

EFEITO DA ADIÇÃO DE GELATINA EM EMULSÕES PREPARADAS COM QUITOSANA PARA ENCAPSULAR CONCENTRADOS DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS DE ÓLEO DE PESCADO

D. L. BOTELHO¹, P. P. SILVA¹, V. M. ESQUERDO¹ e L. A. A. PINTO¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos
E-mail para contato: nessafurg@gmail.com

RESUMO – O óleo de pescado é uma fonte rica em ácidos graxos insaturados, porém sua utilização no preparo de produtos alimentícios é tarefa difícil devido a sua baixa solubilidade em água e instabilidade oxidativa. A formação de emulsões com polímeros como quitosana e gelatina pode facilitar sua incorporação em alimentos. O trabalho objetivou utilizar os polímeros quitosana e gelatina para avaliar a capacidade de formar de emulsões estáveis no encapsulamento de concentrados de ácidos graxos insaturados (AGI) obtidos de óleo de vísceras de carpa (*Cyprinus carpio*). Foram testadas as estabilidades de emulsões contendo os concentrados de AGI com os materiais de parede (2% m/v): quitosana pura e misturas quitosana:gelatina de 75%:25% e 50%:50%. As emulsões estáveis foram avaliadas quanto a potencial Zeta, distribuição de tamanho e índice de polidispersão. A mistura contendo 50% de cada polímero não foi capaz de formar emulsão. As emulsões com quitosana pura e com 75%:25% quitosana:gelatina ficaram estáveis durante 30 dias, apresentaram potencial Zeta positivo e índice de polidispersão abaixo de 0,3. Além disso, a adição de pequena quantidade de gelatina nas emulsões (25%) proporcionou uma diminuição no tamanho da partícula (de 480 nm para 156 nm) e na turbidez, demonstrando que é importante o estudo da quantidade de gelatina adicionada para a elaboração de emulsões estáveis.

1. INTRODUÇÃO

Existe um crescente interesse das indústrias de alimentos por incorporar compostos bioativos em suas formulações a fim de desenvolver alimentos funcionais e nutracêuticos (Lee e McClements, 2010). As emulsões são sistemas coloidais que consistem em duas fases imiscíveis, que podem ser de óleo em água ou água em óleo. Alimentos, pesticidas e fármacos têm utilizado emulsões para encapsular, proteger e distribuir componentes lipofílicos, como por exemplo, o óleo de pescado (Karthik e Anandharamakrishnan, 2016).

Entre os numerosos compostos bioativos a que se associa um efeito saudável quando incorporados na dieta destacam-se os ácidos graxos insaturados de cadeia longa, particularmente os da série ômega 3. O óleo de pescado constitui uma fonte natural de ácidos graxos insaturados (Karthik e Anandharamakrishnan, 2016; Shahidi, 2015). No entanto, a produção de alimentos enriquecidos com ácidos graxos insaturados (AGI) é tarefa difícil,

devido à sua baixa solubilidade em água e susceptibilidade a oxidação (Augustin e Sanguansri, 2015). Nesse sentido a encapsulação por formação de emulsões serve como uma alternativa tecnológica que permite resolver esses problemas.

A quitosana, um polímero catiônico derivado de recursos naturais renováveis, vem sendo estudada como material de parede devido as suas características, como biodegradabilidade e propriedades formadoras de filme (Contri *et al.*, 2014). A gelatina é uma proteína derivada da hidrólise parcial do colágeno animal, e possui grande número de diferentes grupos funcionais acessíveis na sua estrutura. Seu uso em alimentos se destaca devido ao seu alto teor de aminoácidos como a glicina, prolina e alanina, agregando valor nutritivo ao alimento por ser totalmente digerível. A adição de gelatina na formação de emulsões pode melhorar fluidez de emulsões, e prevenir coalescência e separação de fases em diferentes sistemas de emulsão em que estão dispersos óleos e glóbulos de gorduras (Duconseille *et al.*, 2015; Sahoo *et al.*, 2015). Por apresentar as vantagens mencionadas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da substituição parcial de quitosana por gelatina na formação de emulsões estáveis para encapsular concentrados de ácidos graxos insaturados obtidos de óleo de vísceras de carpa comum.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS DE PAREDE

Quitosana: a quitosana (grau de desacetilação de $86 \pm 1\%$ e massa molar de 153 ± 2 kDa) foi produzida a partir de resíduos de camarão (*Penaeus brasiliensis*) (Weska *et al.*, 2007). A quitina foi isolada através das etapas de desmineralização, desproteinização e desodorização/despigmentação. Após foi realizada reação de desacetilação da quitina, obtendo-se ao final do processo a quitosana. A quitosana foi purificada e seca em leito de jorro até umidade comercial (10,0%, em base úmida) (Dotto *et al.*, 2011).

Gelatina: A gelatina de peles de suíno de grau alimentício/farmacêutico (Tipo A) com força do gel de 308 ± 5 g e ponto de fusão de $28,5 \pm 0,5$ °C foi adquirida da Sigma-Aldrich (Merck, São Paulo, Brasil).

2.2. CONCENTRADOS DE AGI

O óleo bruto foi extraído de vísceras de carpa comum (*Cyprinus carpio*) por método termomecânico. O óleo bruto passou pelas etapas do processo de refino químico (degomagem, neutralização, lavagem, secagem e branqueamento). O óleo branqueado foi submetido à reação de hidrólise química com KOH alcoólico como catalisador, obtendo-se os ácidos graxos livres, os quais foram misturados a uma solução alcoólica de ureia para complexação dos ácidos graxos saturados e obtenção da fração concentrada de AGI (Crexi *et al.*, 2012). Foi calculado o índice de peróxido (Cd 8–53) dos concentrados de AGI (AOCS 1980). A análise do perfil de ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa (Varian-3400 CX, Palo Alto, USA) (Metcalf *et al.*, 1966).

2.3. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES DE CONCENTRADOS DE AGI COM POLÍMEROS

O método de emulsão óleo-água foi usado para obter as suspensões. Inicialmente foram preparadas duas fases. Na fase aquosa, foram preparadas soluções de concentração 2 % (m/v) contendo os biopolímeros. Foram elaboradas uma solução com quitosana pura (como controle) e duas soluções com substituições de 25% e 50% (m/m) de quitosana por gelatina, respectivamente. As soluções aquosas obtidas foram agitadas (300 rpm) em agitador magnético à temperatura ambiente. Na fase oleosa, os concentrados de AGI (proporção AGI:material de parede de 1:2) e o tensoativo Tween 80 (5% m/m em relação ao material de parede) foram vertidos na fase aquosa. Após, as soluções foram homogeneizadas em agitador mecânico (Dremel, 1100-01, São Paulo, Brasil) a 10.000 rpm por 10 min.

A estabilidade das emulsões foi determinada segundo Klaypradit e Huang (2008), em tubos de ensaio durante 30 dias. A análise do potencial Zeta foi utilizada para refletir o potencial de superfície das partículas (Ahmad *et al.*, 2011). A distribuição de tamanho e índice de polidispersão foram determinadas utilizando o método de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, UK) (Ahmad *et al.*, 2011). A turbidez foi determinada usando espectrofotômetro (Biospectro, SP-22, Curitiba, Brasil).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS CONCENTRADOS DE AGI

A Tabela 1 apresenta a soma dos ácidos graxos presentes nos concentrados de AGI. A fração não complexada, contendo os concentrados, apresentou um teor total de cerca de 88,2% de AGI. Crexi *et al.* (2012) encontraram cerca de 68% de AGI em óleo de carpa refinado, mostrando que o processo de concentração de óleo pela complexação de ureia foi efetivo.

Tabela 1 – Soma dos ácidos graxos presentes nos concentrados de AGI obtidos de vísceras de carpa (*Cyprinus carpio*).

Ácidos graxos	Concentrados de AGI (%)*
\sum AGS (%)	7,5 \pm 0,3
\sum AGMI (%)	38,2 \pm 0,1
\sum AGPI (%)	50,0 \pm 0,2
\sum AGni (%)	4,3 \pm 0,2

* Média \pm desvio padrão (n = 3). \sum AGS: Soma dos ácidos graxos saturados; \sum AGMI: soma dos ácidos graxos monoinsaturados; \sum AGPI: soma dos ácidos graxos poli-insaturados; \sum AGni: Soma dos ácidos graxos não identificados.

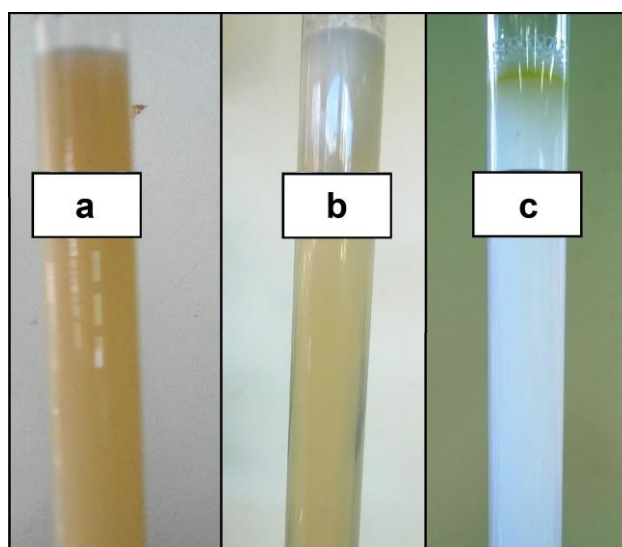
Os ácidos graxos da série omega-3 (ácido α -linolênico (C18: 3), ácido eicosatrienóico (C20: 3), ácido eicosapentaenóico-EPA (C20: 5), ácido docosahexaenóico-DHA (C22: 6) foram aproximadamente 54% do total, e o ácido linoléico (C18: 2 - ω 6), importante na síntese de ácido araquidônico, apresentou aproximadamente 16% do total de ácidos graxos, sendo então os concentrados uma rica fonte de ácidos graxos essenciais. O valor de peróxido dos

concentrados de AGI foi de $3,6 \text{ meq kg}^{-1}$, estando dentro dos padrões de qualidade desejados (ANVISA, 1999).

3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES

Como pode ser visto na Figura 1, após a homogeneização as emulsões formadas de quitosana pura (Fig. 1(a)) e proporção de quitosana:gelatina 75%:25% (Figuras 1(b)) apresentaram-se estáveis após 30 dias de armazenamento. Porém, a suspensão com substituição de 50% de gelatina não foi capaz de formar emulsão, apresentando separação de fases (Figura 1 (c)). Sabe-se que a gelatina tem sido um tensoativo eficiente, capaz de atuar como emulsionante em emulsões de óleo em água. No entanto, quando usado em grande proporção pode produzir gotas relativamente grandes, prejudicando a estabilidade (Piorkowski e McClements, 2014).

Figura 1 – Emulsões formadas utilizando como material de parede: (a) 100% quitosana, (b) 75%:25% quitosana:gelatina e (c) 50%:50% quitosana –gelatina.



A Tabela 2 apresenta os valores de potencial Zeta, distribuição de tamanho e índice de polidispersão das partículas presentes nas emulsões formadas. Os valores de potencial Zeta foram positivos com carga interfacial de 26,4 e 31,2 mV para a emulsão com quitosana pura e a adicionada de 25% de gelatina, respectivamente. Os resultados positivos podem ser atribuídos à presença de quitosana, que apresenta uma carga positiva na molécula quando em um meio ácido. Os valores de potencial Zeta acima de 20 mV sugerem emulsões estáveis, devido à repulsão entre as partículas e impedem a agregação (Piorkowski e McClements, 2014). A diminuição da carga de gotículas nas misturas pode ser explicada pela substituição parcial de quitosana (biopolímero catiônico), para a gelatina que é um biopolímero anfotérico e, portanto, não causa carga na superfície das gotas.

A substituição de 25% de quitosana por gelatina proporcionou uma diminuição significativa no tamanho das partículas (de 480 nm para 156 nm) (Tabela 2). Menores tamanhos de partículas proporcionam a formação de emulsões mais estáveis, com menor turbidez (Tabela 2) e maior transparência. Por outro lado, a taxa de oxidação dos lipídeos

aumenta à medida que o tamanho da partícula diminui, devido à maior área de superfície exposta à fase aquosa (Osborn e Akoh, 2004). As amostras apresentaram índice de polidispersão menor que 0,3 (Tabela 2), com distribuição monomodal, indicando homogeneidade, com as gotículas distribuindo-se em uma faixa estreita.

Tabela 2 – Valores de potencial Zeta, distribuição de tamanho e índice de polidispersão para as emulsões formadas.

Material de Parede	Potencial Zeta* (mV)	Distribuição de tamanho* (nm)	Índice de polidispersão*	Turbidez*
quitosana pura	$30,2 \pm 0,3^a$	$480,2 \pm 7,1^a$	$0,263 \pm 0,003^a$	0.542 ± 0.003^a
75%: 25% quitosana:gelatina	$26,4 \pm 0,8^b$	$156,8 \pm 3,4^b$	$0,279 \pm 0,024^a$	0.473 ± 0.005^b

* Média \pm desvio padrão (n = 3). Sobrescritos com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (p < 0,05).

4. CONCLUSÃO

Foram preparadas emulsões de concentrados de ácidos graxos insaturados (AGI) adicionados dos polímeros quitosana na forma pura e substituída parcialmente por gelatina. A substituição de 50% de gelatina impossibilitou a formação de emulsão. As emulsões com quitosana pura e 75%:25% de quitosana:gelatina foram estáveis durante 30 dias, apresentaram potencial Zeta positivo e índice de polidispersão abaixo de 0,3. A substituição de 25% de quitosana por gelatina nas emulsões provocou diminuição no tamanho da partícula (de 480 nm para 156 nm) e na turbidez. Estes resultados demonstram que a proporção dos polissacarídeos na composição das emulsões tem um papel importante para a formação e utilização das emulsões.

5. REFERENCIAS

- AHMAD, J.; KOHLI, K.; MIR, S. R.; AMIN S. Formulation of self-nanoemulsifying drug delivery system for telmisartan with improved dissolution and oral bioavailability. *J. Dispersion Sci. Technol.*, v. 32, p. 958-968, 2011.
- ANVISA. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 1999, 82.
- AOCS. American Oil Chemists' Society. Official and Tentative Methods of American Oil Chemists' Society, 3rd edn. USA, Champaign, 1980.
- AUGUSTIN, M. A.; SANGUANSRI, L. Challenges and solutions to incorporation of nutraceuticals in foods. In: Doyle M. P.; Klaenhammer T. R. (Eds.). *Ann. Rev. Food Sci. Technol.*, v. 6, p. 463-477, 2015.
- CONTRI, R. V.; SOARES, R. M. D.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES S. S. Structural analysis of chitosan hydrogels containing polymeric nanocapsules. *Mater. Sci. Eng. C*, v. 42, p. 234-242, 2014.

- CREXI, V. T.; MONTE, M. L.; MONTE, M. L.; PINTO, L. A. A. Polyunsaturated fatty acid concentrates of carp oil: chemical hydrolysis and urea complexation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 89, p. 329-334, 2012.
- DOTTO, G. L.; SOUZA, V. C.; PINTO, L. A. A. Drying of chitosan in a spouted bed: The influences of temperature and equipment geometry in powder quality. *LWT – Food Sci. Technol.*, v. 44, p. 1786-1792, 2011.
- DUCONSEILLE, A.; ASTRUC, T.; QUINTANA, N.; MEERSMAN, F.; SANTE-LHOUTELLIER, V. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food Hydrocolloid.*, v. 43, p. 360-376, 2015.
- ESQUERDO, V. M.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. Nanoemulsions containing Unsaturated fatty acid Concentrates. In: Grumezescu, A. M. (Eds.), *Emulsions: Nanotechnology in the Agri-Food Industry* (pp.71-100), Cap. 3, Ed. Elsevier. 2016
- KARTHIK, P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Enhancing omega-3 fatty acids nanoemulsion stability and in-vitro digestibility through emulsifiers. *J. Food Eng.*, v. 187, p. 92-105, 2016.
- KLAYPRADIT, W.; HUANG, Y. W. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *LWT – Food Sci. Technol.*, v. 41, p. 1133-1139, 2008.
- LEE, S.J.; MCCLEMENTS, D.J. Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. *Food Hydrocolloids*, v. 24, p. 560-569, 2010.
- METCALFE, L. D.; SCHIMITZ, A. A. PELKA J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. *Anal. Chem.*, v. 38, p. 510, 1966.
- OSBORN, H. T.; AKOH, C. C. Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions. *Food Chem.*, v. 84, p. 451-456, 2004
- PIORKOWSKI, D. T.; MCCLEMENTS, D. J. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, v. 42, p. 5-41, 2014
- QADIR, A.; FAIYAZUDDIN, M. D.; HUSSAIN, M. D. T.; ALSHAMMARI, T. M.; SHAKEEL, F. Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion. *J. Mol. Liq.*, v. 214, p. 7-18, 2016
- SAHOO, N.; SAHOO, R. K.; BISWAS, N.; GUHA, A.; KUOTSU K. Recent advancement of gelatin nanoparticles in drug and vaccine delivery. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 81, p. 317-331, 2015.
- SHAHIDI, F. Omega-3 fatty acids and marine oils in cardiovascular and general health: A critical overview of controversies and realities. *J. Funct. Foods*, v. 19, p. 797-800, 2015.
- WESKA, R. F.; MOURA, J. M.; BATISTA, L. M.; RIZZI, J.; PINTO L. A. A. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. *J. Food Eng.*, v. 80, p. 749-753, 2007.