasonic Dismembrator 120 W com ponta de 1/8”) foi realizada por 3 minutos em regime de pulsos (30 segundos ligada e 10 segundos desligada). A mistura sonicada foi vertida em bequer em banho de gelo para resfriamento e formação das partículas. Parte da dispersão das partículas foi liofilizada para análise. Partículas foram também obtidas pelo mesmo procedimento porém sem a adição do óleo de chia para as análises de FTIR.

2.4 FTIR e microscopia óptica

Espectroscopia de infravermelho foi utilizada para avaliar qualitativamente a presença do óleo de chia nas partículas. Para preparar as pastilhas foram adicionados 100 mg de KBr seco e 1 mg de amostra liofilizada (ou do óleo *in natura*). A análise foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu (IR Affinity-1) de 4000 a 400 cm^{-1} com 32 varreduras acumuladas para formar o espectro final. Foram obtidas 3 pastilhas para cada amostra. Imagens das partículas foram obtidas por microscopia óptica (BIOVAL, L2000A) acoplado a uma câmera digital (DCM130E) utilizando o software ScopePhoto.

2.5 Transesterificação e Cromatografia Gasosa

A quantificação dos ácidos graxos nas amostras foi realizada por Cromatografia Gasosa (CG) com o uso de tricosenoato de metila (23:0) como padrão interno de acordo com o método de

transesterificação de Hartman e Lago (1973), descrita em Milinsk (2007). Os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs) foram separados no cromatógrafo e identificados por comparação do tempo de retenção e adição de padrões (Sigma-Aldrich, F.A.M.E. Mix C14-C22). Foi utilizado um cromatógrafo gasoso (Shimadzu, GC-2010 Plus AF) equipado com injetor capilar Split/Splitless, detector de ionização por chama (FID), controlador de fluxo e pressão automáticos e coluna capilar com fase 100% dimetil-polisiloxano, modelo Rtx-1 (30 m X 0,25mm X 0,25um). Outras condições de injeção dos ésteres, bem como os fluxos dos gases (White Martins) de arraste (hidrogênio), do auxiliar (nitrogênio) e os da chama (hidrogênio/ar sintético) foram realizados conforme Milinsk (2007) [25]

Inicialmente foram adicionados num tubo de ensaio 1000 µL do padrão 1mg/mL em isoctano, sendo o solvente evaporado sob fluxo de nitrogênio. Na sequência, foram pesados entre 20 a 30 mg de óleo, sendo adicionado 4 mL de solução aquosa de NaOH 0,5 mol/L em metanol, agitado por 30 segundos e aquecido em refluxo por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 5,0 mL do reagente de esterificação, a mistura foi agitada por 30 segundos e novamente aquecida em refluxo por mais 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mL de solução saturada de NaCl e agitação por 30 segundos. A fase orgânica foi coletada, o solvente evaporado em evaporador rotativo e o resíduo foi removido sob fluxo de nitrogênio gasoso. Os ésteres metílicos foram solubilizados em n-heptano para posterior injeção no cromatógrafo gasoso. As transesterificações foram realizadas em triplicata.

2.6 Recuperação e eficiência de encapsulação de ômega-3 e ômega-6

A recuperação percentual (Rec%, Equação 1) de ácidos graxos é definida como a relação entre a quantidade adicionada (teórica) e a quantidade realmente presente ao final da encapsulação. Para tanto, a dispersão das partículas em água foi liofilizada e uma alíquota de 20 a 30 mg das partículas secas foi transesterificada conforme descrito acima.

$$Rec (\%) = 100 \frac{[AG]_{real}}{[AG]_{teórico}} \quad (1)$$

Para o cálculo da eficiência de encapsulação (EE%, Equação 2), uma alíquota da dispersão de nanopartículas foi filtrada em filtros Amicon (100 kDa de diâmetro de corte) utilizando uma centrífuga de eppendorf (MinispinnEppendorf) a 14500 rpm por 15 min. O líquido filtrado contendo os ácidos graxos não encapsulados foi pesado e transesterificado conforme descrito anteriormente.

$$EE (\%) = 100 \frac{[AG]_{real} - [AG]_{não\ encapsulado}}{[AG]_{real}} \quad (2)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Óleo de chia in natura. O cromatograma do óleo de chia antes da encapsulação (*in natura*) é apresentado na Figura 1. As concentrações dos ácidos graxos (AG) identificados são apresentados na Tabela 1.

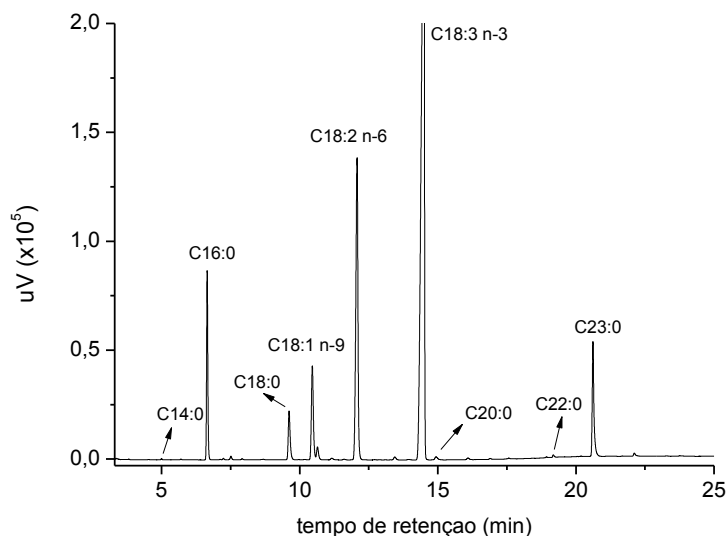


Figura 1 -Cromatograma do óleo de chia *in natura*(antes da encapsulação).

Tabela 1 – Concentrações de ácidos graxos no óleo de chia *in natura* (antes da encapsulação).

Ácido graxo	Concentração(mg _{AG} /g _{óleo})
C14:0	0,1 ± 0,0
C16:0	12,3± 1,0
C18:0	4,9± 0,4
C18:1 n-9	9,2± 0,1
C18:2 n-6	33,1± 2,1
C18:3 n-3	107,2± 10,6
C20:0	0,4± 0,0
C22:0	0,1± 0,1
C23:0 [†]	-

[†] padrão interno (tricosanoato de metila).

A extração do óleo das sementes de chia resultou em um rendimento de 19,8%. É possível observar na Figura 1 os picos correspondentes aos ácidos linoleico (ômega-6) e alfa-linolênico (ômega-3) nos tempos de retenção de aproximadamente 12 minutos e 14, respectivamente. Como esperado, as sementes de chia possuem altas concentrações de ômegas 3 e 6, sendo consideradas fontes valiosas desses ácidos graxos insaturados. A concentração de ômega-3 encontrada foi em torno de 64% em relação ao total de ácidos graxos, resultado condizente com o descrito na literatura (Capitaniet *al.*, 2012).

Encapsulação do óleo de chia. As Figuras 2 e 3 apresentam os perfis de ácidos graxos das partículas liofilizadas contendo óleo de chia e o perfil de ácidos graxos não encapsulados, respectivamente. O cromatograma do óleo de chia antes da encapsulação é reapresentado para melhor comparação. Os valores de recuperação percentual (Rec%) e eficiência de encapsulação (EE%) para o ômega-3 e ômega-6 são apresentados na Tabela 2.

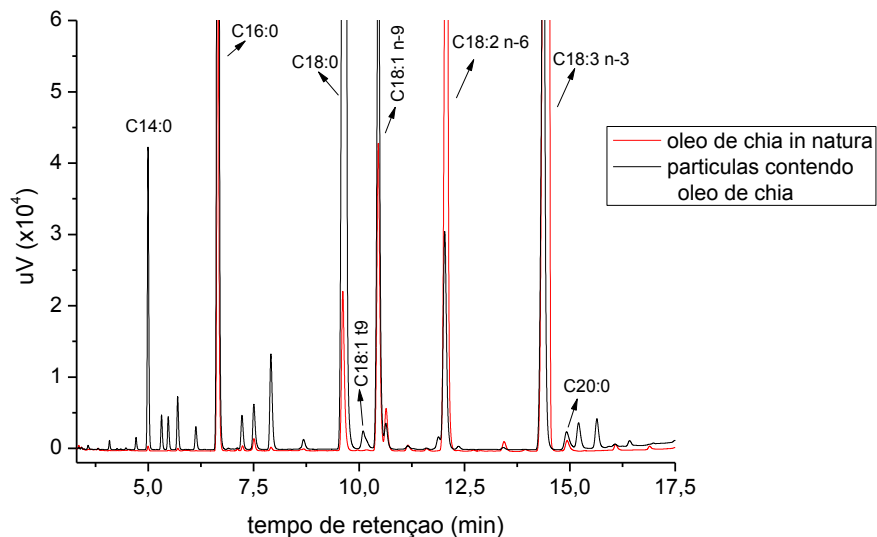


Figura 2 – Cromatogramas do óleo de chia *in natura* (vermelho) e das partículas contendo o óleo de chia encapsulado (preto).

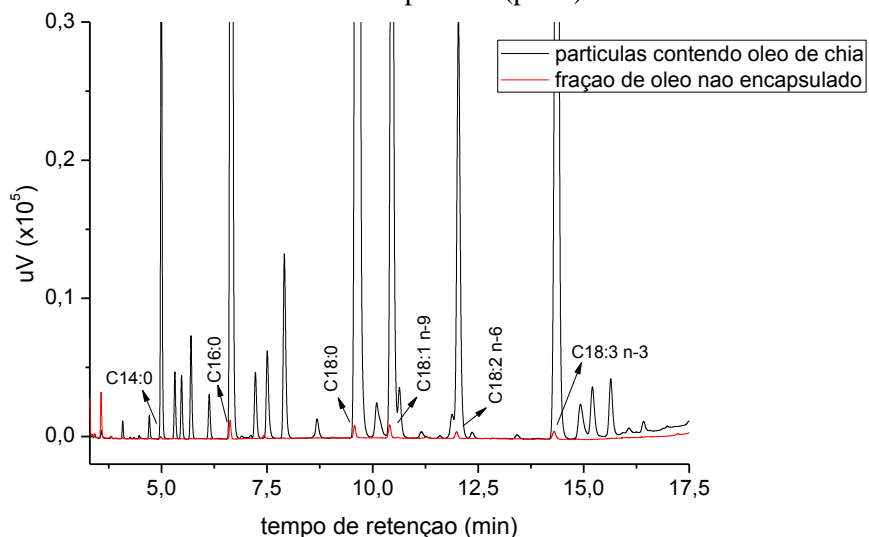


Figura 3 – Cromatogramas do óleo de chia não encapsulado (vermelho) e das partículas contendo o óleo de chia encapsulado (preto).

Tabela 2 – Recuperação percentual e eficiência de encapsulação do ômega-3 e ômega-6.

Ácido graxo	Recuperação(Rec%)	Eficiência de encapsulação(Ee%)
C18:3 n-3(ômega-3)	98,6 ± 1,1	82,1 ± 0,3
C18:2 n-6 (ômega-6)	98,4 ± 1,6	64,6 ± 1,8

É possível observar (Figura 2) que os picos referentes ao ômega-3 e ômega-6 estão presentes nas partículas, contudo em menor intensidade já que estas são compostas por ácido esteárico (encapsulante) e óleo de chia na proporção 1:1 (m:m). No cromatograma das partículas contendo o

óleo de chia (Figura 3), o pico do ácido esteárico (C18:0) apresentou-se bem pronunciado, assim como ocorreu o aparecimento de picos de ácidos graxos não identificados, provavelmente impurezas contidas no ácido esteárico utilizado como encapsulante. A recuperação percentual de ômega-3 e ômega-6 apresentou valores altos, comprovando que não ocorreu perda desses compostos durante a obtenção das partículas, quer seja por degradação devido ao aquecimento a 75°C ou pela aplicação do ultrassom. Esse resultado indica que a técnica utilizada é interessante na obtenção de partículas lipídicas contendo ácidos graxos insaturados. A eficiência de encapsulação foi maior para o ômega-3 do que para o ômega-6, o que pode estar relacionado com a conformação molecular dos ácidos graxos no interior das partículas. Devido ao menor número de insaturações, o ômega-6 possui estrutura molecular menos compacta, o que pode prejudicar sua estabilização dentro da estrutura semi-cristalina do ácido esteárico.

Caracterização das partículas. A Figura 4 apresenta as imagens de microscopia ótica das partículas contendo o óleo de chia e na Figura 5 são apresentados os espectros de infravermelho do óleo de chia, das partículas contendo o óleo encapsulado e de partículas obtidas sem a adição do óleo de chia. Os espectros foram normalizados a fim de possibilitar a comparação.

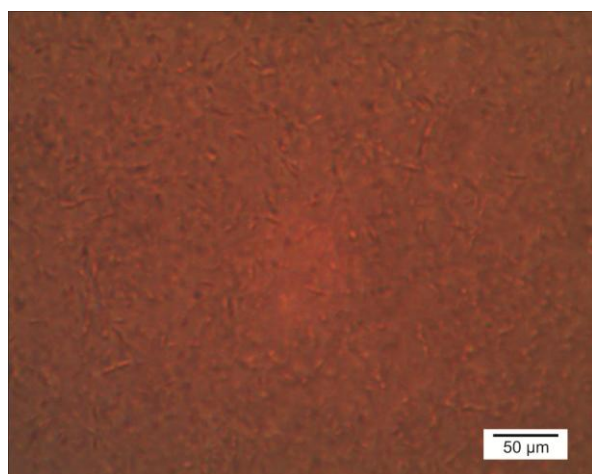


Figura 4 - Imagem de microscopia ótica das partículas contendo óleo de chia

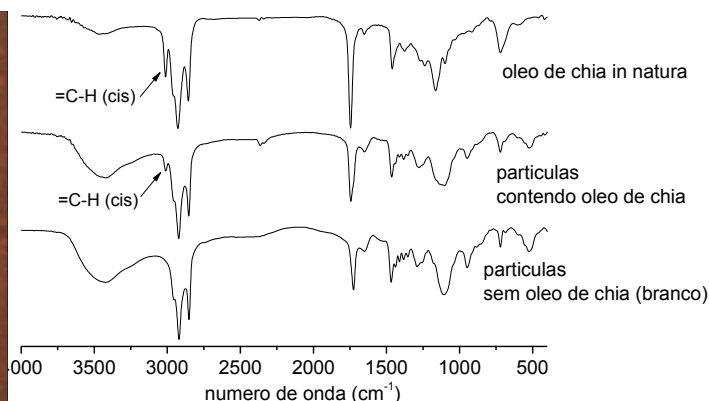


Figura 5 – Espectros do óleo de chia *in natura*, das partículas contendo o óleo encapsulado e de partículas de ácido esteárico obtidas sem a adição do óleo de chia.

Apesar do baixo aumento utilizado, é possível perceber que as partículas possuem tamanhos da ordem de 5 a 10 micrômetros, o que é esperado devido ao baixo tempo e potência de sonicação aplicados. O espectro de FTIR do óleo de chia apresentou banda de absorção em 3010 cm⁻¹ característico do estiramento da ligação =C-H (Vidal *et al.*, 2014). Essa banda em particular é de interesse pois o encapsulante utilizado não apresenta insaturações na cadeia carbônica. Essa banda está presente também nas partículas, contudo com menor intensidade, sugerindo que o óleo esteja localizado no interior das partículas de ácido esteárico. Esse resultado corrobora aqueles obtidos por cromatografia gasosa, indicando que a técnica de encapsulação foi eficiente em encapsular o óleo de chia.

4. CONCLUSÕES

Óleo de chia foi extraído e encapsulado em partículas micrométricas de ácido esteárico. As análises de cromatografia gasosa e FTIR demonstraram que o óleo foi efetivamente encapsulado nas partículas. A eficiência de encapsulação foi maior para o ômega-3 do que para o ômega-6, possivelmente devido à conformação molecular favorável causada pelas ligações carbono insaturadas do ômega-3. Apesar dos baixos aumentos das imagens de microscopia ótica, foram observadas partículas tamanhos micrométricos.

5. REFERÊNCIAS

- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad. J. Biochem. and Physiol.*, v. 37, nº8, p. 911-917, 1959.
- BORNEO, R.; KOCER, D.; GHAI, G.; TEPPER, B. J.; KARWE M. V. Stability and consumer acceptance of long-chain omega-3 fatty acids (eicosapentaenoic acid, 20:5, n-3 and docosahexaenoic acid, 22:6, n-3) in cream-filled sandwich cookies. *J. Food Sci.*, v. 72, nº 1, p. 49–54, Jan. 2007.
- CAPITANI, M. I.; SPOTORNO, V.; NOLASCO, S. M.; TOMÁS, M. C. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Sci. Technol.*, v. 45, nº 1, p. 94–102, Jan. 2012.
- GÖKMEN, V.; ATAC, B.; BARONE, R.; FOGLIANO, V.; KAPLUN, Z. Development of functional bread containing nanoencapsulated omega-3 fatty acids. v. 105, p. 585–591, 2011.
- GONZALEZ-MIRA, E.; EGEA, M. A.; GARCIA, M.L.; SOUTO, E.B. Design and ocular tolerance of flurbiprofen loaded ultrasound-engineered NLC. *J. Colloid. Surfaces B: Biointerfaces*, v. 81, p. 412-421, 2010.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. *Lab. Pract.*, v. 22, p.474-476, 1973.
- MEHNERT, W. MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. DrugDeliv. Rev.*, v. 47, nº 2–3, p. 165–96, 2001.
- MILINSK, M. C. Análise comparativa entre oito métodos de esterificação na determinação quantitativa de ácidos graxos em óleo vegetal. Programa de Pós-graduação em Química. Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2007.
- MUCHOW, M.; SCHMITZ, E. I.; DESPATOVA, N.; MAINCENT, P. MU, R. H. Omega-3 fatty acids-loaded lipid nanoparticles for patient-convenient oral bioavailability enhancement. p. 499–504, 2009.
- RODEA-GONZÁLEZ, D. A.; CRUZ-OLIVARES, J.; ROMÁN-GUERRERO, A.; RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E.; VERNON-CARTER, E. J.; PÉREZ-ALONSO, C. Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *J. Food Eng.*, v. 111, nº 1, p. 102–109, 2012.
- TAMJIDI, F.; SHAHEDI, M.; VARSHOSAZ, J. NASIRPOUR, A. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, v. 19, p. 29–43, 2013.

VIDAL, N. P.; ENCARNACIÓN, G.; MANZANOS, M. J.; GUILLÉN, M. D. Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to study farmed and wild sea bass lipid composition. *J Sci Food Agric*, v. 94, n° 7, p 1340-1348, 2013.