Universidade Federal do Rio de Janeiro

ENCAPSULAMENTO DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) POR *SPRAY-DRYING*

André Mesquita Magalhães Costa

Rio de Janeiro

2014

André Mesquita Magalhães Costa

ENCAPSULAMENTO DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) POR *SPRAY-DRYING*

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessário à obtenção do Grau de Mestre em Nutrição Humana.

Orientadores: Prof.ª Dr.ª Anna Paola Trindade Rocha Pierucci, Prof. Dr. Alexandre Guedes Torres e Prof.ª Dr.ª Cristiana Pedrosa Melo Porto

Rio de Janeiro

2014

ENCAPSULAMENTO DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) POR *SPRAY-DRYING*

André Mesquita Magalhães Costa

Orientadores: Prof.ª Dr.ª Anna Paola Trindade Rocha Pierucci, Prof. Dr. Alexandre Guedes Torres e Prof.ª Dr.ª Cristiana Pedrosa Melo Porto

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessário à obtenção do Grau de Mestre em Nutrição Humana.

Aprovado por:

_____

Presidente: Anna Paola Trindade Rocha Pierucci, DSc., INJC/UFRJ

_____

Prof Maria das Graças Tavares do Carmo, DSc., INJC/UFRJ

_____

Profª Mariana Costa Monteiro, DSc., INJC/UFRJ

_____

Profª Priscilla Vanessa Finotelli, DSc., Faculdade Farmácia/UFRJ

Rio de Janeiro

2014

Costa, André Mesquita Magalhães

Encapsulamento de ácido linoleico conjugado (CLA) por spray-drying / André Mesquita Magalhães Costa. -- Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Nutrição, 2014.

xix, 86 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Anna Paola Trindade Rocha Pierucci, Alexandre Guedes Torres, Cristiana Pedrosa Melo Porto.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Instituto de Nutrição, Programa de Pós-graduação em Nutrição, 2014.

Referências bibliográficas: f. 100 – 104.

1. Suplementos Dietéticos. 2. Ervilhas - química. 3. Proteínas - química. 4. Ácidos Linoleicos Conjugados - farmacologia. 5. Ácidos Linoleicos Conjugados – química. 6. Tecnologia Farmacêutica - métodos. 7. Tecnologia de Alimentos. 8. Estabilidade de Medicamentos. 9. Conservação de Alimentos - métodos. 10. Peroxidação de Lipídeos. 11. Nutrição - Tese. I. Pierucci, Anna Paola Trindade Rocha. II. Torres, Alexandre Guedes. III. Porto, Cristiana Pedrosa Melo. IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição, Programa de Pós-graduação em Nutrição. V. Título.

Aos meus pais, à minha irmã e aos meus avós.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me dar forças todos os dias para lutar pelos meus ideais;

Aos meus orientadores, profª Anna Paola, profº Alexandre e profª Cristiana, por acreditarem em mim e no meu trabalho. Pela oportunidade de poder realizar o curso de mestrado e poder aprender diversas coisas com os senhores. Por servirem de exemplos para serem seguidos e o mais importante, por estarem sempre presente nas horas que precisei;

As minhas "quase" orientadoras Camila e Juliana pela imensurável generosidade e pelas palavras de conforto nos momentos difíceis, porque mesmo defendo o doutorado as duas sempre tiveram tempo e paciência comigo;

A minha família que sempre me apoiou em todas as minhas decisões e que faz de tudo para eu alcançar os meus objetivos;

Aos meus amigos do DAFEE, principalmente Ana Carolina, Elisa, Luiz, Paola e Renata pelo companheirismo e pela disposição em ajudar o próximo. Mas acima de tudo, agradeço pelas inesquecíveis saídas para o "Buxixo";

Aos alunos do LBNA, por me receberem de braços aberto no laboratório e pela agradável convivência;

Aos meus melhores amigos, Amanda, Dau, Guilherme, Lívia e Luiza, pelo apoio durante o mestrado e pelo empenho de todos para a realização de nossas sociais e PPPs, diante da rotina atribulada de todos;

À professora Verônica Calado, por estar sempre disposta a ajudar e pelo exemplo de pessoa, pesquisadora e professora;

À Sirley, pela ajuda nas análises de TGA e DSC;

À Bianca, por ser um exemplo de humildade e por toda ajuda nas análises de caracterização;

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos que fizeram parte desse trabalho.

"Os seus dias de luta
são as nossas noites de glória"
Charlie Brown Jr.

RESUMO

ENCAPSULAMENTO DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) POR *SPRAY-DRYING*

André Mesquita Magalhães Costa

Orientadores: Anna Paola Trindade Rocha Pierucci, Alexandre Guedes Torres e Cristiana Pedrosa Melo Porto

O encapsulamento do CLA pode ser empregado para aumentar a estabilidade do nutriente e o enriquecimento/fortificação de alimentos com o mesmo, visando à promoção de saúde. O processo de microencapsulamento é afetado pela composição da matriz encapsulante (ME). Embora existam materiais de parede (MP) já estabelecidos, há uma intensa busca por novos materiais com propriedades distintas. O objetivo geral deste trabalho foi microencapsular CLA utilizando proteínas de ervilha na forma isolada (IPE) ou concentrada (CPE) como únicas constituintes da ME ou associadas à maltodextrina (M), ou carboximetilcelulose (CMC). Foram secas em *spray-drying* 10 formulações contendo 3,7% de sólidos totais, nas formulações com CMC, e 8,6% nas demais. Os componentes da ME e a razão núcleo:ME variaram nas formulações sendo: 1) CLA:IPE (1:2); 2) CLA:CPE (1:2); 3) CLA:IPE (1:3); 4) CLA:CPE (1:3); 5) CLA:IPE (1:4); 6) CLA:CPE (1:4); 7) CLA:M:IPE (1:1:3); 8) CLA:M:CPE (1:1:3); 9) CLA:CMC:IPE (1:1:3); e 10) CLA:CMC:CPE (1:1:3). As micropartículas produzidas foram caracterizadas quanto a: retenção de CLA, por CG, eficiência de microencapsulamento (EM), tamanho de partícula (difração à laser) e teor umidade. Todas as formulações apresentaram valores satisfatórios de retenção de CLA e de umidade. No entanto, as micropartículas revestidas por CPE apresentaram maiores valores de EM (p<0,05). Embora a adição de carboidratos na ME tenha aumentado a EM, a presença de CMC nas formulações foi responsável por aumentar a dispersão na distribuição no tamanho das mesmas. As formulações CLA:CPE (1:4) e CLA:M:CPE (1:1:3) apresentaram os resultados mais promissores e foram analisadas quanto a: espectroscopia de infravermelho (FTIR), estabilidade térmica (TGA), calorimetria diferencial de varredura (DSC), solubilidade, dispersibilidade e morfologia (MEV). Além disso, a estabilidade oxidativa do CLA foi determinada durante dois meses à temperatura ambiente pela produção de compostos voláteis e variação da concentração de CLA e do seu perfil de isômeros. O

microencapsualmento não alterou a estabilidade térmica do CLA. As micropartículas de CLA:M:CPE (1:1:3) apresentaram superfície com menor grau de rugosidade e ausência de aglomeração. Além disso, demonstraram maiores valores de solubilidade, dispersibilidade e temperatura de transição vítrea (Tg). A concentração de CLA e o perfil de isômeros não variou durante o teste de estabilidade nas duas formulações. Dentre os compostos voláteis identificados, o heptanal foi utilizado como marcador da oxidação de CLA, havendo um incremento significativo de sua concentração nos primeiros 30 dias nas duas micropartículas e com manutenção dessas concentrações até o final do estudo. Portanto, a utilização de proteínas de ervilha no microencapsulamento de CLA foi eficaz em manter o mesmo estável durante dois meses à temperatura ambiente. Embora a adição de M na ME não tenha influenciado a estabilidade oxidativa das partículas, a presença do carboidrato melhorou as características físico-químicas, viabilizando a inserção das micropartículas em diversos alimentos. Além disso, os resultados presentes nessa dissertação demonstram uma nova aplicação das proteínas de ervilha, um MP natural, de baixo custo, sustentável e hipoalergênico.

Palavras-chave: CLA, MICROENCAPSULAMENTO, SPRAY-DRYING, CONCENTRADO PROTEICO DE ERVILHA, MALTODEXTRINA, CARBOXIMETILCELULOSE, OXIDAÇÃO LIPÍDICA.

ABSTRACT

ENCAPSULATION OF CONJUGATED LINONEIC ACID (CLA) BY *SPRAY-DRYING*

André Mesquita Magalhães Costa

Orientadores: Anna Paola Trindade Rocha Pierucci, Alexandre Guedes Torres e Cristiana Pedrosa Melo Porto

Microencapsulation of CLA could be employed to increase the stability of the nutrient and in the enrichment of food, aiming at health promotion. The microencapsulation process is strongly affected by the composition of the wall system (WS). Although there are several established wall materials (WM), the search for new materials with distinct functionalities is intense. The objective of this work was to investigate the use of pea protein isolated (PPI) or concentrate (PPC), alone or combined with maltodextrin (M) or caboxymethylcellulose (CMC), as WS for microencapsulation of CLA. CLA was microencapsulated by spray-drying in 10 different feed emulsions with a total solid concentration of 8.6%, except the ones containing CMC (3.7%). WS components and core:WS ratios varied in the formulations, as follows: 1) CLA:PPI (1:2); 2) CLA:PPC (1:2); 3) CLA:PPI (1:3); 4) CLA:PPC (1:3); 5) CLA:PPI (1:4), 6) CLA:PPC (1:4); 7) CLA:M:PPI (1:1:3); 8) CLA:M:PPC (1:1:3); 9) CLA:CMC:PPI (1:1:3); and 10) CLA:CMC:PPC (1:1:3). Physical-chemical properties of the CLA microparticles were characterized by CLA retention, by GC, microencapsulation efficiency (ME), particle size (laser diffraction) and moisture content. All microparticles had satisfactory values of CLA retention and moisture content. CLA microparticles coated with PPC had better ME values, the addition of carbohydrate in the WS improved the ME values, however the CMC addition increased the size variation of the PPI and PPC microparticles. CLA:PPC (1:4) and CLA:M:PPC (1:1:3) showed the most promising results and were further characterized (infrared absorption spectrometry, thermal stability, differential scanning calorimetry, solubility, dispersibility and morphology) and their oxidative stability during two months of storage at room temperature was evaluated by CLA isomer profile and quantification of CLA and volatile compounds. CLA microencapsulation did not modify the thermal stability of the core. CLA:M:PPC (1:1:3) microparticles did not present a rough surface topography, agglomeration problems and particles varying greatly in size. They also showed better solubility, dispersibility and higher glass transition temperature (Tg) values.

CLA isomer profile and CLA quantification did not fluctuate during the stability test in the two formulations. Among the volatile compounds identified, heptanal was considered a marker of CLA oxidation and its concentrations increased up to 30 days and stabilized thereafter in the two types of microparticles during the stability test. Thus the microencapsulation process utilizing pea proteins as WM was able to keep the CLA stable for two months at room temperature. Although the addition of M did not influence the oxidative stability of CLA, it improved physical-chemical characteristics of the microparticles that could enable its addition in food. Besides, the results in this work showed a new application of pea protein, a natural, low cost, sustainable and hypoallergenic WM.

Keywords: CLA, MICROENCAPSULATION, SPRAY-DRYING, PEA PROTEIN CONCENTRATE, MALTODEXTRIN, CARBOXYMETHYLCELLULOSE, LIPID OXIDATION.

Trabalhos decorrentes da presente dissertação

1 Artigo aceito para publicação (ANEXO 1)

- COSTA, A.M.M., NUNES, J.C., LIMA, B.N.B, CALADO, V.M.A., PEDROSA, C., TORRES, A.G., PIERUCCI, A.P.T.R. Effective microencapsulation in pea protein stabilized Conjugated Linoleic Acid (CLA) stored at room temperature. Food Chemistry. 2014. 168, 157-166.

2 Resumos apresentados em congressos e eventos científicos

SAHIUM, P.E.A.V.S., ALMEIDA, M.F., COSTA, A.M.M., NUNES, J.C., PEDROSA, C., TORRES, A.G., PIERUCCI, A.P.T.R. Microencapsulamento de ácido linoleico conjugado (CLA) em matrizes poliméricas, por spray-drying. In: XXXIV Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Tecnológica, Artística e Cultural/ UFRJ; 2012. Anais da XXXIV JICTAC/ UFRJ, 2012.

MARTIRE, F.R., COSTA, A.M.M., NUNES, J.C., PEDROSA, C., TORRES, A.G., PIERUCCI, A.P.T.R. Utilização de proteínas de ervilha (*Pisum sativum*) no microencapsulamento de ácido linoleico conjugado (CLA). XXXV Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Tecnológica, Artística e Cultural/ UFRJ; 2013. Anais da XXXV JICTAC/ UFRJ, 2013.

COSTA, A.M.M., NUNES, J.C., COSTA, C.S.C., PEDROSA, C., TORRES, A.G., PIERUCCI, A.P.T.R. Effective microencapsulation in two food-grade materials stabilized Conjugated Linoleic Acid (CLA) stored at room temperature. In: European Symposium on Biopolymers, 2013, Lisboa. Anais do ESBP 2013.

COSTA, A.M.M., NUNES, J.C., PEDROSA, C., TORRES, A.G., PIERUCCI, A.P.T.R. Microencapsulation of conjugated linoleic acid (CLA): effect of wall material and stability. In: 10º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2013, Campinas. Anais do 10º SLACA, 2013.

Lista de figuras

Figura **Página**

Figura 1. Estrutura da molécula de CLA, A: 10-*trans*,12-*cis*, B: 9-*cis*,11-*trans*, C: ácido linoleico 3
Figura 2: Etapas da oxidação lipídica no ácido linoleico 9
Figura 3. Processo de decomposição de hidroperóxidos 10
Figura 4. Reações envolvidas na determinação do índice de peróxido 12
Figura 5. Esquema de funcionamento do Rancimat® 15
Figura 6. Esquema de produção da partículas pelo método de *spray-drying* ... 16
Figura 7. Estrutura molecular tridimensional da vicilina de ervilhas amarelas *Pisum sativum* 17
Figura 8. Estrutura da unidade dimérica da carboximetilcelulose (sal de sódio) 19
Figura 9. Caracterização físico química das micropartículas de CLA 44
Figura 10. Micrografias das micropartículas produzidas 48
Figura 11. Influência do processo de secagem sobre o perfil de isômeros de CLA 51
Figura 12. Cromatograma parcial referente à análise do perfil de isômeros de CLA obtido por CG-FID 52
Figura 13. Perfil de isômeros das micropartículas de CLA durante o teste de estabilidade 53
Figura 14. Quantificação de CLA e atividade de água (Aw) das micropartículas 54
Figura 15. Espectro de massa dos compostos identificados nas microparticulas de CLA durante o estudo de estabilidade 57
Figura 16. Cromatograma parcial da análise de quantificação dos compostos voláteis presentes nas micropartículas de CLA durante o teste de estabilidade obtido por CG-FID 58
Figura 17. Formação de compostos voláteis durante o teste de estabilidade 60
Figura 18. Curva de produção de compostos voláteis obtida pelo método de Rancimat durante o teste de estabilidade 62

Lista de tabelas

Tabela **Página**

Tabela 1. Fatores que influenciam positivamente (inibem) ou negativamente (aceleram) a duração da fase *lag* 8

Tabela 2. Formulação das soluções alimentadoras a serem testadas para o encapsulamento do CLA por *spray-drying* 24

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos (média ± DP) das micropartículas de CLA de acordo com as diferentes razões núcleo:matriz encapsulante e materiais de parede das formulações testadas 40

Tabela 4. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos das micropartículas de CLA, CLA:CPE e CLA:M:CPE. (média ± DP) 42

Tabela 5. Temperatura de transição vítrea (T_g), solubilidade e dispersibilidade das micropartículas de CLA e de seus componentes (média ± DP) 46

Tabela 6. Identificação dos compostos voláteis presentes nas micropartículas de CLA durante o estudo de estabilidade 56

Lista de abreviaturas

ANOVA- Análise de variância;

AV- Ácido *trans*-vacênico;

CG- Cromatografia gasosa;

CLA- do inglês: *conjugated linoleic acid*;

CLAME- CLA *methyl esters*;

CMC- Carboximetilcelulose;

CPE- Concentrado protéico de ervilha;

DE- Equivalente de dextrose;

DSC- do inglês:*Differential Scanning Calorimetry*;

EM- Eficiência de microencapsulamento;

EMAG- Ésteres metílicos de ácidos graxos;

FID- do inglês: *Flame Ionization Detector;*

FTIR- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho;

IMC- Índice de massa corporal;

IPE- Isolado protéico de ervilha;

LRI- do inglês: *Linear retention index*;

M- Maltodextrina;

ME: Matriz encapsulante;

MS- do inglês: *Mass spectrometry*;

p-AnV- Valor de *p*-Anisidina

PBS- do inglês: *Phosphate buffer saline*

PPC- do inglês: *pea protein concentrated*;

PPI- do inglês: *Pea protein isolated*;

PS- do inglês: Particle size;

PV- do inglês: *Peroxide value*;

SA- Solubilidade em água;

SEM- do inglê: *Scanning electron microscopy*;

Span- Índice de espalhamento;

SPME- do inglês: *Solid phase microextraction*;

SW- do inglês: *Solubility in water*;

TBA- Teste do Ácido 2-Tiobarbitúrico;

Tg- Temperatura de transição vítrea;

TGA- Análise termogravimétrica;

TGA- Thermogravimetric analysis;

TOTOX- Valor de oxidação total;

TP- Tamanho de partícula;

XPS- espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X.

Sumário

Seção	Página
1 Introdução	1
2 Objetivos	2
2.1 Geral	2
2.2 Específicos	2
3 Revisão bibliográfica	3
3.1 Ácido Linoleico Conjugado (CLA)	3
3.1.1Biosíntese	4
3.1.1.1Via direta	4
3.1.1.2 Enzima Δ^9-dessaturase	4
3.1.2 Síntese química	5
3.1.3 Bioatividade	5
3.1.4 CLA nos alimentos	6
3.1.5 Consumo de CLA	7
3.2 Oxidação lipídica	7
3.2.1 Conceito	7
3.2.2 Mecanismos	8
3.3 Métodos para determinar a oxidação lipídica	10
3.3.1 Análise sensorial	11
3.3.2 Análise de produtos primários	11
3.3.2.1 Análise de mudanças nos reagentes das reações de oxidação	11
3.3.2.1.1 Oxigênio	11
3.3.2.1.2 Ácidos graxos	11
3.3.2.2 Índice de peróxido (PV)	12
3.3.2.3 Dienos conjugados	12
3.3.3 Produtos secundários	13
3.3.3.1 Teste do Ácido 2-Tiobarbitúrico (TBA)	13
3.3.3.2 Valor de *p*-Anisidina (*p*-AnV)	13
3.3.3.3 Valor de oxidação total (TOTOX)	13
3.3.3.4 Compostos Voláteis	14
3.3.3.5 Ácidos voláteis	14
3.4 Microencapsulamento	15
3.4.1 Materiais de Parede	16
3.4.1.1 Proteinas de ervilha	17
3.4.1.2 Maltodextrina (M)	18
3.4.1.3 Carboximetilcelulose (CMC)	18
3.4.2 Composição da matriz encapsulante	19
3.5 Caracterização de micropartículas	19
4 **Material e Métodos**	22
4.1 Obtenção e caracterização do Isolado Protéico de Ervilha (IPE)	22
4.2 Produção das micropartículas	22
4.2.1 *Spray-drying*	22
4.2.2 Preparo das emulsões alimentadoras	22
4.2.3 Formulação das soluções alimentadoras	23
4.3 Caracterização das micropartículas	25
4.3.1 Umidade	25
4.3.2 Tamanho de partícula (TP)	25
4.3.3 Retenção de CLA	25

4.3.3.1 Lavagem da vidraria 25
4.3.3.2 Transesterificação ácida 26
4.3.3.3 Análise dos EMAG em CG 26
4.3.4 Eficiência de microencapsulamento (EM) 27
4.3.5 Análise centesimal 28
4.3.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) 28
4.3.7 Análise termogravimétrica (TGA) 29
4.3.8 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) 29
4.3.9 Avaliação da morfologia 29
4.3.10 Solubilidade em água (SA) 29
4.3.11 Dispersibilidade 30
4.4 Estudo de estabilidade 30
4.4.1 Análise do perfil e do teor total dos isômeros de CLA nas micropartículas 31
4.4.1.1 Lavagem da vidraria 31
4.4.1.2 Extração dos lipídios 31
4.4.1.3 Transesterificação alcalina 31
4.4.1.4 Transesterificação ácida 31
4.4.1.5 Análise dos EMAG em CG 32
4.4.2 Identificação e quantificação dos compostos voláteis 33
4.4.2.1 Identificação dos compostos voláteis 33
4.4.2.2 Quantificação dos compostos voláteis 33
4.4.3 Atividade de água (A_w) 34
4.4.4 Estabilidade oxidativa 34
4.5 Análises estatísticas 34
5 Resultados e discussão 36
5.1 Desempenho dos materiais de parede 36
5.1 Desempenho dos materiais de parede 36
5.1.1 Retenção de CLA 36
5.1.2 Eficiência de microencapsulamento (EM) 36
5.1.3 Tamanho de particular (TP) 38
5.1.4 Umidade 38
3.2 Caracterização 41
3.2.1 Composição centesimal 41
3.2.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) 42
3.2.3 Estabilidade térmica 45
3.2.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC) 45
3.2.5 Solubilidade 47
3.2.6 Dispersibilidade 47
3.3 Teste de estabilidade 50
3.3.1 Perfil de isômeros 50
3.3.2 Quantificação de CLA 53
3.3.3 Produtos voláteis da oxidação do CLA 54
3.3.3.1 Identificação dos compostos voláteis no CG-MS 54
3.3.3.2 Quantificação dos compostos voláteis no GC-FID 58
3.3.4 Estabilidade oxidativa determinada pelo método de Rancimat® 61
6 Conclusão 63
7 Sugestões para trabalhos futuros 64
8 Referências bibliográficas 65

ANEXO 1 76

1 Introdução

O ácido linoleico conjugado (CLA) é um ácido graxo naturalmente presente em alimentos de animais ruminantes (Pariza *et al*., 1979). Diversas pesquisas já relataram efeitos biológicos do CLA favoráveis à composição corporal, carcinogênese, arteriosclerose, tolerância à glicose e na modulação do sistema imune (Park *et al*., 1997, Ip *et al*., 1999, Kritchevsky *et al*., 2000, Ryder *et al*., 2001, Ramirez-Santana *et al*., 2009).

O CLA refere-se a uma mistura de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico (18:2n-6), com duplas ligações conjugadas. Somente os isômeros 9-*cis*,11-*trans* e 10-*trans*, 12-*cis* são reconhecidos por seus efeitos na saúde humana (Parodi, 1997). As principais fontes dietéticas de CLA na alimentação são o leite e seus derivados, e as carnes de ruminantes, sendo o isômero 9-*cis*,11-*trans* o mais abundante nesses alimentos. Contudo, de acordo com pesquisas acerca da ingestão populacional deste nutriente (Fritsche & Steinhart, 1998, Mustaq *et al.*, 2010, Nunes & Torres, 2010), seu consumo fica muito aquém das 3 g/dia estipuladas para se observar efeitos benéficos na saúde (Ip *et al.*, 1994).

A fortificação/enriquecimento de alimentos com CLA é considerada uma estratégia para promover o aumento do consumo desse nutriente pela população. Mas, a natureza hidrofóbica destas moléculas dificulta sua dispersão em alimentos, e, além disso, ela pode ser facilmente oxidada devido à presença da dupla ligação conjugada (Chen *et al.*, 1997). Neste sentido, o microencapsulamento do CLA em matrizes poliméricas pode ser uma alternativa para o incremento de sua solubilidade e estabilidade em alimentos.

O microencapsulamento é definido como a tecnologia de embalamento de materiais ativos em matrizes encapsulantes poliméricas, obtendo-se partículas de tamanhos na ordem de micrômetros (µm). O encapsulamento visa impedir a interação da substância de interesse com o meio, além de liberá-la a taxas controladas, em condições específicas (Dziezak, 1988). O *spray-drying* é o método de microencapsulamento mais viável economicamente para a produção de micropartículas de grau alimentar, sendo a escolha da matriz encapsulante uma das etapas mais limitantes (Ré, 1998).

Dentre as principais matrizes encapsulantes estudadas na literatura, destacam-se as proteínas, que, além de possuir alto valor nutricional, desempenham propriedades físico-químicas úteis especialmente no microencapsulamento de substâncias hidrofóbicas, como a emulsificação (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Porém, a aplicação de proteínas em processos de microencapsulamento tem sido sucedida em associação à matrizes de natureza glicídica, no intuito de obter melhores rendimento do processo, retenção e estabilidade dos materiais

ativos. Proteínas do soro do leite, em associação a carboidratos, foram testadas no microencapsulamento de CLA por Choi *et al.* (2010), tendo sido verificado que as micropartículas cujas matrizes encapsulantes eram compostas pela associação desses dois materiais apresentaram maiores eficiências de encapsulamento, solubilidade em água e um menor tamanho de partícula, que as compostas pelos materiais isolados. Já Pierucci *et al.* (2007) utilizaram um concentrado proteico de ervilha (CPE) para encapsular α-tocoferol por *spray-drying*, obtendo partículas com alta retenção desta vitamina lipossolúvel, em comparação à matriz polimérica de carboximetilcelulose (CMC), tendo sido apontado o potencial do CPE como uma nova alternativa de matriz encapsulante, de baixo custo, para o microencapsulamentos de moléculas hidrofóbicas.

A utilização de tecnologias que possam contribuir para o aumento da estabilidade do CLA, assim como, a produção de micropartículas com materiais de parede de baixo custo, a caracterização e o estudo da estabilidade das mesmas irão contribuir para o desenvolvimento de aditivos alimentares estáveis e de fácil dispersão em diversos alimentos. Possibilitando assim a fortificação/enriquecimento de alimentos que façam parte do hábito alimentar da população brasileira e dessa forma facilitando o acesso da população ao nutriente. Portanto, o presente trabalho propõe-se aos seguintes objetivos:

2 Objetivos

2.1 Geral

Microencapsular o ácido linoleico conjugado (CLA) em matrizes encapsulantes poliméricas de natureza glicídica e proteica, por *spray-drying*.

2.2 Específicos

1. Testar diferentes formulações para o encapsulamento de CLA com as matrizes encapsulantes: concentrado proteico de ervilha (CPE), isolado proteico de ervilha (IPE), maltodextrina (M) e carboximetilcelulose (CMC);
2. Analisar as micropartículas obtidas quanto às propriedades físicas, químicas e físico-químicas;
3. Avaliar a influência do processo de *spray-drying* sobre a distribuição dos isômeros do CLA;
4. Avaliar a estabilidade do CLA microencapsulado ao longo do 60 dias à temperatura ambiente.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

Durante uma pesquisa onde o objetivo era avaliar a formação de compostos mutagênicos gerados pelo cozimento da carne, foi encontrado no extrato da mesma um componente com atividade anti-carcinogênica (Pariza *et al.*, 1979). Alguns anos depois, esse componente foi identificado por Ha *et al.* (1987) como o CLA. O ácido linoleico conjugado é um termo não específico que se refere aos 56 possíveis isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico (ácido 9-*cis*,12-*cis*-octadienóico) com duplas ligações conjugadas, isto é, separadas apenas por uma ligação simples carbono-carbono (Ip *et al.*, 1991). A presença dessa ligação torna a molécula muito susceptível à oxidação, visto que nos átomos de carbono adjacentes a ela, a ligação covalente carbono-hidrogênio é enfraquecida. A abstração do hidrogênio é facilitada, acelerando assim a oxidação lipídica (McClements & Decker, 1996). No entanto, apenas 2 isômeros 9-*cis*,11-*trans*, o mais abundante nos alimentos fontes, e 10-*trans*,12-*cis* possuem atividade biológica (Pariza *et al.*, 2001).

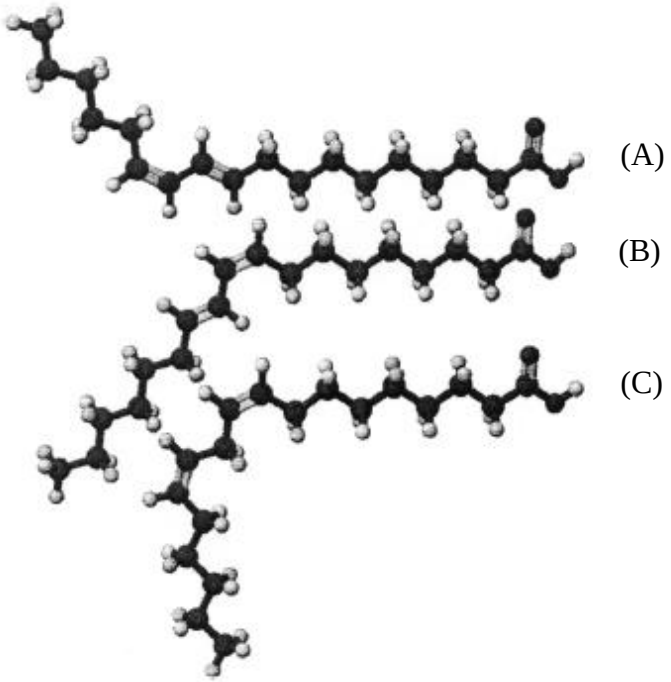

Figura 1. Estrutura da molécula de CLA, A: 10-*trans*,12-*cis*, B: 9-*cis*,11-*trans*, C: ácido linoleico. Baseado em Pariza *et al.* (2001)

3.1.1Biosíntese

Os isômeros de CLA são sintetizados no organismo dos animais ruminantes por meio da biohidrogenação ruminal parcial dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) provenientes da dieta do animal através de duas formas: 1) por via direta, uma vez que isômeros de CLA são intermediários da biohidrogenação; 2) por meio da ação da enzima Δ^9-dessaturase na glândula mamária ou tecido adiposo animal, sobre um intermediário mais avançado da biohidrogenação.

3.1.1.1Via direta

O CLA produzido por essa via é resultado do processo de biohidrogenação realizado por bactérias ruminais sob os ácidos linoleico e linolênico. Após a sua produção no rúmen, o CLA pode ser absorvido ou continuar sendo metabolizado pelas bactérias ruminais até ácido *trans*-vacênico (AV, 18:1 11-*trans*) (Kepler *et al.*, 1966).

3.1.1.2 Enzima Δ^9-dessaturase

Pelo processo de biohidrogenação ruminal os AGPI podem ser metabolizados até ácido esteárico (18:0). Um intermediário desse processo, o ácido *trans*-vacênico (AV, 18:1 11-*trans*) ao ser absorvido, é captado pela glândula mamária e ao sofrer a ação da Δ^9-dessaturase origina o CLA (Corl *et al.*, 2001). A síntese endógena é a principal responsável pela presença do isômero 9-*cis*,11-*trans* no leite. Estudos demonstram que 60-65% do CLA presente no leite de vacas lactantes é de origem endógena (Griinari *et al*., 2000; Corl *et al*., 2001).

A biossíntese de CLA por ruminantes pode ser influenciada negativamente ou positivamente por diversos fatores, tais como: 1) sazonalidade: o conteúdo de CLA no leite das vacas é maior no verão e na primavera, quando comparado ao inverno e ao outono em países frios. Isso se deve pelo fato de que nas estações quentes os animais podem pastar, consumindo mais AGPI provenientes das gramíneas, o que não ocorre em estações frias, onde os animas são confinados e a alimentação é baseada em rações e concentrados protéicos com baixos teores de AGPI (Ledoux *et al*., 1995); 2) dieta do animal: animas alimentados com dietas ricas em AGPI, apresentam maior conteúdo de CLA no leite (Collomb *et al.*, 2004); 3) Fatores inerentes ao animal, como: raça e estágio de lactação (Grummer, 1991; Lawles *et al.*, 1999).

3.1.2 Síntese química

O CLA comercial é obtido por um processo de isomerização alcalina de óleos ricos em ácido linoleico, como: o óleo de girassol e de cártamo Geralmente contem uma mistura equimolar dos isômeros 9-*cis*,11-*trans* e 10-*trans*,12-*cis* (Christie *et al.*, 2001).

3.1.3 Bioatividade

Estudos realizados em modelo animal demonstraram diversos efeitos fisiológicos benéficos relacionados ao CLA dentre eles: 1) inibição de carcinogênese quimicamente induzida (Ip *et al.*, 1994); 2) melhora na resposta imune e redução dos efeitos catabólicos gerados pela estimulação do sistema imune (Cook *et al.*, 1993, Miller *et al.*, 1994); 3) redução de arterioesclerose (Kritchevsky *et al.*, 2000); 4) redução de tecido adiposo e aumento de massa magra (Park *et al.*, 1997); 5) redução na tolerância à glicose e resistência à ação da insulina (Ryder *et al*., 2001).

No entanto, estudos em humanos que avaliaram a sua bioatividade não são tão promissores e apresentam resultados inconclusivos. Diante da epidemia de obesidade mundial e as enfermidades causadas por ela, como a síndrome metabólica e a diabetes do tipo 2, muitos estudos avaliaram o efeito da suplementação de CLA no combate e tratamento da mesma (Blankson *et al*., 2000, Risérius *et al*., 2001, Risérius *et al*., 2004, Joseph *et al*., 2011). Estudos com indivíduos obesos ou com sobrepeso apresentam resultados conflitantes, visto que alguns demonstram redução do percentual de gordura corporal, com redução do diâmetro abdominal sagital, porém sem efeitos sobre variáveis antropométricas (IMC, peso corporal e percentual de massa magra) e metabólicas (glicemia, concentração sérica de insulina e colesterol total e frações) (Blankson *et al*., 2000, Risérus *et al*., 2001; Pfeuffer *et al.*, 2011). No entanto, outros estudos, além de não demonstrarem nenhum efeito do CLA sobre a composição corporal, apresentaram efeitos adversos como aumento da glicemia, da resistência à ação da insulina e da peroxidação lipídica, e redução dos níveis séricos de HDL-colesterol (Risérus *et al*., 2002, Risérus *et al*., 2004, Joseph *et al*., 2011).

Mesmo quando a população de estudo é composta por humanos saudáveis, os resultados da suplementação de CLA são conflitantes. Smedman & Vessby (2001) demonstraram redução do percentual de gordura, sem afetar outras variáveis antropométricas e metabólicas. Enquanto outros demonstram alterações nos lipídios plasmáticos, na leptina sérica e nenhum efeito sobre as variáveis antropométricas (Medina *et al.*, 2000, Noone *et al.*, 2002). Até o momento não existe um consenso dos mecanismos pelos quais o CLA reduz a

adiposidade, no entanto sugere-se que ele atue no metabolismo de energia; na adipogênese; no metabolismo lipídico e na apoptose de adpócitos (Kennedy *et al.*, 2010).

A discrepância entre os resultados observados em estudos realizados em humanos e em animais pode ser relacionada às diferentes dosagens e o isômero de CLA administrado, a duração da suplementação, especificidades fisiológicas de cada espécie, gênero e condição de saúde dos voluntários. O isômero administrado é um fator relevante, pois já é sabido que a bioatividade do CLA é isômero-especifica. Enquanto o isômero 9-*cis*,11-*trans* é responsável pelo efeito anticarcinogênico, o 10-*trans*,12-*cis* está relacionado às propriedades antiobesidade do CLA. Além disso, sabe-se que o efeito desses isômeros pode ser aumentado ou diminuído quando os mesmos são administrados concomitantemente (Pariza *et al*., 2001).

Devido à falta de um consenso quanto à eficácia do CLA e da sua segurança, visto que além dos exemplos dos efeitos adversos citados acima, em modelo animal, a suplementação de CLA parece estar relacionada a um aumento da resistência à ação da insulina e hepatomegalia associada à esteatose hepática (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000, Clément *et al.*, 2002). Neste sentido, em abril de 2007 a ANVISA proibiu a comercialização do CLA isolado ou como ingrediente para a adição em alimentos no Brasil (Brasil, 2007), contudo em outros países a comercialização do nutriente não é proibida.

Diferente dos achados descritos acima, as ações desse nutriente sobre o sistema imune e a perda de massa óssea vêem apresentando resultados promissores. Recentemente Penedo *et al*. (2013) demonstram que a suplementação de CLA, na forma de uma manteiga bioenriquecida, em adultos saudáveis reduziu a concentração sanguínea de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α e promoveu o aumento da concentração plasmática de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Quanto à perda de massa óssea, a administração de CLA associada à suplementação de Cálcio em camundongos parece prevenir a perda óssea e muscular deflagrada pela menopausa (Park *et al*., 2013; Rahman & Fernandes & Williams, 2014). Essas novas perspectivas em relação à bioatividade do nutriente podem estimular a realização de mais pesquisas referentes à sua segurança e dessa forma prover evidência científica para a sua liberação no país.

3.1.4 CLA nos alimentos

Dentre as fontes de CLA na alimentação humana, destacam-se as carnes de animais ruminantes, cujo teor do nutriente pode variar de 7,5 mg/ g de lipídios na carne bovina até 8,2 mg/ g de lipídios na carne de cordeiro. O leite e seus derivados são as principais fontes do

nutriente na população brasileira, variando de 2,5 mg/ g de lipídio na manteiga até 8,4 no leite integral. (Mushtaq *et al.*, 2010, Nunes & Torres, 2010).

3.1.5 Consumo de CLA

O consumo de CLA sofre uma grande variação entre diferentes continentes. Na Alemanha, o consumo estimado de CLA é de 0,43g/ dia pelos homens e 0,35 g/ dia pelas mulheres, no entanto nos Estados Unidos o consumo não atinge nem a metade do que ocorre na Alemanha para homens e mulheres (Fritsche & Steinhart, 1998, Ritzenthaler *et al.*, 2001). Recentemente, dois estudos demonstraram que o consumo médio de CLA no Reino Unido é de 0,13 g/ dia (Mushtaq *et al.*, 2010) e na região sudeste do Brasil é de 0,03 g /dia (Nunes & Torres, 2010).

A variação no consumo diário do nutriente em diferentes países pode ser atribuída: à diferentes hábitos alimentares, ao processamento dos alimentos, à alimentação dos animais e ao método de inquérito dietético (recordatório de 24 h, questionário de freqüência alimentar (QFA), registro alimentar) (Mushtaq *et al.*, 2010).

Estudos em modelo humano, que demonstraram efeitos sobre a composição corporal, utilizaram suplementação de CLA acima de 3g/ dia, essa dose administrada é muito maior que consumo habitual do nutriente (Blankson et al., 2000; Risérius & Berglund & Vessby, 2001; Smedman & Vessby, 2001). Neste sentido, visando o aumento do consumo do mesmo pela população, a elaboração de um produto enriquecido/fortificado com CLA que faça parte do habito alimentar da população brasileira é uma forma de atingir esse objetivo.

3.2 Oxidação lipídica

3.2.1 Conceito

Oxidação lipídica é o termo genérico utilizado para descrever as mudanças químicas que resultam da interação de lipídios com o oxigênio. Na última fase das reações de oxidação lipídica, os ácidos graxos esterificados ao triacilglicerol e aos fosfolipídios se decompõem, produzindo moléculas voláteis e de baixo peso. Esses compostos podem ser tóxicos, produzir alterações de sabor, odor e coloração, além de causarem perdas nutricionais. A presença dos mesmos em um alimento pode torná-lo impróprio para o consumo, ou menos atrativo para o consumidor. Alguns compostos voláteis, mesmo em concentrações muito baixas (ppm) já comprometem a qualidade sensorial do produto (McClements & Decker, 1996, Ferrari, 1998, Dobarganes & Márquez-Ruiz, 2003).

A cinética da oxidação lipídica em alimentos geralmente possui uma fase *lag* seguida por um aumento exponencial na taxa de oxidação. A duração da fase *lag* é muito importante para a indústria alimentícia, visto que nesse período a rancidez não é detectada e a qualidade do produto é alta (McClements & Decker, 1996). Os fatores que influenciam a duração da fase *lag* estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Fatores que influenciam positivamente (inibem) ou negativamente (aceleram) a duração da fase *lag*.

Aceleram	**Inibem**
- Presença de ácidos graxos poliinsaturados	- Baixas temperaturas
- Altas temperaturas	- Quelatos
- Presença de metais	- Ausência de água
- Presença de água	- Ausência de microorganismos
- Presença de microorganismos	- Presença de antioxidantes
- Ausência de antioxidantes	

Baseado em: McClements & Decker (1996).

3.2.2 Mecanismos

A oxidação lipídica pode ocorrer por meio do oxigênio triplete ou singlete. A primeira forma é a mais estudada visando o aumento da estabilidade oxidativa em alimentos. Neste sentido, apenas a oxidação por oxigênio triplete será abordada nessa seção (Kim & Min, 2008).

A oxidação por meio de oxigênio triplete resume-se em 3 etapas: iniciação, propagação e terminação. Estas etapas são demonstradas na **Figura 2**, utilizando-se o ácido linoleico como exemplo. Na etapa de iniciação há a formação de um radical alquil (R•) pela abstração de um hidrogênio do ácido graxo. Esse processo ocorre nos carbonos, onde a energia necessária para retirar um átomo de hidrogênio é a menor. A energia de abstração em um carbono entre duas ligações duplas é menor que a energia em um carbono com apenas uma ligação dupla adjacente, que por sua vez é menor que a energia de um carbono em uma cadeia saturada. A dupla ligação enfraquece a ligação carbono-hidrogênio no carbono adjacente. Uma vez produzido o radical alquil, há um deslocamento da ligação dupla, para estabilizar a cadeia. Quando esse rearranjo da dupla ocorre em um ácido graxo poliinsaturado, forma-se, então, uma dupla ligação conjugada (Kim & Min, 2008).

O oxigênio triplete reage com o radical alquil, formando o radical peroxil (ROO•). A alta energia do radical peroxil lhe permite retirar um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo, produzindo um hidroperóxido (ROOH) e um radical alquil. O radical alquil formado, por sua vez pode abstrair um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo, dando origem a uma reação em cadeia característica da etapa de propagação (Kim & Min, 2008).

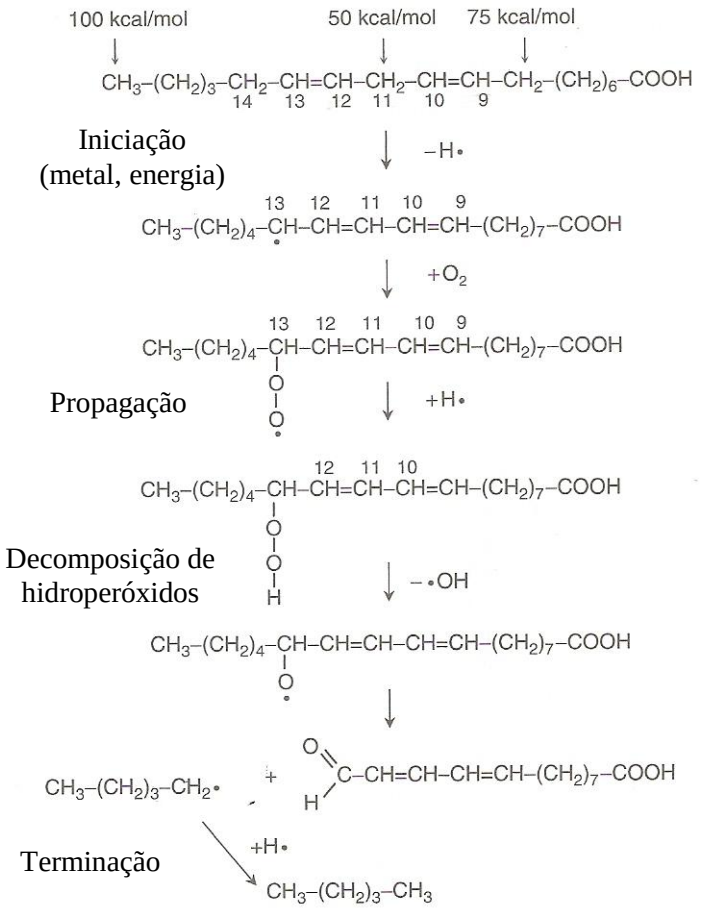

Figura 2: Etapas da oxidação lipídica no ácido linoleico. Baseado em: Kim & Min (2008).

Quando não há mais ácidos graxos para realizar a retirada de hidrogênio, os radicais se combinam entre si, ou se decompõem em outros compostos. Na última fase da oxidação lipídica, terminação, ocorre à formação de produtos voláteis (aldeídos, cetonas, ésteres ácidos, alcoóis) e não voláteis como hidrocarbonetos de cadeia curta. O processo de decomposição de hidroperóxidos está descrtito na **Figura 3**.

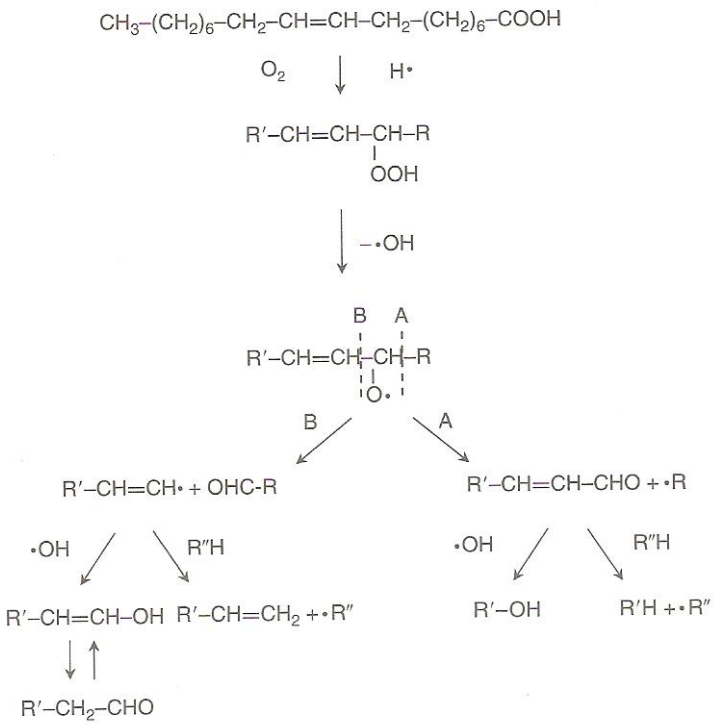

Figura 3. Processo de decomposição de hidroperóxidos. Baseado em: Kim & Min, (2008).

3.3 Métodos para determinar a oxidação lipídica

A oxidação lipídica produz alterações químicas, físicas e sensoriais nos alimentos e essas alterações podem ser mensuradas para avaliar o grau de oxidação. No entanto, não há um método padrão, que pode ser realizado em todos os tipos de amostras e seja capaz de detectar todas as alterações. Os métodos disponíveis podem ser divididos em 2 grupos. O primeiro determina produtos primários da oxidação lipídica e o segundo, produtos secundários (Shahidi & Wanasundara, 2008). A escolha do método dependerá da sua capacidade de predizer o tempo de vida de prateleira e a aceitação do consumidor ao produto. Segundo Frankel (1993), para se ter uma informação fidedigna do grau de oxidação de uma amostra, deve-se empregar mais de um método e quantificar produtos primários e secundários. A mensuração de produtos primários fornece informações sobre os precursores dos compostos responsáveis pelo *flavor*, já os produtos de decomposição são diretamente relacionados aos compostos responsáveis pelo sabor e aroma que afetam a qualidade do produto. Os métodos mais utilizados para avaliar a oxidação lipídica em alimentos são os seguintes:

3.3.1 Análise sensorial

Métodos sensoriais baseados na avaliação das características organolépticas de lipídios fornecem a melhor correlação com o grau de aceitação dos consumidores. A sensibilidade da técnica é dependente do grau de treinamento dos provadores. Neste sentido, os resultados encontrados podem apresentar uma grande variação quando ocorre a troca dos provadores (Frenkel, 1993)

3.3.2 Análise de Produtos primários

3.3.2.1 Análise de mudanças nos reagentes das reações de oxidação

3.3.2.1.1 Oxigênio

Os métodos de absorção de oxigênio têm por base o fato da oxidação das gorduras e óleos se traduzir num consumo mensurável de oxigênio atmosférico (Jadahv *et al.*, 1996). O estudo cinético do consumo de oxigênio, inerente à degradação oxidativa, permite medir a duração da fase de iniciação (período de indução) e/ou o seu alargamento sob o efeito de um agente antioxidante. Com base neste indicador de oxidação encontram-se descritos na literatura métodos manométricos, palarográficos, ponderais ou mesmo cromatográficos (Silva & Borges & Ferreira, 1999). O método ponderal baseia-se na adição de oxigênio aos ácidos graxos para formação de hidroperóxidos ocasionando um aumento de massa durante os estágios iniciais do processo de autoxidação. Neste sentido, a mensuração do tempo de indução pelo ganho de peso é uma alternativa de baixo custo e com um preparo de amostra simples (Shahidi & Wanasundara, 2008). Olcott & Einset (1958) demonstraram que óleos marinhos apresentaram um aumento rápido do peso no final do período de indução e já apresentavam sinais de rancidez com um aumento de 0,3-0,5% no peso. No entanto, o método apresenta as seguintes desvantagens: a) a freqüência de pesagem das amostras impede o monitoramento mais sensível do ganho de peso, um aumento na freqüência de pesagens envolveria pesagens noturnas e a realização do teste em temperaturas baixas ou moderadas iria aumentar o tempo de análise; b) o aquecimento descontínuo da amostra, que deve ser resfriada antes da pesagem, pode levar a resultados não reprodutíveis; c) o método envolve intensa participação humana (Shahidi & Wanasundara, 2008).

3.3.2.1.2 Ácidos graxos

Métodos que avaliam mudanças na composição de ácidos graxos não são muito utilizados na determinação do grau de peroxidação lipídica. Pois com o intuito de obter resultados confiáveis, a extração dos lipídios deve ser total, com subsequente derivatização

para análise em cromatografia gasosa. Além disso, esse método não pode ser realizado em ácidos graxos saturados, visto que ele reflete apenas as mudanças ocorridas em ácidos graxos poliinsaturados durante o processo oxidativo (Shahidi & Wanasundara, 2008).

3.3.2.2 Índice de peróxido (PV)

O índice de peróxido é um método clássico para a quantificação de hidroperóxidos. Esse método baseia-se na redução do grupo hidroperóxido (ROOH) com o íon Iodeto (I^-). A quantidade de Iodo (I_2) liberado é proporcional à concentração de peróxido presente. O I_2 liberado é mensurado pela titulação com uma solução padrão de Tiosulfato de Sódio ($Na_2S_2O_3$), utilizam-se soluções amiláceas como indicadores. As reações químicas envolvidas na determinação do PV estão descritas abaixo (**Figura 4**).

$$ROOH + 2H^+ + 2KI \rightarrow I_2 + ROH + H_2O + 2K^+$$

$$I_2 + 2Na_2S_2O3 \rightarrow Na_2S_4O_6 + 2NaI$$

Figura 4. Reações envolvidas na determinação do índice de peróxido

No início da oxidação lipídica, a taxa de formação de hidropéroxidos é maior que a sua decomposição, mas esse comportamento é revertido em estágios mais avançados. Neste sentido, a monitoração dos hidroperóxidos não pode ser realizada pontualmente. Deve-se avaliá-la ao longo do tempo, pois dessa forma é possível identificar em qual estágio de oxidação está a amostra. Outra desvantagem desse método é a grande quantidade de amostra necessária, tornando-o inviável em processos com baixo rendimento (Kagami *et al.*, 2003, Shahidi & Wanasundara, 2008).

3.3.2.3 Dienos conjugados

A oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados promove a formação de hidroperóxidos e rearranjo das duplas ligações, com consequente formação de dienos ou trienos conjugados. Esses compostos exibem uma intensa absorção a 234 nm e 268 nm, respectivamente. No entanto, este método não é muito utilizado para avaliar a estabilidade oxidativa do CLA, pois o mesmo já possui ligações conjugadas em sua composição (Jimenez & García & Beristain, 2006, Jadahv *et al.*, 1996, Shahidi & Wanasundara, 2008).

3.3.3 Produtos secundários

Os produtos primários (hidroperóxidos) da oxidação lipídica são transitórios e se decompõem em diversos produtos secundários. A quantificação de produtos secundários produz resultados mais confiáveis quanto ao grau de oxidação de óleos e gorduras, visto que esses compostos apresentam odor pronunciado, diferente dos produtos primários que são incolores, inodoros e insípidos (Jadahv *et al.*, 1996, Shahidi & Wanasundara, 2008).

3.3.3.1 Teste do Ácido 2-Tiobarbitúrico (TBA)

O TBA baseia-se na reação colorimétrica entre o ácido 2-tiobarbitúrico e produtos da oxidação de lipídios poliinsaturados, principalmente o malondialdeído. Dependendo da amostra, os resultados podem ser imprecisos, visto que outros compostos, como: proteínas, produtos da reação de escurecimento não enzimático e da degradação de açúcares, podem interferir na formação do complexo colorimétrico do TBA (AOCS, 2004).

3.3.3.2 Valor de *p*-Anisidina (*p*-AnV)

O *p*-AnV é definido como 100 vezes a densidade óptica medida em 350 nm, em uma cubeta de 1,0 cm, contendo uma solução de 1,0 g de óleo em uma mistura solvente/reagente de 100 ml (AOCS, 2004). Esse método quantifica aldeídos, que ao interagir com o reagente de *p*-anisidina, em meio ácido, produz compostos de coloração amarelada. No entanto, assim como o PV, precisa-se de uma grande quantidade de amostra para a sua realização (AOCS, 2004).

3.3.3.3 Valor de oxidação total (TOTOX)

O *p*-AnV geralmente é utilizado na indústria alimentícia em conjunto com o PV para calcular o valor de TOTOX. A equação para a determinação do TOTOX é descrita abaixo **(Equação 1).**

$$\text{TOTOX} = 2\text{PV} + p\text{-AnV} \qquad \textbf{[Equação 1]}$$

Onde: PV: índice de peróxido, *p*-AnV: Valor de *p*-Anisidina.

O TOTOX combina informações sobre o passado do óleo (*p*-AnV) e o seu presente (PV). Ainda que ele possua essa vantagem, os seus resultados devem ser interpretados com cuidado, visto que a soma de duas variáveis com dimensões diferentes, não possui nenhum fundamento científico (Shahidi & Wanasundara, 2008).

3.3.3.4 Compostos voláteis

A quantificação/identificação de compostos voláteis é a técnica que mais se assemelha com a análise sensorial na sua capacidade de predizer o tempo de prateleira do produto e a sua qualidade (Frankel, 1993). As vantagens dessa técnica em relação à avaliação sensorial são: 1) menor custo, visto que não é necessária a utilização de provadores; 2) maior sensibilidade e menor variação, pois esses parâmetros não sofrem a influência subjetiva dos provadores; 3) fornece informações sobre os precursores dos compostos responsáveis pelo *flavor*. Neste método, os voláteis da amostra são extraídos e injetados em um cromatógrafo a gás (CG), que pode ser acoplado a um detector de ionização de chama (FID) para quantificação ou um detector de massas (MS) para identificação. A ausência de solventes, de um preparo de amostra complexo e a possibilidade de analisar matrizes complexas são outros atrativos da técnica (Kataoka & Lord & Pawliszyn, 2000). A microextração em fase sólida (SPME) é um preparo de amostra muito utilizado, que consiste na exposição de uma fibra a uma fase gasosa sobre a amostra (headspace). Nesta etapa, a fibra, que possui uma fase estacionária em sua composição, aprisiona os compostos voláteis e os concentra. Os compostos aprisionados são injetados no CG, ao inserir a fibra no injetor do aparelho, as altas temperaturas do mesmo levam ao desligamento dos compostos voláteis da fase estacionária (Kataoka & Lord & Pawliszyn, 2000, García-Martínez *et al.*, 2009, Yettella & Castrodale & Proctor, 2012).

3.3.3.5 Ácidos voláteis

A avaliação somente do teor de ácidos voláteis pode ser feita por condutimetria ou pelo método de Rancimat®. Este método permite que a estabilidade oxidativa seja determinada automaticamente, sob condições padronizadas. É muito utilizado na indústria de óleos e gorduras, sendo um dos parâmetros mais importantes para a avaliação da qualidade (Kowalski *et al.*, 2004, Velasco & Dobarganes & Márquez-Ruiz, 2000). A análise consiste na quantificação indireta de ácidos voláteis de baixo peso molecular gerados em amostras de óleos aquecidos em altas temperaturas e sob aeração constante. Estes compostos ficam presos na água, alterando e aumentando a sua condutividade. Dessa forma é possível obter o tempo em que ocorre a oxidação máxima do óleo (tempo de indução) (Farhoosh, 2007, Velasco & Dobarganes & Márquez-Ruiz, 2000). A **Figura 5** representa o esquema de funcionamento do Rancimat®.

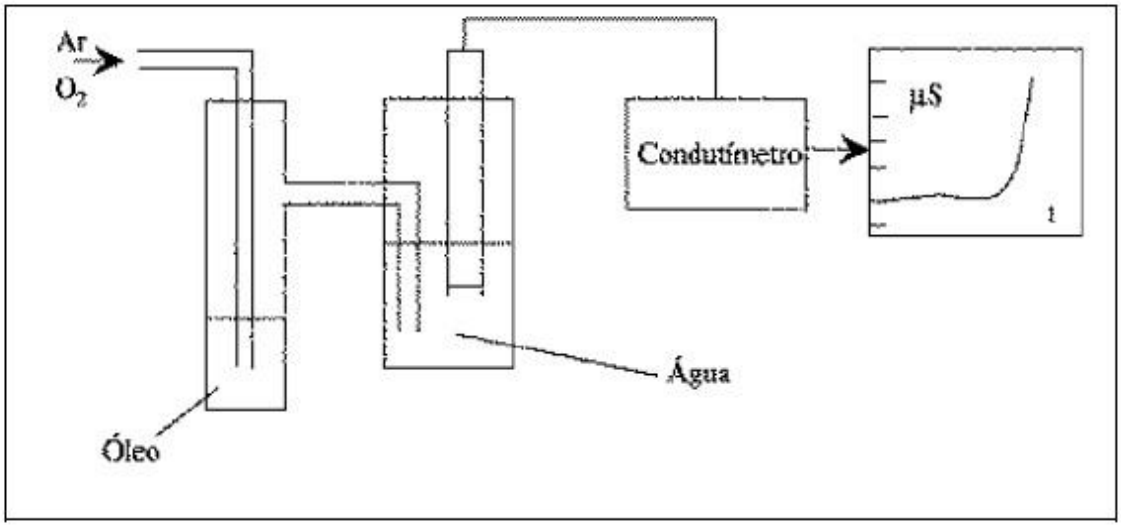

Figura 5. Esquema de funcionamento do Rancimat®. Baseado em: Hamilton et al. (1983)

3.4 Microencapsulamento

Com o aumento da utilização de compostos funcionais na indústria alimentícia, o microencapsulamento vem ganhando cada vez mais destaque, por proteger compostos da rápida inativação dos mesmos, que pode ser causada pelas condições ambientais, de processamento e do trato gastrointestinal. O microencapsulamento pode ser definido resumidamente como um processo no qual uma substância é embalada por outra, conferindo assim proteção por meio de uma barreira física (Nedovic *et al.*, 2011). O material revestido é denominado núcleo ou material ativo encapsulado, e o material que forma o revestimento é conhecido como matriz, material de parede ou encapsulante (Gouin, 2004). Essa tecnologia produz partículas capazes de liberar seus conteúdos em taxas controladas e em sítios específicos, além de impedir a interação do núcleo com componentes presentes nos alimentos, retardando assim o processo de degradação do material de interesse e facilitando a sua inserção em alimentos (McClements & Lesmes, 2009).

Diversas tecnologias podem ser empregadas na produção de compostos microencapsulados, mas o encapsulamento por *spray-drying* é a tecnologia mais difundida, devido à sua flexibilidade e o baixo custo. Este método baseia-se na pulverização (atomização) de uma solução aquosa ou emulsão, contendo o material ativo e a matriz encapsulante, em uma câmera de ar quente, sendo as gotículas secas (pó) recuperadas por meio de ciclone em coletores (Gouin, 2004). O esquema de produção das partículas por *spray-drying* é descrito na **Figura 6**. As partículas formadas podem ser classificadas quanto

ao tamanho, sendo denominadas macrocápsulas (>5000μm), microcápsulas (1-5000μm) ou nanocápsulas (<1μm) (Sanguansri & Augustin, 2006).

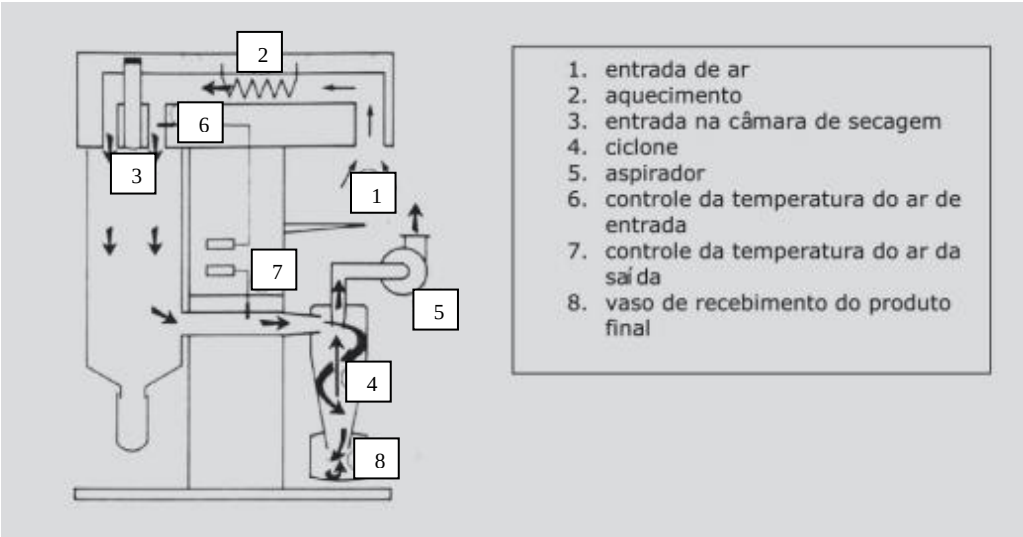

Figura 6. Esquema de produção das micropartículas pelo método de *spray-drying.* Baseado em: Da Silva Lannes & Medeiros (2003).

A solução alimentadora é bombeada e atomizada no interior da câmara de secagem. O ar quente injetado no aparelho seca as gotículas, dando origem às partículas, que são carreadas pelo interior do spray dryer até o ciclone. Esta peça é responsável pela separação das partículas do ar quente injetado. O ar é expelido para o ambiente e as partículas ficam retidas no vaso de recebimento.

3.4.1 Materiais de Parede

Materiais utlizados como encapsulantes devem possuir diversas funcionalidades, como ser biocompatível, ser solúvel em água, mesmo em altas concentrações; possuir propriedades emulsificante; formar filme; e possuir baixa viscosidade (Reineccius, 1988). Dentre todos os materiais, os carboidratos, como: maltodextrinas, dextrinas, amilopectina e a amilose, são os mais utilizados pela indústria alimentícia. Esses materiais são considerados bons agentes encapsulantes, pois exibem baixa viscosidade em altas concentrações e boa solubilidade, mas a maioria deles não possui propriedades emulsificantes (Yoshii *et al*., 2001). No entanto, é descrito que polissacarídeos com propriedades gelificantes, como a carboximetilcelulose, são capazes de produzir emulsões estáveis (Dalgleish, 2006).

As propriedades funcionais das proteínas, especialmente a emulsificação, a gelificação e a formação de espuma, fazem desses compostos excelentes agentes encapsulantes. As

proteínas mais comumente utilizadas são: as do leite, como o Caseinato de Sódio e as proteínas do soro (*whey protein*) e a gelatina (Chen *et al*., 2006).

A procura de novos materias biocompatíveis, sustentáveis e de baixo custo, que possam atuar como matrizes encapsulantes é uma área de grande interesse no campo do microencapsulamento (Gouin, 2004). O uso de proteínas de origem vegetal, como as de leguminosas em processos de encapsulamento é um reflexo dessa tendência (Pierucci *et al*., 2006 e 2007; Pereira *et al*., 2009).

3.4.1.1 Proteínas de ervilha

O isolado proteico de ervilha (IPE), obtido seguindo o método descrito por Rangel *et al*. (2003), apresenta cerca de 90% de seu conteúdo proteico composto pela vicilina. A vicilina é a principal globulina 7S de sementes de ervilha (*Pisum sativum*), e corresponde a até 35% do conteúdo proteico de uma semente madura. Possui estrutura oligomérica de 150 kDa, composta por três subunidades majoritárias de 50 kDa, unidas entre si por interação polar, sendo que cada subunidade possui dois domínios β-pregueados conectados por α-hélices (Pedrosa *et al*., 2000). A Estrutura molecular tridimensional da vicilina de ervilhas amarelas *Pisum sativum* encontra-se na **Figura 7**. Ela apresenta propriedades funcionais (boa solubilidade em água, emulsificação, gelificação e formação de filme) que podem ser úteis para a aplicação deste isolado proteico como material de revestimento para sistemas de microencapsulamento. Algumas pesquisas apresentaram resultados favoráveis utilizando proteínas de ervilha como material de parede no microencapsulamento de vitaminas antioxidantes (Pereira *et al* 2009; Pierucci *et al*., 2006 e 2007).

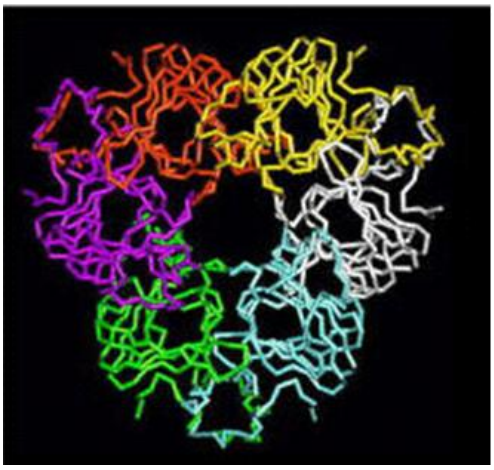

Figura 7. Estrutura molecular tridimensional da vicilina de ervilhas amarelas *Pisum sativum.* Baseado em: Gane & Dunwell & Warwicker (1998).

3.4.1.2 Maltodextrina (M)

A M é derivada da despolimerização enzimática do amido, ou pela ação de ácidos, geralmente utiliza-se o milho como fonte de amido, mas ela também pode ser derivada da batata, mandioca entre outros. Esse carboidrato é definido pelo equivalente de dextrose (DE), que representa a quantidade de açúcares redutores presente em um carboidrato, relativo à dextrose e é expresso em percentual de base seca do mesmo. Neste sentido, o DE é inversamente proporcional ao grau de polimerização e ao peso molecular (BeMiller & Huber, 1996).

Este carboidrato é considerado um bom material de parede, devido ao seu baixo custo, baixa viscosidade em altas concentrações e alta solubilidade, no entanto ele não possui propriedades emulsificantes (Gouin, 2004). Neste sentido, deve ser associado a materiais capazes de reduzir a tensão superficial, como proteínas e gomas, no microencapsulamento de substâncias hidrofóbicas. Nos últimos anos, outras propriedades da maltodextrina começaram a emergir. Kagami *et al* (2003) demonstraram que a adição de maltodextrina em uma matriz encapsulante proteica reduziu a permeabilidade da mesma, provavelmente pela formação de uma barreira ao redor da micropartículas. De acordo com esse fato, Sheu & Rosenbrg (1998) demonstraram que carboidratos aceleram a solidificação da matriz encapsulante durante a secagem. Outros estudos demonstram que a incorporação de carboidratos com alto DE na matriz encapsulante pode influenciar positivamente a estabilidade oxidativa do núcleo, visto que a glicose livre presente nesses materiais pode se ligar à hidroperóxidos, evitando assim as reações em cadeia da peroxidação lipídica, ou reagir com proteínas e formar compostos da reação de Maillard com propriedades antioxidantes (Hogan & O'Riordan & O'Sullivan, 2003, Augustin & Sanguansri & Bode, 2006).

3.4.1.3 Carboximetilcelulose (CMC)

A carboximetilcelulose (CMC) é um polímero hidrofílico de glicose, obtido a partir da modificação da celulose por meio de reação com álcali e ácido cloroacético, havendo a substituição de grupos funcionais por grupamentos carboximetílicos. Dependendo do grau de substituição e de polimerização, são produzidos materiais com variada solubilidade e viscosidade. Na **Figura 8** é demonstrada a estrutura da CMC. Soluções contendo CMC são estáveis e altamente viscosas, neste sentido sua utilização no microencapsulamento de substâncias lipídicas visa estabilizar a emulsão alimentadora (BeMiller & Huber, 1996, Gouin, 2004).

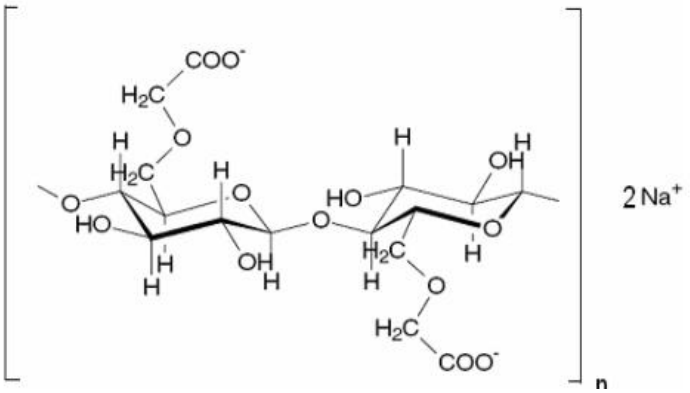

Figura 8. Estrutura da unidade dimérica da carboximetilcelulose (sal de sódio). Baseado em: Szorcsik *et al.* (2006)

3.4.2 Composição da matriz encapsulante

Uma matriz encapsulante composta por diversas substâncias pode ter um desempenho superior ou inferior, quando comparada a uma matriz composta por apenas uma substância. O sucesso da mistura irá depender da estrutura do sistema encapsulante que será formado (Jimenez & García & Beristain, 2006). Pierucci *et al*. (2007), ao encapsular α-tocoferol com quatro matrizes diferentes, demonstrou uma maior retenção do nutriente e um menor tamanho de partícula, nas partículas, cuja matriz era composta por maltodextrina e carboximetilcelulose (CMC), em comparação as partículas, cuja matriz era composta apenas por CMC. No entanto, nesse mesmo estudo, a inserção de maltodextrina em uma matriz protéica teve um efeito completamente inverso, diminuindo a retenção do nutriente e aumentando o tamanho da partícula. No encapsulamento de lipídios, matrizes compostas por diversos ingredientes são largamente utilizadas. Gharsallaoui *et al.* (2010) microencapsulou triglicerídeos de cadeia média em uma matriz contendo maltodextrina, proteína de ervilha e pectina. As partículas produzidas apresentaram boa estabilidade à agregação das gotículas da emulsão, após reconstituição. Choi *et al*. (2010) ao utilizar *whey protein* e maltodextrina para encapsular CLA, produziram partículas com alta retenção de CLA e boa solubilidade em água.

3.5 Caracterização de micropartículas

O conhecimento das propriedades dos alimentos é essencial para otimizar processos e funcionalidades, e para reduzir custos, especialmente no caso de pós produzidos ou usados em indústrias farmacêuticas e alimentícias (Barbosa-Cánovas & Juliano, 2005).

Os alimentos em pó apresentam diferentes propriedades físicas (tamanho, estrutura, distribuição das partículas, densidade aparente, porosidade, solubilidade, molhabilidade, dispersabilidade, temperatura de transição vítrea (T_g), entre outras), sendo que a caracterização destas propriedades ajudam a definir o produto, os parâmetros de secagem e os fenômenos que influenciam no seu comportamento (Teunou & Fitzpatrick & Synott, 1999). Já as propriedades químicas, como retenção do material encapsulado, eficiência de microencapsulamento, dentre outras, estão relacionadas à composição do alimento e suas interações com outras substâncias, como solventes ou outros componentes dentro da sua própria estrutura (Barbosa-Cánovas & Juliano, 2005).

Propriedades como umidade, atividade de água, higroscopicidade e T_g são essências para a estabilidade e o armazenamento dos pós. Scoottitantawat *et al.* (2004) demonstraram uma maior liberação de D-Limoneno, quando o mesmo é armazenado em temperaturas perto da Tg. As mudanças físicas e químicas deflagradas quando o pó é estocado acima da Tg, são explicadas pela mudança de um estado vítreo, onde as moléculas estão mais organizadas, para um estado "borrachudo". Neste estado, as moléculas apresentam uma menor organização e uma maior movimentação, facilitando a difusão dos componentes do núcleo pela matriz encapsulante (Bhandari & Howes, 1999). A solubilidade e a molhabilidade das partículas estão diretamente relacionadas à sua reconstituição (Barbosa-Cánovas & Juliano, 2005).

A microestrutura das partículas está relacionada a propriedades como funcionalidade, estabilidade e fluidez. Micropartículas com indentações e poros na sua superfície podem afetar a retenção/liberação do núcleo, a fluidez e a capacidade de reconstituição do pó. (Rosenberg & Kopelman & Talmon, 1990; Sheu & Rosenberg, 1998; Drusch et al., 2007). A microestrutura de microcápsulas produzidas por *spray-drying* é influenciada pela composição e propriedades da matriz encapsulante, razão núcleo:matriz, parâmetros de secagem e condições de estocagem (Sheu & Rosenberg, 1998). Geralmente, esse parâmetro é avaliado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). De acordo com Aguilera & Stanley (1990), esta técnica permite avaliar as características da superfície e as internas.

O tamanho das partículas influencia diretamente as propriedades funcionais, como solubilidade, dispersibilidade e a liberação do composto de interesse (Pierucci *et al*., 2006, Choi *et al.*, 2010,). A viscosidade da solução alimentadora, a composição e propriedades da matriz encapsulante, o método de dispersão utilizado, os parâmetros de secagem e a razão núcleo:matriz são os fatores que afetam o tamanho de partícula (Tan & Chan & Heng, 2005, Drusch *et al*., 2007, Jafari *et al.*, 2008). A maioria dos estudos utiliza a técnica de difração de lazer para avaliar o tamanho de partícula e os resultados são expressos em diâmetro médio.

Outra propriedade muito importante quando se avalia o processo de microencapsulamento de lipídios, é a eficiência de microencapsulamento (EM). A determinação da EM é mais importante que a determinação da retenção do núcleo, visto que a primeira fornece informações da quantidade de óleo internalizada pela matriz encapsulante, óleo microencapsulado. O óleo não microencapsulado ou óleo de superfície não possui nenhuma barreira física que o impeça de interagir com ambiente, logo a sua estabilidade oxidativa pode ser comprometida. Drusch *et al.* (2007) após encapsularem óleo de peixe em nove matrizes encapsulantes compostas por diferentes carboidratos e proteínas, demonstraram que as micropartículas com menores EM apresentaram a menor estabilidade oxidativa durante a estocagem, maior produção de hidroperóxidos e propanal. Uma menor EM também pode influenciar negativamente a solubilidade, dispersabilidade e molhabilidade das partículas (Vega & Roos, 2006). A viscosidade da solução alimentadora, a composição e propriedades da matriz encapsulante, o método de dispersão utilizado, os parâmetros de secagem e a razão nucleo:matriz são os fatores que além de afetar o tamanho de partícula, também afetam a EM (Tan & Chan & Heng, 2005, Drusch *et al.*, 2007, Jafari *et al.*, 2008). A determinação do óleo não microencapsulado pode ser realizada por extração com solvente e posterior análise gravimétrica para quantificação do mesmo. Recente, Jafari *et al.* (2008) avaliaram se a extração com solvente pode carrear o óleo encapsulado associado ao óleo não microencapsualdo. Neste sentido, aqueles autores quantificaram o óleo não microencapsulado por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) e ao comparar com o método padrão, não encontraram diferença.

4 Material e Métodos

4.1 Obtenção e caracterização do Isolado Protéico de Ervilha (IPE)

O IPE foi obtido através de adaptação do método descrito por Rangel *et al*. (2003), que consiste na separação de proteínas pelo seu ponto isoelétrico. As sementes de ervilha (*Pisum sativum*) foram obtidas em comércio local e moídas em moinho Retsch ZM, utilizando-se peneira com 0,5 mm. A farinha obtida foi desengordurada, com acetona, na proporção, farinha:acetona, 1:10, por meio de agitação magnética por 10 min, decantação por 30 min e posterior troca do solvente. A troca do solvente foi realizada duas vezes e após sua evaporação, a farinha foi incubada por 1 hora e 30 min, a 4ºC, em tampão Tris-HCl 50 mM e NaCl 200 mM (Merck, Alemanha), pH 8,5. O incubado foi centrifugado a 4ºC, a 8000 rpm por 30 min. O pH do sobrenadante obtido foi ajustado, sob agitação, para 4,5 com solução de HCl 3 N (Merck, Alemanha) e centrifugado novamente por 50 min, sob as mesmas condições de velocidade e temperatura descritas anteriormente. O ponto isoelétrico da vicilina é 4,5, dessa forma ao fim da centrifugação o precipitado foi recolhido e armazenado, como isolado protéico.

O IPE produzido foi caracterizado quanto ao teor de proteínas, seguindo metodologia de Lowry *et al*. (1951).

4.2 Produção das micropartículas

4.2.1 *Spray-drying*

As partículas foram produzidas em Mini Spray Dryer Büchi 290 (Büchi Laboratoriums Technik Flawil, Suíça) seguindo as seguintes condições: temperatura de entrada: 184 ± 3,0ºC, temperatura de saída: 88 ± 1,5ºC, 0,3 mm nozzle e alimentação de 6 mL min^{-1}.

4.2.2 Preparo das emulsões alimentadoras

As micropartículas foram constituídas do material ativo CLA 80 % puro, na forma de ácidos graxos livres (1:1, 9c,11t/ 10t,12c) (Tonalin CLA 1000 - Cognis do Brasil) e das matrizes encapsulantes: IPE, concentrado protéico de ervilha comercial (CPE) (Labonatus, Brasil), espessante carboximetilcelulose (CMC) (Latinoquímica, Argentina) e maltodextrina (M) (MOR REX 1910 - Corn Products, Brasil). As emulsões foram preparadas dissolvendo os materiais de parede em água com o auxílio de um agitador magnético por 30 min, após a dissolução do IPE ou do CPE, o CLA foi gotejado nas soluções citadas anteriormente concomitante à agitação em Ultra-Turrax (T 25 – Ika® Labotechnik) (13.500 rpm). Após

dispersão completa do CLA, foi adicionado à emulsão, a solução contendo CMC ou M. A emulsão final sofreu dispersão mecânica novamente por Ultra-Turrax (T 25 – Ika® Labotechnik, EUA) (13.500 rpm/ 2 min) e Ultrasonicador (DRH-UP100H/ Hielscher Ultrasonics, Alemanha) (90% de amplitude/ 1 ciclo/ 2 min).

4.2.3 Formulação das soluções alimentadoras

Foram produzidas 10 diferentes formulações, variando a proporção núcleo:matriz e os componentes da matriz encapsulante, porém todas as formulações apresentaram 8,6% de sólidos totais, exceto as formulações contendo CMC (3,7%) devido à viscosidade, e o teor em gramas do IPE e do CPE adicionado foi calculado em função do conteúdo de proteínas desses materiais. A formulação das soluções alimentadoras encontra-se melhor detalhada na **Tabela 2**. Foram utilizados como critério de elegibilidade os dados obtidos na caracterização das micropartículas obtidas, que incluem as análises de teor de umidade, distribuição do tamanho de partícula, retenção e eficiência de microencapsulamento do CLA.

Tabela 2. Formulação das soluções alimentadoras a serem testadas para o encapsulamento do CLA por *spray-drying*.

Formulação (*p/p*)	Sólidos* (%)	Volume da emulsão (mL)	Componentes quantidade (g)				
			CLA	IPE	CPE	CMC	M
CLA:IPE (1:2)	8.6	150	4.4	8.6	—	—	—
CLA:CPE (1:2)	8.6	150	4.4	—	8.6	—	—
CLA:IPE (1:3)	8.6	150	3.25	9.75	—	—	—
CLA:CPE (1:3)	8.6	150	3.25	—	9.75	—	—
CLA:IPE (1:4)	8.6	150	2.6	10.4	—	—	—
CLA:CPE (1:4)	8.6	150	2.6	—	10.4	—	—
CLA:M:IPE (1:1:3)	8.6	150	2.6	7.8	—	—	2.6
CLA:M:CPE (1:1:3)	8.6	150	2.6	—	7.8	—	2.6
CLA:CMC:IPE (1:1:3)	3.7	350	2.6	7.8	—	2.6	—
CLA:CMC:CPE (1:1:3)	3.7	350	2.6	—	7.8	2.6	—

CLA: ácido linoleico conjugado, IPE: isolado protéico de ervilha, CPE: concentrado protéico de ervilha, CMC: carboximetilcelulose, M: maltodextrina. * Quantidade de sólidos totais das emulsões.

4.4 Caracterização das micropartículas

4.3.1 Umidade

O teor de umidade foi avaliado em balança de umidade (MA35- Hexis, Alemanha), utilizou-se alíquotas de 500 mg.

4.3.2 Tamanho de partícula (TP)

A análise do tamanho de partícula foi realizada em equipamento analisador de tamanho de partículas (Mastersizer 2000-Malvern Instruments, Inglaterra), para partículas com diâmetros na faixa entre 0,1 e 1000 µm, pela técnica de difração de laser. As amostras foram dispersas em água deionizada purificada em sistema Milli-Q na proporção que satisfez o índice de obscuração de 10%, conforme especificação do equipamento. Durante a análise, analisador de tamanho de partículas é programado para executar 3 leituras consecutivas das amostras e fornecer o resultado médio de cada amostra. Os resultados fornecidos pelo equipamento foram apresentados na forma D[0,5], que corresponde ao tamanho máximo em µm de 50% das partículas analisadas, além do índice de espalhamento "span", que corresponde à variação entre os tamanhos das partículas das amostras.

4.3.3 Retenção de CLA

As análises de retenção de CLA nas micropartículas, que corresponde ao total de CLA nas amostras, foram realizadas pela quantificação de ácidos graxos por Cromatografia Gasosa (CG) (Shimadzu, Japão) (Ha *et al*, 1989). Como controle, foi analisado cada material de parede (IPE, CPE, CMC, M) e o núcleo (CLA).

4.3.3.1 Lavagem da vidraria

Todas as vidrarias utilizadas nos experimentos foram previamente lavadas (por rinsagem ou imersão da vidraria) com solução de potassa-alcoólica (KOH 2,5% em álcool comercial), durante 15 minutos, seguido de imersão em ácido nítrico diluído 1:4 (v/v) com água deionizada por pelo menos 2 horas. Essa etapa de lavagem de material é necessária, devido à utilização do detector de ionização em chama (FID, do inglês Flame Ionization Detector) nas análises. Este detector é extremamente sensível para substâncias orgânicas que podem resultar em artefatos nas análises cromatográficas.

4.3.3.2 Transesterificação ácida

Para a formação dos éteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) foi utilizado o protocolo descrito por Lepage & Roy (1986), com modificações. Este método consiste em uma catálise ácida, que provoca a isomerização do CLA, gerando assim um aumento relativo dos isômeros com configuração *trans, trans* (Roach *et al.*, 2002). Dessa forma, essa análise se destina à determinação dos teores de CLA total e não se aplica à análise da distribuição de isômeros. Os EMAG formados foram analisados por Cromatografia Gasosa (CG).

4.3.3.3 Análise dos EMAG em CG

Para a análise dos EMAG foi utilizado um cromatógrafo GC-2010 (Shimadzu, Japão), equipado com injetor à quente do tipo *split/splitless* e com detector FID. Os EMAG foram separados em coluna capilar polar de 30 m de comprimento (Omegawax-320 - Supelco, Co., EUA), tendo He como gás de arraste. A temperatura do forno da coluna foi programada da seguinte forma: 200°C por 10 minutos, seguido de gradiente de 1,5°C/ minuto até 210°C onde permaneceu por 25 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram 260°C e 280°C, respectivamente**.**

Os picos dos ácidos graxos nas amostras foram identificados por meio de comparação de seu tempo de retenção com o tempo de retenção de ácidos graxos de uma mistura comercial de padrões: Supelco 37 FAME mix (Sigma-Aldrich, Brasil), contendo 37 ácidos graxos e padrões de isômeros de CLA cedidos gentilmente pelo Dr. Robert Adolf (Agricultural Reserch Service, Food Quality & Safety Research Unit, US Department of Agriculture, Peoria, IL). O CLA presente nas microcápsulas foi quantificado por padronização interna, onde a soma de todas as áreas de todos os picos presentes no cromatograma, menos as áreas referentes ao hexano, que é um veículo para a injeção da amostra no aparelho e do padrão interno, que é adicionado à amostra durante o processo de metilação, equivaleram ao conteúdo de CLA nas partículas. Após a obtenção do conteúdo de CLA das microcápsulas, foi utilizada a **Equação 1** para calcular a retenção de CLA.

$$\text{Retenção}(\%) = \frac{\text{CLA nas microcápsulas(g por 100 g de sólidos)}}{\text{CLA na emulsão(g por 100 g de sólidos)}} \text{ X } 100 \qquad \textbf{[Equação 1]}$$

4.3.4 Eficiência de microencapsulamento (EM).

As análises de eficiência de microencapsulamento, que correspondem à quantidade de CLA internalizado nas micropartículas, foram realizadas conforme Sankarikutty *et al*. (1998), com modificações propostas por Kouassi *et al*. (2012). A análise determina a quantidade de óleo não microencapsulado. Amostras de 200 mg foram homogeneizadas em vortex com 5 mL de éter de petróleo (Vetec, Brasil) durante 5 min com posterior centrifugação por 10 min à 1200 rpm. Após a decantação da amostra, o solvente foi filtrado por uma coluna de filtração, contendo um frit (Supelco, Brasil), 1,6 g de Na_2SO_4 anidro (Merck, Alemanha) e 0,4 g de Celite 545 (Merck, Alemanha), e transferido para um erlenmeyer de 125 mL, previamente tarado em estufa. A coluna de filtração foi lavada novamente com 5 mL de éter de petróleo e o filtrado foi unido ao filtrado da centrifugação. O solvente foi evaporado em banho maria e o resíduo oleoso, correspondente ao CLA não microencapsulado (CLAñM), foi seco em estufa a 105 ºC até peso constante. O percentual de CLA não microencapsulado foi calculado pela **Equação 2.** Como controle, a análise foi realizada nos materiais de parede (M, CMC, CPE e IPE).

$$\text{CLA não microencapsulado (\%)} = \frac{\text{CLAñM(mg) X 100}}{\text{(A(mg) ÷ PropCLA) X retenção de CLA(\%)}} \qquad \textbf{[Equação 2]}$$

Onde: CLAñM: CLA não microencapsulado, A: amostra pesada (mg), PropCLA: proporção de CLA na formulação, retenção de CLA: valor de retenção de CLA da formulação obtido por CG (%).

Após a obtenção do percentual de CLA não microencapsulado, a EM foi calculada segundo a **Equação 3.**

$$\text{EM(\%)} = \frac{\text{CLA total(mg)} - \text{CLA não microencapsulado(mg)}}{\text{CLA total(mg)}} X\ 100 \qquad \textbf{[Equação 3]}$$

As análises a seguir foram realizadas apenas nas formulações que obtiveram resultados promissores nas análises descritas anteriormente.

4.3.5 Análise centesimal

O teor de umidade das micropartículas foi determinado em balança de umidade (MA35-Hexis; Alemanha) (105 °C, 90 min), utilizou-se 500 mg de amostra para a análise. O conteúdo de lipídios foi determinado cromatograficamente pelo método citado na seção 4.3.3. O teor de carboidratos foi determinado por diferença entre os outros macronutrientes (lipídios, proteínas e umidade). A determinação de proteínas nas amostras foi realizada de acordo com a metodologia proposta pelo instituto Adolfo Lutz (2008) com algumas adaptações. Aproximadamente 0,2 g de amostra foi pesado em papel de seda e transferido para tubo digestor (papel+amostra). Foi adicionado ao tubo 5 mL de ácido sulfúrico e uma 1 pastilhas de catalizador. O tubo foi digerido à 370ºC durante 6 h. Após a digestão, adicionou-se ao tubo 5 ml de água, indiciador de fenoftaleína e 15 mL de solução aquosa de NaOH 60%, antes do início do processo de destilação no sistema automático de destilação de Kjedhal. A extremidade afilada do refrigerador foi mergulhada em 25 mL de ácido bórico 4%, contido em frasco erlenmeyer de 500 mL com 3 gotas de indicador (vermelho de metila + verde de bromocresol). A destilação ocorreu até se decorrerem 3 min após o ponto de viragem, caracterizado pela coloração azul do destilado. O destilado foi titulado com solução de ácido clorídrico 0,04 M, previamente padronizada até atingir o ponto de viragem, de coloração alaranjada.

O cálculo para determinação do teor de proteína nas amostras foi realizado de acordo com a **Equação 4**.

$$\text{Teor de proteína}(\%) = \frac{V \text{ X } 0{,}14 \text{ X } f}{P(g)} \qquad \textbf{[Equação 4]}$$

Onde, V: volume gasto de ácido clorídrico 0,04 M (ml) vezes o seu fator de correção, P: nº de g da amostra, f: fator de conversão de nitrogênio em proteína (6,25).

4.3.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

As amostras foram submetidas à análise em espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho, modelo Excalibur 3100 FT-IR - Varian, no modo de transmitância, com acúmulo de 20 varreduras e resolução de 2 cm^{-1}. Cada amostra foi macerada e homogeneizada com KBr para a formação de pastilhas usadas para a aquisição dos espectros. Como controle, foi analisado cada material de parede (IPE, CPE, CMC, M).

4.3.7 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas em aproximadamente 5 mg de amostra em analisador termogravimétrico modelo Pryris 1 (Perkin-Elmer, EUA) na faixa de 25 a 800 °C com varredura de 10 °C/min, em atmosfera de N_2 (30 mL/min). Como controle foi analisado cada material de parede (IPE, CPE, CMC, M) e o núcleo.

4.3.8 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A determinação da Tg foi realizada no modelo Pryris Diamond (Perkin-Elmer, USA). Amostras de 5,0 mg foram analisadas em diferentes etapas de aquecimento e resfriamento. Duas etapas de aquecimento de 0 a 180 °C, a uma taxa de 20 °C/min. Uma etapa de resfriamento de 180 a 0 °C, a uma taxa de 100 °C/min, foi utilizada. Como controle foi analisado cada material de parede (IPE, CPE, CMC, M) e o núcleo.

4.3.9 Avaliação da morfologia

Utilizou-se Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para avaliar a microestrutura das partículas. As amostras foram depositadas em fita adesiva de carbono dupla-face, fixada na superfície de base do MEV, recobertas com fina camada de ouro em metalizador Balzers, Union FL 9496 e analisadas em microscópio JEOL SEM 5310, operado a 20kV, conforme descrito por Pereira *et al.* (2009).

4.3.10 Solubilidade em água (SA)

A solubilidade foi avaliada pelo método de Lai & Chen (2004), com algumas modificações. Amostras de 1,25 g foram adicionadas a 15 mL de água destilada e homogeneizadas durante 30 min, à 700 rpm. Após esse processo, a solução foi centrifugada a 8.000 rpm por 30 min, o sobrenadante foi peneirado, para evitar qualquer contaminação por resquícios do *pellet*, avolumado e uma alíquota (10 mL) foi transferida para uma placa de petri previamente tarada em estufa. A alíquota do sobrenadante foi seca em estufa à 105 °C por 5 h e o resíduo presente na placa de petri foi chamado de sobrenadante seco. A SA(%) das microcápsulas foi determinada utilizando as seguintes equações **(Equação 5 e Equação 6)**. Como controle foi analisado os materiais de parede CPE e M.

$$\text{Sobrenadante seco(15)(g)} = \frac{\text{sobrenadante seco(10)(g)X 15}}{10} \qquad \textbf{[Equação 5]}$$

Onde: Sobrenadante seco(15): resíduo presente em 15 mL de água, sobrenadante seco(10): resíduo presente em 10 mL de água.

$$\text{SA(\%)} = \frac{\text{Sobrenadante seco(15)(g)X 100}}{\text{Amostra (g)}} \qquad \textbf{[Equação 6]}$$

Onde: Sobrenadante seco(15): resíduo presente em 15 mL de água.

4.3.11 Dispersibilidade

A dispersibilidade das amostras foi determinada segundo método proposto por Choi *et al.* (2010), com algumas modificações. O método baseia-se na avaliação do comportamento da absorbância das partículas em função do tempo. Amostras de 50 mg foram adicionadas a 25 mL de tampão fosfato salino (PBS) em pH 7,4 e homogeneizadas (500 rpm, por 10 min). Após essa etapa, uma alíquota de 500 µL da mistura foi diluída novamente em 500 µL da solução de PBS e homogeneizada (2200 rpm, por 3 min). Um mililitro da mistura final foi transferido para uma cubeta e mediu-se a absorbância em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japan) durante 20 min, no comprimento de onda de 440 nm.

4.4 Estudo de estabilidade.

Foram submetidas ao estudo de estabilidade curso temporal as formulações eleitas com os melhores resultados nas análises de caracterização quanto a retenção de CLA, EM, distribuição do tamanho de partícula e teor de umidade. Após a produção, as micropartículas foram embaladas, estocadas em dessecadores e protegidas da luz durante 60 dias em temperatura ambiente. O perfil e o teor dos isômeros de CLA, a atividade de água (A_w) e os compostos voláteis produzidos pela peroxidação lipídica, analisados por CG (Shimadzu, Japão) (Ha *et al.*, 1989, Larick & Parker, 2001), foram utilizados como critérios de estabilidade das amostras. O Rancimat® (Modelo 743- Metrohm, Suíça), método de oxidação acelerada, também foi utilizado como parâmetro para avaliar a estabilidade oxidativa das amostras. As análises descritas acima foram realizadas em alíquotas das amostras em quatro tempos de coleta, sendo eles: logo após a secagem e 15, 30 e 60 dias após a secagem.

4.4.1 Análise do perfil e do teor total dos isômeros de CLA nas micropartículas

4.4.1.1 Lavagem da vidraria

Todas as vidrarias utilizadas nos experimentos foram previamente lavadas (por rinsagem ou imersão da vidraria) com solução potassa-alcoólica (KOH 2,5% em álcool comercial), durante 15 minutos, seguido de imersão em ácido nítrico diluído 1:4 (v/v) com água deionizada por pelo menos 2 horas. Esta etapa de lavagem de material é necessária, devido à utilização do detector de ionização em chama (FID, do inglês Flame Ionization Detector) nas análises. Este detector é extremamente sensível para substâncias orgânicas que podem resultar em artefatos nas análises cromatográficas.

4.4.1.2 Extração dos lipídios

A extração dos lipídios das microcápsulas foi realizada de acordo com método descrito por Wolff *et al*. (1995), com algumas modificações. O método consiste na extração dos lipídios por meio de uma mistura hexano:isopropanol (3:2, *v,v*) com etapa posterior de lavagem do extrato com solução de sulfato de sódio. Após extração, os lipídios totais foram armazenados em diclorometano:metanol (10:1, v/v) adicionado de um antioxidante (BHT, 0,05%) a – 20°C até transesterificação.

4.4.1.3 Transesterificação alcalina

Para a formação dos éteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) foi utilizado o protocolo descrito por Kramer *et al.* (1997), com modificações. Este método consiste em uma catálise alcalina que não causa a isomerização do CLA, evitando assim um aumento relativo dos isômeros com configuração *trans, trans* (Roach *et al.*, 2002). Os EMAG formados foram analisados por Cromatografia Gasosa (CG), para determinação do perfil de isômeros de CLA das micropartículas. Os EMAG formados foram analisados por Cromatografia Gasosa (CG).

4.4.1.4 Transesterificação ácida

A transesterificação ácida conforme descrita na seção 4.3.4.2 também foi utilizada no estudo de estabilidade para quantificar a concentração de CLA nas micropartículas. O método escolhido apresenta as seguintes vantagens em relação à transesterificação alcalina: 1) maior rapidez, visto que é um método direto não necessitando de uma extração prévia dos lipídios; 2) menor quantidade de amostra para a realização. Embora o método propicie um amento dos isômeros *trans,trans*, ele não altera quantitativamente o teor de CLA total. Os EMAG formados foram analisados por Cromatografia Gasosa (CG).

4.4.1.5 Análise dos EMAG em CG

Para a análise dos EMAG foi utilizado cromatógrafo GC-2010 (Shimadzu, Japão), equipado com injetor à quente do tipo *split/splitless* e com detector FID. Os EMAG foram separados em coluna capilar polar de 30 m de comprimento (Omegawax-320 - Supelco, Co., EUA), tendo He como gás de arraste. A temperatura do forno da coluna foi programada da seguinte forma: 200°C por 10 minutos, seguido de gradiente de 1,5°C/min até 210°C, onde permaneceu por 25 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram 260°C e 280°C, respectivamente**.**

Os picos dos ácidos graxos nas amostras foram identificados por meio de comparação de seu tempo de retenção com o tempo de retenção de ácidos graxos de mistura comercial de padrões: Supelco 37 FAME mix (Sigma-Aldrich, Brasil), contendo 37 ácidos graxos e padrões de isômeros de CLA cedidos gentilmente pelo Dr. Robert Adolf (Agricultural Reserch Service, Food Quality & Safety Research Unit, US Department of Agriculture, Peoria, IL). As áreas dos picos foram corrigidas por meio de fatores de correção teóricos de Ackman conforme descrito por Wolf *et al.* (1995). Os isômeros do CLA foram quantificados por padronização interna e o seu conteúdo expresso em mg de CLA/ 100 mg de micropartículas. A análise dos isômeros de CLA por CG em coluna capilar polar de 30 m de comprimento permite a separação dos isômeros geométricos do CLA, de forma que são obtidos no cromatograma quatro picos de CLA representativos de cada classe de isômeros geométricos, a saber: *cis,trans*, *trans,cis*, *cis,cis* e *trans,trans*. A determinação da perfil de isômeros de CLA foi obtida por meio de normalização interna onde o conteúdo de isômeros de CLA foi expresso em % de CLA total.

4.4.2 Identificação e quantificação dos compostos voláteis

Os compostos voláteis foram analisados pela técnica de microextração em fase sólida (SPME) (Larick & Parker, 2001). Amostras de 1 g foram transferidas para frascos de vidro específicos (headspace vial) e solubilizadas em 3,25 mL de KCl 3 M adicionado de padrão interno [isopropanol (4,4 µg/mL)], os vials foram fechados e incubados em banho de glicerina à 40ºC, sob agitação, durante 30 min. O SPME (fibra de Divinilbenzeno/Carboxeno/ Polidimetilsiloxano- Supelco, EUA) acoplado em holder manual (Supelco, EUA) foi inserido no headspace do vial por 10 min. Após a sorção dos voláteis os mesmos foram dessorvidos no injetor do CG durante 3 min. O compostos voláteis foram analisados por cromatografia gasosa

4.4.2.1 Identificação dos compostos voláteis

A identificação dos compostos voláteis foi realizada em cromatógrafo CG-17A (Shimadzu, Japão)**,** equipado com injetor à quente do tipo *split/splitless* e com detector de massas QP5050A (MS, do inglês: *mass spectrometry*). Os voláteis foram separados em coluna capilar apolar de sílica fundida (5% fenil/ 95% metilpolisiloxano; 30 m x 0,32 mm D.I., 3 µm espessura do filme- Quadrex 007-5, EUA). He foi utilizado como gás de arraste ajustado a velocidade linear de 60,3 cm/s. O injetor operou em modo splitless, sendo programado para o modo *split* 3 min após a injeção, com temperatura constante de 260 °C. A temperatura do forno da coluna foi programada da seguinte forma: 30 °C por 10 minutos, seguido de gradiente de 3 °C/min até 200°C, onde permaneceu por 10 min. O detector de massas operou nas seguintes condições: modo de impacto de íons, energia de ionização 70 eV, temperatura da interface: 260 °C, temperatura da fonte de íons: 260 °C , faixa de escaneamento: m/z 29- m/z 500.

Os dados foram analisados utilizando o software Lab Solutions GC-MS (Shimadzu, Japan) acoplado com a biblioteca de espectros de massa do National Institute of Standards and Technology (NIST). Uma solução de n-alcanos (padrão de alcanos saturados C_7-C_{30} – Supelco, EUA) foi analisada nas mesmas condições acima para determinar os índices de retenção linear (LRI) dos compostos, a equação utilizada está descrita abaixo **(Equação 7)** (Viegas & Bassoli, 2007)

$$LRI = 100\left(\frac{tc-tn}{tn+1-tn} + n\right)$$ **[Equação 7]**

Onde: t_c: tempo de retenção do composto de interesse, $t_{n+1:}$ tempo de retenção do hidrocarboneto posterior, t_n: tempo de retenção do hidrocarboneto anterior, n: número de carbonos do hidrocarboneto anterior.

4.4.2.2 Quantificação dos compostos voláteis

Para a quantificação dos voláteis foi utilizado cromatógrafo GC-2010 (Shimadzu, Japão), equipado com injetor à quente do tipo *split/splitless* e com detector FID. Os voláteis foram separados em coluna capilar apolar de sílica fundida (5% fenil/ 95% metilpolisiloxano; 30 m x 0,32 mm D.I., 3 µm espessura do filme- Quadrex 007-5, EUA). He foi utilizado como gás de arraste ajustado a velocidade linear de 25,0 cm/s. O injetor operou em modo splitless, sendo programado para o modo *split* 3 min após a injeção, com temperatura constante de 260 °C. O detector permaneceu a 280 °C durante toda a análise. A temperatura do forno da coluna

foi programada da seguinte forma: 30 °C por 10 minutos, seguido de gradiente de 3 °C/min até 200°C, onde permaneceu por 10 min.

Uma solução de n-alcanos (padrão de alcanos saturados C_7-C_{30} – Supelco, EUA) foi analisada nas mesmas condições acima para determinar os índices de retenção linear (LRI) dos compostos voláteis e possível comparação com os dados do CG-MS. A quantificação dos mesmos foi realizada por padronização interna e os resultados expressos em µg de composto volátil/ g de micropartícula. Além disso, para comparar a produção total de compostos voláteis durante o teste de estabilidade, calculou-se a área abaixo da curva (AAC).

4.4.3 Atividade de água (A_w)

O analisador de atividade de água (LabMaster-aw; Novasina, Suíça) foi utilizado para avaliar a A_w das micropartículas. Alíquotas de aproximadamente 1 g foram acondicionadas em discos plásticos próprios do aparelho e a análise foi realizada à 25 ºC. Os resultados eram salvos quando a temperatura e a A_w da amostra permaneciam estáveis por dez e um minutos, respectivamente.

4.4.4 Estabilidade oxidativa

A estabilidade oxidativa das microcápsulas foi avaliada pelo equipamento Rancimat® (Modelo 743- Metrohm, Suíça). Esse método fornece o período de indução das micropartículas, que corresponde a uma mudança repentina na taxa de oxidação (Velasco *et al.*, 2000). Amostras de 3 g foram utilizadas e as condições de análise foram conforme a EN 14112 (temperatura: 110 ºC e vazão de ar: 20 mL/min).

4.5 Análises estatísticas

Para todos os dados foi calculada estatística descritiva e foi adotada média aritmética como medida de centralidade e desvio padrão como medida de dispersão. Análise de variânca (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey foi aplicada para investigar diferenças nas propriedades físicas, químicas e físico-químicas das partículas. Para comparar as amostras quanto a teor de proteína, solubilidade e dispersabilidade, utilizou-se o Teste *t* de *Student*. No estudo de estabilidade das microcapsulas foi usada análise de variância (One-way ANOVA) com medidas repetidas e pós-teste de Bonferroni para avaliar: 1) a influência do processo de secagem sobre o perfil de isômeros de CLA; 2) a influência do tempo sobre a distribuição e concentração dos isômeros de CLA; 3) a influência do tempo sobre o período de indução. Com o intuito de comparar a produção total de compostos voláteis foi calculada a área abaixo

da curva e utilizou-se o Teste *t* de *Student.* A diferença foi considerada significativa quando o o valor de p foi menor que 0,05.

5 Resultados e Discussão

5.1 Desempenho dos materiais de parede

5.1.1 Retenção de CLA

A utilização de proteínas de ervilha (isoladas ou concentradas) como material de parede no microencapsulamento de ácido ascórbico e α-tocoferol já foi avaliada pelo nosso grupo de pesquisa (Pierucci *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2009;). As altas retenções do núcleo relatadas nesses trabalhos demonstram a habilidade do material em proteger substâncias durante a formação das gotículas e a secagem. No presente trabalho, todas as formulações apresentaram valores de retenção de CLA em torno de 90% (retenção média de CLA: 105 ± 12,3%). Segundo trabalhos prévios que também microencapsularam CLA por *spray-drying* ou por complexos de inclusão em moléculas de amilose e ciclodextrina, os valores descritos na presente dissertação são satisfatórios (Park *et al.*, 2002; Yang & Gu & Zhang, 2009). Tan & Chan & Heng (2005) e Rosenberg & Kopelman & Talmon (1990) demonstraram que altas razões de núcleo:matriz encapsulante influenciaram negativamente a retenção do núcleo. Além disso, outros pesquisadores demonstraram o efeito da adição de polissacarídeos na matriz encapsulante sobre a retenção do núcleo (Rosenberg & Sheu, 1996; Pierucci *et al.*, 2006; Pierucci et al., 2007;). Neste estudo as diferentes formulações de matriz encapsulante e razões núcleo:matriz encapsulante não influenciaram a retenção do CLA.

5.1.2 Eficiência de microencapsulamento (EM)

As formulações contendo CPE apresentaram maiores valores de EM do que as formulações contendo IPE, quando esses materiais foram utilizados isolados na matriz encapsulante. A razão núcleo:matriz encapsulante influenciou a EM das formulações contendo CPE e a adição de carboidratos melhorou esse parâmetro nos dois tipos de micropartículas. Choi *et al.*, (2010) e Jimenez & García & Beristain (2006) ao microencapsularem CLA em matrizes encapsulantes compostas por *whey proteins* e diferentes tipos de carboidratos demonstraram valores de EM variando de 57-99%. Neste trabalho, os maiores valores de EM foram encontrados nas formulações contendo CMC, 41,6% e 40,6% para as formulações CLA:CMC:IPE (1:1:3) e CLA:CMC:CPE (1:1:3), respectivamente (Tabela 3).

É relevante ressaltar que a análise realizada pode provocar a extração de óleo encapsulado, dependendo da porosidade da matriz encapsulante (Rosenberg & Sheu, 1996), subestimando assim o valor de EM real. A EM é usualmente determinada lavando-se as

micropartículas com solventes orgânicos, que extraem o óleo não microencapsulado (óleo livre) presente na superfície das micropartículas. A presença de óleo livre influencia negativamente as propriedades físicas de pós produzidos por *spray-drying*, como a fluidez, dispersibilidade, solubilidade e a estabilidade oxidativa (Drusch *et al*., 2007; Bae & Lee, 2008) .

A vicilina é a principal proteína de reserva presente em ervilhas e neste estudo a mesma também é o componente majoritário nas duas formulações de micropartículas (Pereira et al., 2009). As proteínas são reconhecidas matrizes encapsulantes porosas (Rosenberg & Sheu, 1996; Drusch *et al.*, 2007;), de acordo com Rosenberg & Sheu (1996), a adição de lactose a uma matriz encapsulante proteica diminuiu a difusão do solvente pela matriz. Este fenômeno pode ser explicado pela formação de uma crosta rígida ao redor das micropartículas, devido à presença de uma fase vítrea continua onde as proteínas se dispersam. Estudos prévios demonstraram que o equivalente de dextrose (DE) e o peso molecular dos carboidratos influenciaram significativamente a porosidade da matriz encapsulante (Sheu & Rosenberg, 1998; Hogan & O'Riordan & O'Sullivan, 2003). Kagami et al. (2003) ao microencapsularem óleo de peixe em matrizes encapsulantes compostas por misturas de caseinato de sódio (CasNa) e maltodextrinas de diferentes (DE) (4, 11 e 18) observaram que a adição de maltodextrinas com alto DE aumentou a estabilidade oxidativa e reduziu a quantidade de óleo não microencapsulado nas micropartículas. Além disso, a presença de carboidratos na matriz encapsulante pode aumentar a hidrofilicidade da mesma e desta forma reduzir sua interação com o solvente de extração (Rosenberg & Sheu, 1996). O CPE é a forma concentrada da vicilina, neste sentido esse material não possui a mesma pureza do IPE, apresentando em sua formulação carboidratos e lipídios. Nós sugerimos que a presença destes outros componentes não proteicos e a interação dos mesmos com o CLA poderiam explicar os maiores valores de EM encontrados nas micropartículas de CPE.

O efeito de diferentes razões núcleo:matriz encapsulante sobre a EM já foi investigado por Rosenberg *et al.* (1990) e Tan *et al.* (2005), eles demonstraram que o aumento das razões acompanhou a redução nos valores de EM. Segundo esses autores a quantidade de matriz encapsulante é insuficiente para microencapsular o núcleo. Contudo Hogan *et al.* (2003) não encontraram nenhuma associação entre a razão núcleo:matriz encapsulante e a EM, ao microencapsular óleo de savelha em matriz de CasNa/carboidrato. No presente trabalho, as variadas razões núcleo:matriz encapsulante testadas apenas influenciaram as formulações que continham CPE e a micropartícula com a menor razão núcleo:matriz, CLA:CPE (1:4) (Tabela

3), apresentou o menor valor de EM. Neste sentido, visando altos valores de EM é necessário a determinação de razões núcleo:matriz encapsulante ótimas.

5.1.3 Tamanho de particular (TP)

A análise de TP demonstrou que as micropartículas estavam na escala micro, com tamanhos médios variando de 5 µm a 11 µm, nas formulações CLA:CMC:IPE (1:1:3) e CLA:CPE (1:4), respectivamente (Tabela 3). Nas formulações contendo IPE, CLA:IPE (1:2) apresentou o maior TP (8,96 ± 0,18 µm). Em um trabalho prévio Tan et al. (2005) demonstraram que a quantidade de óleo presente na emulsão e consequentemente na micropartícula influenciou os valores de TP, no entanto as micropartículas de CPE não seguiram essa tendência. Pierucci *et al.*, (2007) observaram aumento no TP e na viscosidade da solução alimentadora, após a adição de carboidratos na matriz encapsulante. No entanto, no presente trabalho foram encontrados resultados discrepantes, visto que nas micropartículas com a mesma razão núcleo:matriz encapsulante (1:4) (Tabela 3), a adição de carboidratos à matriz reduziu os valores de TP nos dois tipos de micropartículas. As características físico-químicas distintas da molécula de interesse podem explicar os dados conflitantes.

Embora a adição de CMC reduza o tamanho de partícula médio, as formulações contendo esse carboidrato apresentaram as micropartículas com a maior variação de tamanhos de partículas, indicados pelos maiores valores de span 18,2 e 2,9 para CLA:CMC:IPE (1:1:3) e CLA:CMC:CPE (1:1:3), respectivamente (Tabela 3). Soluções alimentadoras viscosas interferem no processo de atomização e provocam a formação de gotículas grandes e cilíndricas que afetam negativamente a taxa de secagem (Rosenberg *et al.*, 1990). As viscosidades das emulsões alimentadoras não foram mensuradas, mas as formulações contendo CMC foram diluídas para evitar o entupimento do atomizador e a sucção adequada da emulsão alimentadora. A produção de micropartículas com uma estreita distribuição no tamanho de partícula é um parâmetro de controle importante para propiciar a liberação controlada do núcleo e o estudo da sua estabilidade (Walton & Mumford, 1999).

5.1.4 Umidade

As micropartículas apresentaram teores de umidade característicos de produtos secos em *spray dryer* (Reineccius, 2004), variando de 2,6% na formulação CLA:IPE (1:3) a 5,2% na formulação CLA:CMC:IPE (1:1:3). Diante do baixo teor de umidade das micropartículas, podemos sugerir que as mesmas são estáveis microbiologicamente (Drusch *et al.*, 2007) (Tabela 3). Pierucci et al., (2006) demonstraram relação entre o conteúdo de sólidos totais da

emulsão alimentadora e o teor de umidade das micropartículas. Na presente dissertação todas as formulações continham a mesma quantidade de sólidos totais (13 g) e apenas as formulações CLA:M:IPE (1:1:3) (4,2 ± 0,3%) e CLA:M:CPE (1:1:3) (2,9 ± 0,1%) quando comparadas apresentaram diferença estatística (Tabela 3).

As formulações contendo CPE foram escolhidas para o estudo de estabilidade e a investigação de outras propriedades físico-químicas, pois as mesmas apresentaram uma maior homogeneidade no tamanho das partículas e maiores valores de EM (Tabela 3). As formulações escolhidas foram CLA:CPE (1:4) e CLA:M:CPE (1:1:3), nosso objetivo ao selecionar essas formulações foi avaliar a inserção de carboidratos na matriz encapsulante sobre outros parâmetros físico-químicos e a estabilidade oxidativa das micropartículas. M foi o carboidrato escolhido, visto que as micropartículas contendo CMC apresentaram grande variação no tamanho das partículas e o processo de secagem foi mais longo, pois essa formulação sofreu uma maior diluição para diminuir a viscosidade da emulsão alimentadora e desta forma viabilizar o processo de atomização. Neste sentido, essas características da formulação contendo CMC comprometeram futuras aplicações. A formulação CLA:CPE (1:4) foi selecionada para comparações, pois possui a mesma razão núcleo:matriz encapsulante que a formulação CLA:M:CPE (1:1:3) e além disso também foi nosso intuito avaliar a influência de uma menor EM sobre a estabilidade oxidativa das micropartículas e a aplicação do CPE isolado na matriz encapsulante. Deste ponto em diante, todos os resultados são referentes às formulações de micropartículas selecionadas (CLA:CPE, 1:4; e CLA:CMC:CPE, 1:1:3) e a composição das mesmas foi suprimida para manter a clareza do texto.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos (média ± DP) das micropartículas de CLA de acordo com as diferentes razões núcleo:matriz encapsulante e materiais de parede das formulações testadas.

Formulação (p/p)	EM (%)	TP		Umidade (%)
		D[0.5] (µm)	Span	
IPE				
CLA:IPE (1:2)	N.D.^{Aa}	8,96±0,18^{Aa}	1,98±0,0^{Aa}	4,0±0,3^{Aa}
CLA:IPE (1:3)	N.D.^{Aa}	8,03±0,15^{Ab}	2,16±0,02^{Ab}	2,6±0,3^{Aa}
CLA:IPE (1:4)	N.D.^{Aa}	8,39±0,21^{Ab}	2,43±0,3^{Ac}	4,7±0,1^{Aa}
CLA:M:IPE (1:1:3)	7,4±1,4$^{A\beta}$	6,66±0,1$^{A\beta}$	2,31±0,03^{A}	4,2±0,3^{A}
CLA:CMC:IPE (1:1:3)	41,6±1,4$^{A\beta\alpha}$	5,08±0,06$^{A\beta\alpha}$	18,22±3,18$^{A\beta\alpha}$	5,2±0,8^{A}
CPE				
CLA:CPE (1:2)	32,0±1,7^{Ba}	9,22±0,25^{Aa}	2,13±0,02^{Ba}	2,9±0,4^{Aa}
CLA:CPE (1:3)	35,5±0,6^{Ba}	7,16±0,47^{Bb}	2,41±0,05^{Bb}	3,2±1,1^{Aa}
CLA:CPE (1:4)	14,7±1,3^{Bb}	11,07±0,59^{Bc}	2,06±0,04^{Ba}	3,6±0,5^{Aa}
CLA:M:CPE (1:1:3)	36,4±0,0$^{B\beta}$	9,71±0,8^{B}	2,08±0,02^{B}	2,9±0,1^{B}
CLA:CMC:CPE (1:1:3)	40,6±2,0$^{A\beta}$	8,12±0,3$^{B\beta}$	2,96±0,06$^{B\beta\alpha}$	3,6±0,8^{A}

CLA: Ácido linoleico conjugado; IPE: isolado proteico de ervilha; CPE: concentrado proteico de ervilha; M: maltodextrina; CMC: carboximetilcelulose; EM: eficiência de microencapsulamento; TP: tamanho de partícula; D[0.5]: tamanho médio de partícula; span: índice de espalhamento. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e entre formulações iguais de grupos diferentes (CPE e IPE) indicam diferença significativa ($p < 0,05$; teste *t*). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e entre formulações do mesmo grupo (IPE ou CPE) indicam diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA). $^{\beta}$ indica diferença significativa referente a adição de carboidratos (M ou CMC) em relação as formulações no mesmo grupo (CLA:IPE (1:4) ou CLA:CPE (1:4)) ($p < 0,05$; teste *t*). $^{\alpha}$ indica diferença entre as formulações contendo carboidrato (M e CMC) no mesmo grupo (IPE ou CPE) ($p < 0,05$; teste *t*).

3.2 Caracterização

3.2.1 Composição centesimal

As micropartículas de CLA:CPE e CLA:M:CPE apresentaram os seguintes teores de proteína 58,2 ± 0,1% e 42,5 ± 0,1%, respectivamente. Como esperado, foi observado maior teor de carboidratos nas micropartículas de CLA:M:CPE que as micropartículas de CLA:CPE (30,4 ± 1,0% *vs.* 11,9 ± 0,5%). Os dois tipos de micropartículas demonstraram conteúdos de lipídios similares, CLA:CPE = 26,3 ± 0,6% e CLA:M:CPE = 24,2 ± 1,0%. Segundo a análise cromatográfica, os isômeros CLA *cis,trans* (≈ 33%) e CLA *trans,cis* (≈ 34%) foram os ácidos graxos majoritários nos dois tipos de micropartículas. O segundo pico mais proeminente da análise foi referente aos acidos graxos 18:1n-7/ 18:1n-9 (≈ 17%), que devido à limitações técnicas coeluem (Tabela 4). Nesta seção do trabalho não foram realizadas análises estatísticas, pois as diferenças na composição centesimal já eram esperadas devido à variações na formulação das micropartículas.

Tabela 4. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos das micropartículas de CLA, CLA:CPE e CLA:M:CPE. (média ± DP)

Composição Centesimal	CLA:CPE	CLA:M:CPE
Proteína (%)	58,2 ± 0,1	42,5 ± 0,1
Carboidrato (%)[1]	11,9 ± 0,5	30,4 ± 1,0
Umidade (%)	3,6 ± 0,5	2,9 ± 0,1
Lipídios (%)	26,3 ± 0,6	24,2 ± 1,0
Perfil de ácidos graxos[2]		
16:0	2,4 ± 0,13	2,0 ± 0,04
18:0	2,9 ± 0,06	2,9 ± 0,01
18:1n-7/ 18:1n-9	17,2 ± 0,2	16,6 ± 0,06
18:2n-6	8,4 ± 0,37	6,9 ± 0,23
18:3n-3	1,3 ± 0,11	1,1 ± 0,07
CLA *c,t*	32,5 ± 0,15	33,8 ± 0,10
CLA *t,c*	32,8 ± 0,14	34,3 ± 0,13
CLA *c,c*	0,9 ± 0,02	1,0 ± 0,05
CLA *t,t*	1,6 ± 0,11	1,5 ± 0,15

CLA: ácido linoleico conjugado, CPE:concentrado protéico de ervilha, M: maltodextrina, *c: cis* e *t: trans*. 1: Determinado por diferença, 2: Determinado por normalização interna.

3.2.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

A análise de FTIR (Figura 9A) foi utilizada para avaliar se o processo de secagem poderia promover interações entre os componentes das micropartículas. Ao comparar os espectrogramas de infravermelho da matriz encapsulante M:CPE (1:3) seca em *spray dryer* e a mistura física desses componentes, não foi observado o surgimento nem o desaparecimento de nenhum pico de absorção. Esta mesma tendência foi observada quando se comparou as micropartículas (CLA:M:CPE (1:1:3) e CLA:CPE (1:4)) com os seus materiais de parede isolados (M e CPE).

Os picos observados nas regiões referentes às ligações hidroxila (± 3200 cm^{-1}), carbonila (± 1640 cm^{-1}) e a dupla conjugada (± 1530 cm^{-1}), indicam a presença de CLA nas micropartículas. Yang *et al.* (2009) inseriram moléculas de CLA na estrutura de carboidratos complexos, como a amilose e β-ciclodextrina, e encontraram picos de absorção nas mesmas regiões descritas acima. Além disso, foram encontrados dois picos (± 2920 cm^{-1} e ± 2850 cm^{-1}) apenas nos espectrogramas de infravermelho das micropartículas, que podem ser

advindos da molécula de CLA. Eles correspondem às ligações simples C-H que vibram por estiramento.

Kosaraju & D'ath & Lawrence (2006) ao microencapsularam por *spray-drying* compostos fenólicos presentes nas folhas de oliva em matriz de quitosana, observaram interações químicas entre o núcleo e a matriz encapsulante. No entanto, os resultados presentes nesta dissertação sugerem que o microencapsulamento é um processo físico, incapaz de alterar a estrutura química da molécula de interesse.

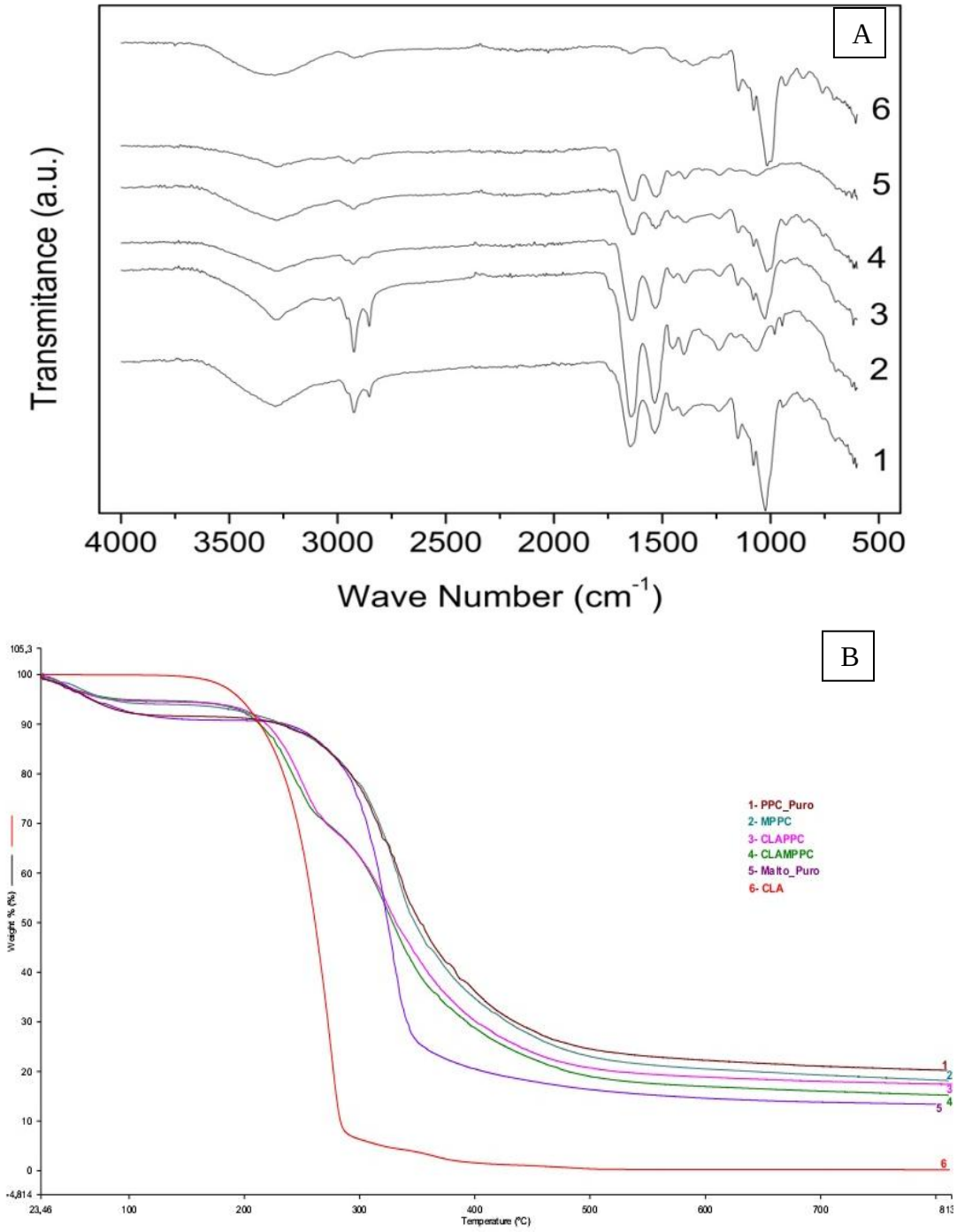

Figura 9. Caracterização físico-química das micropartículas de CLA: A) Espectrogramas de infravermelho (FTIR) das micropartículas de CLA e dos componentes da matriz encapsulante. 1. CLA:M:CPE (1:1:3), 2. CLA:CPE (1:4), 3. M:CPE (seco no *spray dryer*), 4. M:CPE (mistura física), 5.CPE e 6. M.; B) Curvas termogravimétricas das micropartículas de CLA e de todos os seus componentes. 1. CPE, 2. M:CPE, 3. CLA:CPE (1:4), 4. CLA:M:CPE (1:1:3), 5. M, 6. CLA. CLA: Ácido linoleico conjugado, CPE: concentrado proteico de ervilha, M: maltodextrina.

3.2.3 Estabilidade térmica

Diferenças na estabilidade térmica entre as micropartículas e os seus componentes foram determinadas por análises termogravimétricas (Figura 9B). Todas as substâncias, exceto o CLA, iniciaram a perda de massa em temperaturas abaixo de 100 ºC. O primeiro decaimento de massa das amostras é causado pela desidratação das mesmas e esse percentual foi muito similar aos teores de umidade das micropartículas de CLA:CPE e CLA:M:CPE aferidos pela balança de umidade (Tabela 3). Além disso, a ausência dessa etapa de desidratação na amostra de CLA confirma o caráter anidro do material. Os materiais de parede apresentaram taxas e temperaturas de degradação muito similares (M: 186,3 ± 1,8 ºC e CPE: 158,5 ± 0,2 ºC), neste sentido a adição de M na matriz encapsulante não influenciou positivamente a estabilidade térmica da matriz encapsulante. As micropartículas CLA:M:CPE (131,0 ± 0,6 ºC) e CLA:CPE (133,9 ± 0,4 ºC) demonstraram temperaturas de degradação menores ($p < 0,05$) que o CLA (145,5 ± 0,5 ºC), sugerindo assim que o processo de microencapsulamento não foi capaz de aumentar a estabilidade térmica do CLA. Os dois tipos de micropartículas apresentaram dois estágios de perda de massa, o primeiro referente à degradação do CLA e o segundo relativo à degradação da matriz encapsulante, como já foi descrito previamente (Yang *et al.*, 2009).

3.2.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A M analisada isoladamente apresentou o maior valor de T_g (156.3 ± 1.9 ºC) e a sua adição na matriz encapsulante aumentou o valor de T_g nas micropartículas de CLA ($p < 0,05$) (CLA:M:CPE; 67.8 ± 2.2 ºC *vs.* CLA:CPE; 41.4 ± 1.0 ºC). No entanto, as duas matrizes encapsulantes (CPE; 74.1 ± 2.1 ºC *vs.* M:CPE; 76.6 ± 5.4 ºC) utilizadas não apresentaram valores de T_g diferentes estatisticamente quando comparadas isoladamente. Neste sentido, nós sugerimos que a presença do CLA pode influenciar esse parâmetro, embora não tenha sido possível determinar a sua T_g (Tabela 5). Segundo Yousefi & Emam-Djomeh & Mousavi (2011) a adição de carboidratos de alto peso molecular, como a M, na matriz encapsulante é uma estratégia largamente utilizada para aumentar a T_g de sucos de frutas secos em *spray-drying*

Tabela 5. Temperatura de transição vítrea (T_g), solubilidade e dispersibilidade das micropartículas de CLA e de seus componentes (média ± DP).

Amostras	T_g (ºC)[1]	Solubilidade (%)[1]	Dispersibilidade (Δ Abs, × 10^{-3})[2]
Micropartículas			
CLA:CPE	41,4 ± 1,0[a]	22,4 ± 0,1[a]	38,8 ± 2,3[a]
CLA:M:CPE	67,8 ± 2,2[b]	38,5 ± 1,8[b]	7,1 ± 0,8[b]
Materiais			
CLA	ND	NA	NA
CPE	74,1 ± 2,1[b]	22,4 ± 0,1[a]	NA
M	156,3 ± 1,9[c]	86,3 ± 0,7[c]	NA
M:CPE	76,6 ± 5,4[b]	NA	NA

CLA: Ácido linoleico conjugado, CPE: concentrado proteico de ervilha, M: maltodextrina, ND: não detectado e NA: não analisado. 1: Letras diferentes indicam diferença significativa na mesma coluna ($p < 0,05$, ANOVA). 2: Letras diferentes indicam diferença significativa na mesma coluna ($p < 0.05$, Teste-*t*).

Produtos processados pela tecnologia de *spray-drying* devem ser mantidos abaixo da T_g, com o objetivo de evitar mudanças nas características físicas, químicas e sensorias do mesmo durante a estocagem. Em temperaturas acima da T_g, o solido amorfo, neste caso as micropartículas, está em um estado "borrachudo" (do inglês *rubbery*), onde a mobilidade molecular da matriz encapsulante é alta e as reações são mais aceleradas, resultando assim em alterações físico-químicas e perdas nutricionais (Bhandari & Howes, 1999; Reineccius, 2004).

As micropartículas produzidas apresentaram valores satisfatórios de T_g quando comparadas com estudos prévios que microencapsularam óleos ou processaram sucos de frutas por *spray-drying* (Soottitantawat *et al.*, 2004; Kouassi *et al.*, 2012; Yousefi & Emam-Djomeh & Mousavi, 2011). Do ponto de vista econômico, micropartículas que apresentam altos valores de T_g são mais interessantes, visto que as mesmas são estáveis à temperatura ambiente, não necessitando assim de refrigeração durante a estocagem. Contudo esses resultados devem ser interpretados com cautela, pois além da temperatura, outros fatores durante a estocagem, como a umidade relativa, podem influenciar a estabilidade do núcleo. Além disso, já foi demonstrado que mesmo sob temperaturas de refrigeração, o escurecimento não enzimático ocorre em taxas menos intensas e pequenas moléculas como o oxigênio e a

água são capazes de difundir pela matriz encapsulante (Andersen *et al.*, 2000; Bell & Hageman, 1994).

3.2.5 Solubilidade

Rangel *et al.* (2003) demonstraram a alta solubilidade da vicilina, o componente principal do CPE, em uma faixa ampla de valores de pH. A baixa solubilidade do CPE (22.4 ± 0.1%) em comparação ao estudo citado anteriormente, pode estar relacionado com o grau de pureza do material, visto que nesse trabalho utilizou-se um concentrado proteico de ervilha e no trabalho de 2003, um isolado proteico. As micropartículas de CLA:CPE e CLA:M:CPE apresentaram os seguintes valores de solubilidade 22.4 ± 0.1% e 38.5 ± 1.8%, respectivamente. Choi *et al.* (2010) ao microencapsular CLA em matrizes encapsulantes compostas por *whey protein*, M e produtos da reação de Mailard, observaram valores de solubilidade acima de 75%. A M foi o material mais solúvel (86.3 ± 0.7%) e a adição desse carboidrato na matriz encapsulante aumentou a solubilidade da micropartícula (Tabela 5). Esse carboidrato de alto peso molecular é um dos materiais de parede mais usados em processos de secagem por *spray-drying*, devido as suas propriedades, como: alta solubilidade, baixa viscosidade e alta T_g (Yousefi & Emam-Djomeh & Mousavi, 2011).

3.2.6 Dispersibilidade

A dispersibilidade de um produto seco em *spray-drying* é influenciada principalmente pelo tamanho de partícula, a densidade e a matriz encapsulante utilizada (Reineccius, 2004). Os baixos valores de Δ_{Abs} observados nas micropartículas indicam boa dispersibilidade, visto que altos valores de Δ_{Abs} são decorrentes da rápida deposição das micropartículas no fundo da cubeta (Tabela 5).

No presente trabalho nós apenas avaliamos a influência da matriz encapsulante sobre a dispersibilidade, pois as duas formulações apresentaram tamanhos de partícula similiares ($p > 0,05$) (Tabela 3). As micropartículas de CLA:M:CPE demonstraram melhor dispersibilidade que as micropartículas de CLA:CPE (7,1 ± 0,8 *vs.* 38,8 ± 2,3), possivelmente pela presença do carboidrato altamente solúvel (M) na matriz encapsulante. Segundo Choi *et al.* (2010) as interações entre as proteínas e os carboidratos da matriz encapsulante com a água são responsáveis pelos diferentes valores de dispersibilidade encontrados nas micropartículas. Os resultados de dispersibilidade e solubilidade presentes nesse estudo são consistentes e juntos sugerem que as micropartículas de CLA produzidas formam emulsões estáveis quando reconstituídas em água.

3.2.7 Morfologia

As imagens obtidas no MEV demonstraram que as duas formulações apresentaram micropartículas com conformação esférica, mas com topografias de superfície distintas. As micropartículas de CLA:CPE exibiram superfície com invaginações e rugosidades (Figura 10A e 10B), enquanto que na formulação CLA:M:CPE, a presença de rugosidades foi menos intensa e houve uma menor aglomeração das partículas (Figura 10C e 10D). Esses resultados são contrastantes com os demonstrados por Pierucci et al. (2007), onde a adição de maltodextrina na matriz encapsulante não afetou a morfologia das partículas.

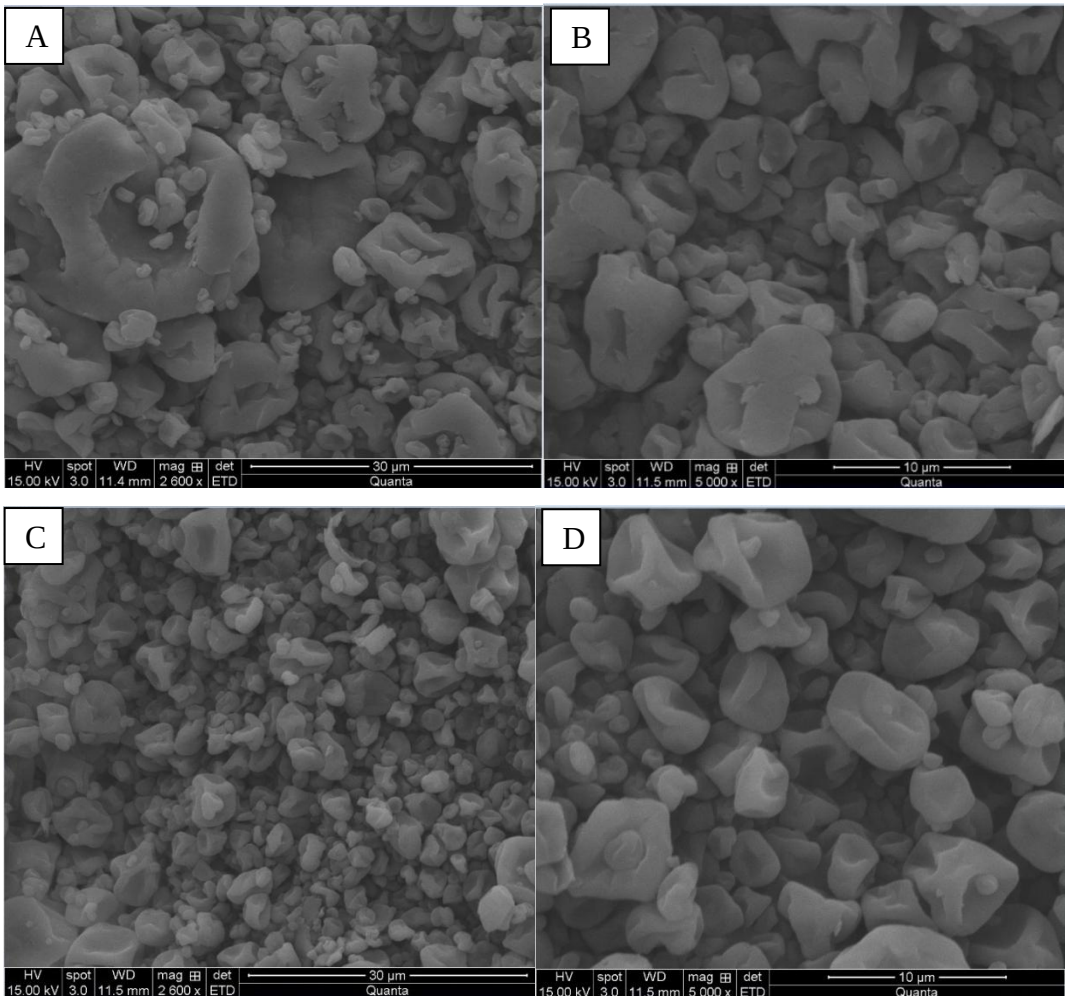

Figura 10. Micrografias das micropartículas produzidas. CLA:CPE, bar:, 30 µm e 10 µm para A e B, respectivamente. CLA:M:PPC, bar: 30 µm e 10 µm para C e D, respectivamente.

A microestrutura de partículas secas em *spray-drying* pode ser afetada por diversos fatores, como: a composição e as propriedades da matriz encapsulante, a razão núcleo:matriz

encapsulante e as condições de secagem e estocagem (Sheu & Rosenberg, 1998; Jimenez & García & Beristain, 2006). A presença de invaginações nas micropartículas é decorrente das propriedades viscoelásticas dos materiais de parede e da utilização de altas taxa de secagem, favorecendo assim o "encolhimento" desigual das partículas em estágios iniciais do processo (Sheu & Rosenberg, 1998). Além disso, já foi demonstrado que a razão proteína:carboidrato na matriz encapsulante influencia a morfologia de micropartículas de CLA produzidas por *spray-drying* (Choi *et al*., 2010). O teor proteico da matriz encapsulante foi inversamente proporcional à ocorrência de invaginações nas micropartículas, visto que as formulações com altos teores desse macronutriente apresentaram micropartículas com menor grau de invaginações (Choi *et al.*, 2010). Outra variável explorada por Choi *et al.* (2010) foi a pureza do material de parede proteico utilizado, uma vez que a matriz composta por *whey protein* isolado produziu micropartículas com menos invaginações que uma matriz semelhante de menor pureza (*whey protein* concentrado). A presença de carboidratos, como a lactose na matriz encapsulante parece estimular a formação de invaginações. Da mesma forma, o concentrado proteico de ervilha utilizado na presente dissertação possui carboidratos em sua composição.

Invaginações afetam negativamente a flotabilidade, as propriedades de reconstituição e a estabilidade do produto (Rosenberg & Kopelman & Talmon, 1990). Micropartículas com superfícies invaginadas e/ou rugosas podem apresentar uma maior liberação do material encapsulado, devido à maior superfície de contado com o meio externo (Walton & Mumford, 1999). No presente trabalho, não observamos a presença de poros abertos e rachaduras nas duas formulações de micropartículas (CLA:PPC, CLA:M:PPC), que segundo Sheu & Rosenberg (1998) é um dos critérios mais importantes para se avaliar a habilidade de proteção da matriz encapsulante.

3.3 Teste de estabilidade

3.3.1 Perfil de isômeros

A bioatividade do CLA é isômero específica (Pariza & Park & Cook, 2001), logo a produção de micropartículas capazes de manter o perfil de isômeros de CLA durante a estocagem é uma questão relevante.

Diversos estudos já relataram a baixa estabilidade oxidativa do CLA (Jimenez & García & Beristain, 2006; García-Martinez *et al.*, 2009;Yettella & Castrodale & Proctor, 2012) e o efeito do aquecimento sobre o seu perfil de isômeros (Rodríguez-Alcalá & Fontecha, 2007; Giua *et al.*, 2012). Neste sentido, antes de avaliar o perfil de isômeros de

CLA durante a estocagem, foi determinado se o processo de secagem por *spray-drying* era capaz de alterar o perfil de isômeros de CLA.

O perfil de isômeros de uma amostra de CLA microencapsulada em duas matrizes encapsulantes diferentes (CLA:CPE e CLA:M:CPE) e uma amostra não microencapsulada encontra-se na Figura 11 e um cromatograma parcial desta análise encontra-se na Figura 12. A análise cromatográfica demonstrou que a amostra não microencapsulada possui quatro classes de isômeros em sua composição, *cis,trans*; *trans,cis*; *cis,cis* e *trans,trans*, na seguinte distribuição: 47,9 ± 0,24%; 48,42 ± 0,08%; 1,43 ± 0,05% e 2,24 ± 0,27%, respectivamente (Figura 11). Além dos isômeros de CLA, as amostras também continham outros ácidos graxos em menores concentrações como linoleico (18:2n-6), oleico (18:1n-9), vacênico (18:1n-7), esteárico (18:0) e palmítico (16:0) (Figura 12), estando de acordo com as informações descritas no rótulo.

Quanto ao CLA microencapsulado, as amostras também apresentaram as quatro classes de isômeros descritas acima e a composição da matriz encapsulante não influenciou o perfil de isômeros do CLA, visto que a distribuição percentual dos isômeros não diferiu estatisticamente (p>0,05) nas duas formulações (CLA:CPE (1:4): 47,94 ± 0,06% *cis,trans*; 48,39 ± 0,16% *trans,cis*; 1,38 ± 0,02% *cis,cis*; 2,29 ± 0,15% *trans,trans*; CLA:M:CPE (1:1:3): 47,91 ± 0,14% *cis,trans*; 48,54 ± 0,12% *trans,cis*; 1,38 ± 0,07% *cis,cis*; 2,17 ± 0,2% *trans,trans*) (Figura 11).

As amostras de CLA analisadas por CG (CLA microencapsulado e não micoencapsulado) não apresentaram diferença estatística (p > 0,05) quanto à composição e à distribuição dos isômeros, indicando assim que o processo de secagem não alterou a composição do material de interesse (Figura 11). Contudo, ao aferir a concentração de peróxidos na emulsão alimentadora e nas partículas após a secagem, Hogan & O'Riordam & O'Sullivan (2003) demonstraram que o processo de encapsulamento por *spray-drying* pode aumentar o PV de micropartículas de óleo de peixe. Indicando assim que dependo das condições de secagem aplicadas como: taxa de secagem, temperatura de secagem, método de homogeneização, dentre outros, o processo pode alterar/degradar a substância de interesse. No entanto, segundo Gouin (2004) este fato tem uma baixa probabilidade de ocorrer, pois embora durante a secagem sejam utilizadas altas temperaturas (180 ºC). A temperatura da micropartícula não ultrapassa 80 ºC, devido ao intenso processo de evaporação.

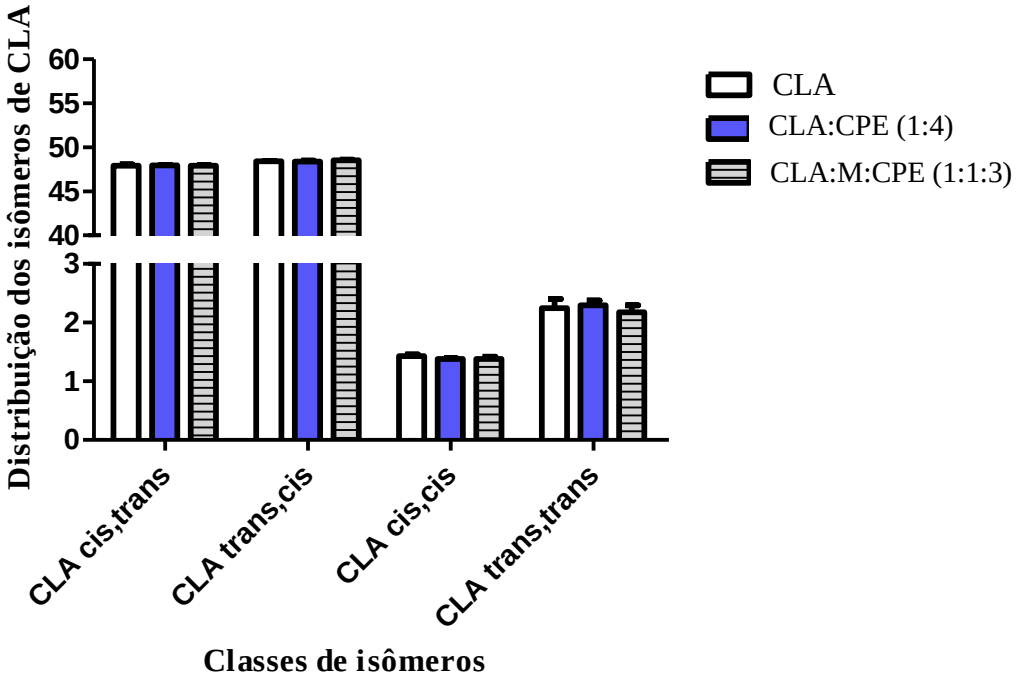

Figura 11. Influência do processo de secagem sobre o perfil de isômeros de CLA. CLA: ácido linoleico conjugado, CPE: concentrado proteico de ervilha, M: maltodextrina. Os resultados não foram significativamente diferentes. (p>0.05, ANOVA medidas repetida).

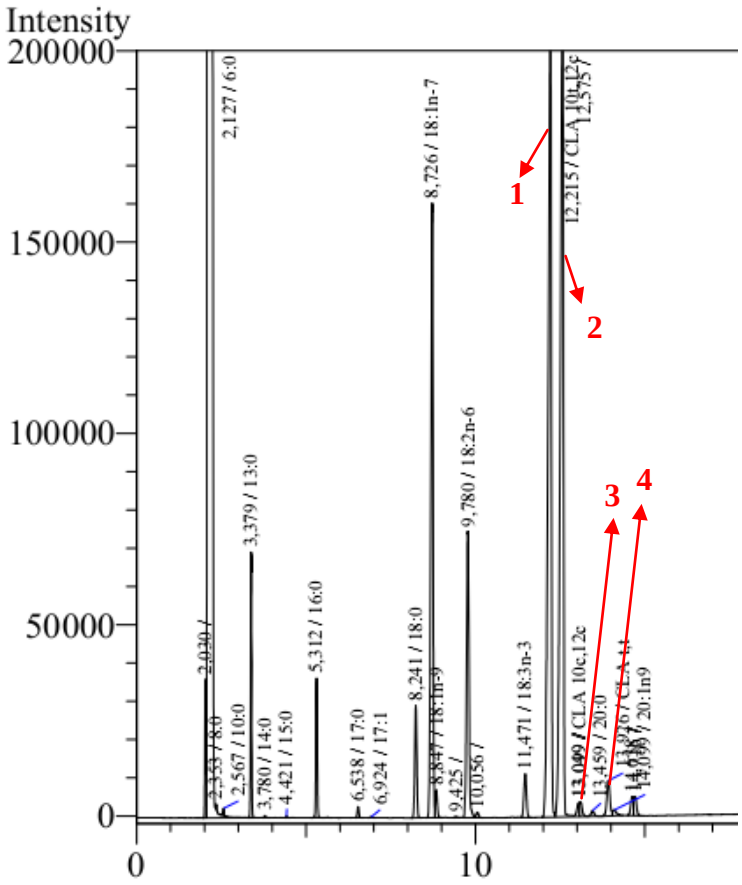

Figura 12. Cromatograma parcial referente à análise do perfil de isômeros de CLA obtido por CG-FID. Omegawax-320 coluna, 30 m operada à 200 ºC (10') + 1,5 ºC/min até 210 ºC (25'). 1: CLA *cis,trans*, 2: CLA *trans,cis*, 3: CLA *cis,cis* e 4: CLA *cis,cis*.

Durante a estocagem por dois meses à temperatura ambiente, o perfil de isômeros de CLA das duas formulações de micropartículas permaneceu praticamente constante (Figura 13A e 13B). Foram observadas variações nos isômeros minoritários de CLA (*cis,cis; trans,trans*) nas duas formulações de micropartículas durante o teste de estabilidade. Nas micropartículas de CLA:CPE os isômeros *cis,cis* decaíram até o 15º dia e após esse período permaneceram estáveis até o fim do estudo. Em contraste, a distribuição dos isômeros *trans,trans* se manteve estável nos primeiros 30 dias de estudo, decaindo, após essa data, até o final do estudo. Quanto as micropartículas de CLA:M:CPE, os isômeros *cis,cis* decaíram até o 15º dia, permaneceram estáveis até o 30º dia e aumentaram no final do estudo, atingindo valores similares aos iniciais. No entanto, os isômeros *trans,trans* não apresentaram variações em suas concentrações durante os 60 dias de estudo (Figura 13A e 13B).

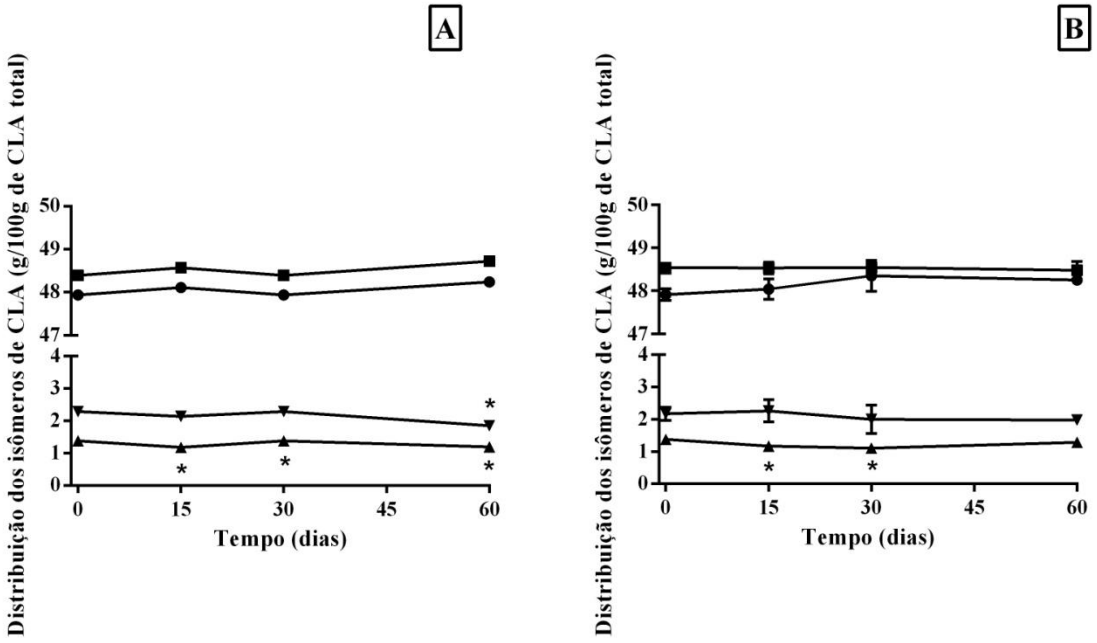

Figura 13. Perfil de isômeros das micropartículas de CLA durante o teste de estabilidade, A) CLA:CPE e B) CLA:M:CPE. CLA *cis,trans*:●; CLA *trans,cis*: ■; CLA *cis,cis*: ▲; CLA *trans,trans*: ▼. * indica diferença significativa em relação ao dia 0 ($p < 0.05$; ANOVA medidas repetidas).

Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram redução na distribuição dos isômeros minoritários de CLA após processamento térmico e a estocagem sob refrigeração (Rodríguez-Alcalá & Fontecha, 2007; Giua *et al*, 2012).

3.3.2 Quantificação de CLA

Com o intuito de evitar interpretações errôneas causadas pela determinação do perfil de CLA por normalização interna, o teor de CLA das micropartículas também foi avaliado durante o teste de estabilidade (Figura 14A). As duas formulações de micropartículas (CLA:CPE e CLA:M:CPE) apresentaram teores de CLA similares ($p > 0,05$) e estáveis durante os 60 dias de estudo. Além disso, a atividade de água (A_w, 25 °C) das micropartículas também foi mensurada durante o teste de estabilidade para investigar se as micropartículas absorveram ou perderam água durante esse período. As micropartículas de CLA:M:CPE não apresentaram alterações nos valores de A_w durante o teste de estabilidade (0,322 ± 0,007 A_w). Já nas micropartículas de CLA:CPE observou-se um pequeno aumento nos valores de A_w

após 60 dias de estocagem (dia 0: 0,203 ± 0,001 A_w vs. dia 60: 0,306 ± 0,003 A_w; Figura 14B). Embora a umidade das micropartículas não tenha sido avaliada durante o teste de estabilidade, assim como a confecção de isotermas de sorção, baseado na variação de A_w da amostra CLA:CPE e em isotermas de sorção de produtos com composição similar (Hardy & Scher & Banon, 2002), nós sugerimos que a variação de umidade durante o estudo foi baixa, provocando uma variação de massa na faixa de 2-3%. A variação de massa sofrida pela amostra de CLA:CPE foi muito baixa, sendo assim negligenciada no cálculo do teor de CLA. Neste sentido, os resultados de quantificação de CLA estão de acordo com a estabilidade no perfil de isômeros de CLA descrita na seção anterior e em conjunto demonstram a eficácia das duas formulações de matriz encapsulante em proteger o núcleo.

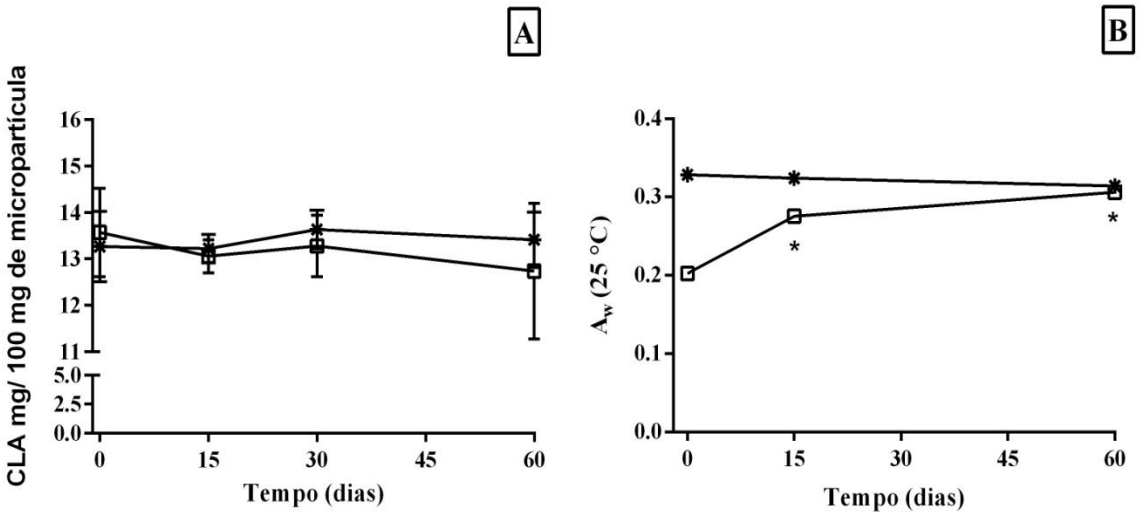

Figura 14. Quantificação de CLA e atividade de água (Aw) das micropartículas. A) Quantificação de CLA e B) Aw à 25 ºC. CLA:M:CPE: ✳ e CLA:CPE: □. * indica diferença significativa em relação ao dia 0 ($p < 0.05$; ANOVA medidas repetidas).

3.3.3 Produtos voláteis da oxidação do CLA

3.3.3.1 Identificação dos compostos voláteis no CG-MS

Após análises por CG-MS foi possível identificar cinco compostos voláteis: Hexanal, Heptanal, 2-Heptanona, 2,2-Dimetil-decano e Decano, nas micropartículas de CLA. A identificação dos mesmos encontra-se na Tabela 6 e os seus respectivos espectrogramas, na Figura 15. Para a identificação de todos os compostos utilizou-se as informações referentes ao banco de dados presente no GC-MS associadas à comparação com os LRI obtidos no estudo e os LRI descritos na literatura (Qian & Reineccius, 2003; Elmore *et al.*, 2005). Em todos os

compostos voláteis esses dois métodos de identificação apresentaram resultados similares, exceto para o composto 2,2-Dimetil-decano que foi identificado apenas pelo banco de dados presente no GC-MS (Tabela 6).

Tabela 6. Identificação dos compostos voláteis presentes nas micropartículas de CLA durante o estudo de estabilidade

Composto	LRI	LRI Ref	IS (M ± DP (%))	Método de identificação
Hexanal	799	799[1]	94 ± 2,3	MS + LRI
2-Heptanona	891	888[1]	97 ± 0,7	MS + LRI
Heptanal	901	900[1]	96 ± 0,9	MS + LRI
2,2-Dimetil-decano	995	------	91 ± 3,6	MS
Decano	1000	1000[2]	77 ± 7,4	MS + LRI

LRI: Índice de retenção linear, LRI Ref: Índice de retenção linear obtido em Qian & Reineccius, 2003[1] e Elmore et al., 2005[2], IS: Índice de similaridade, MS: identificação realizada pelo banco de dados presente no GC-MS e LRI: identificação realizada pelo LRI.

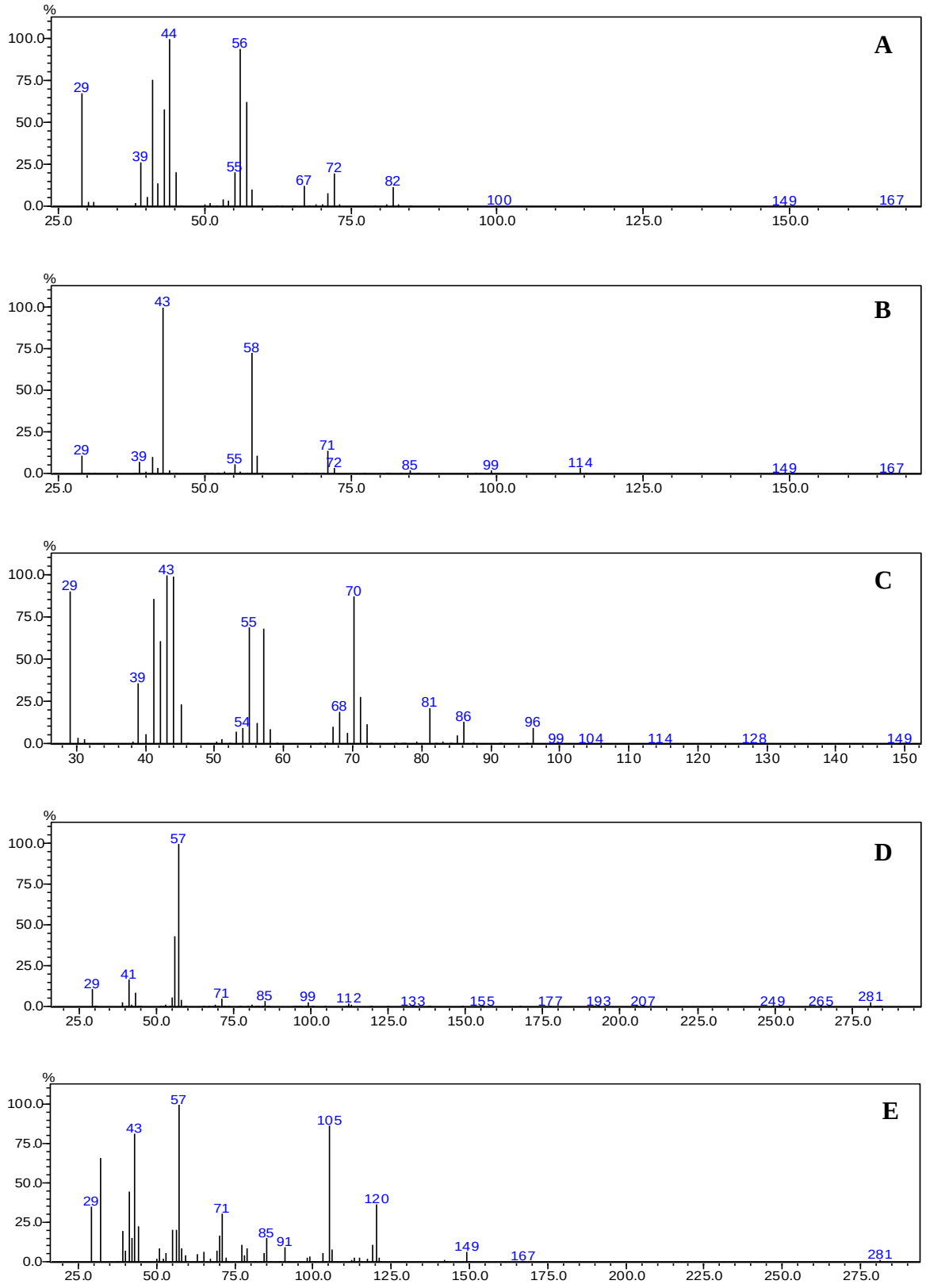

Figura 15. Espectro de massa dos compostos identificados nas microparticulas de CLA durante o estudo de estabilidade. A) Hexanal; B) 2-Heptanona; C) Heptanal; D) 2,2-Dimetil-decano e E) Decano.

3.3.3.2 Quantificação dos compostos voláteis no GC-FID

Um cromatograma parcial representativo obtido em CG-FID contendo os compostos identificados é demonstrado na Figura 16. Na figura é possível observar o Hexanal, composto em maior concentração em todas as amostras, 2-Heptanona, Heptanal, 2,2-Dimetil-Decano e o Decano. A quantificação dos compostos voláteis durante o teste de estabilidade é descrita na Figura 17A.

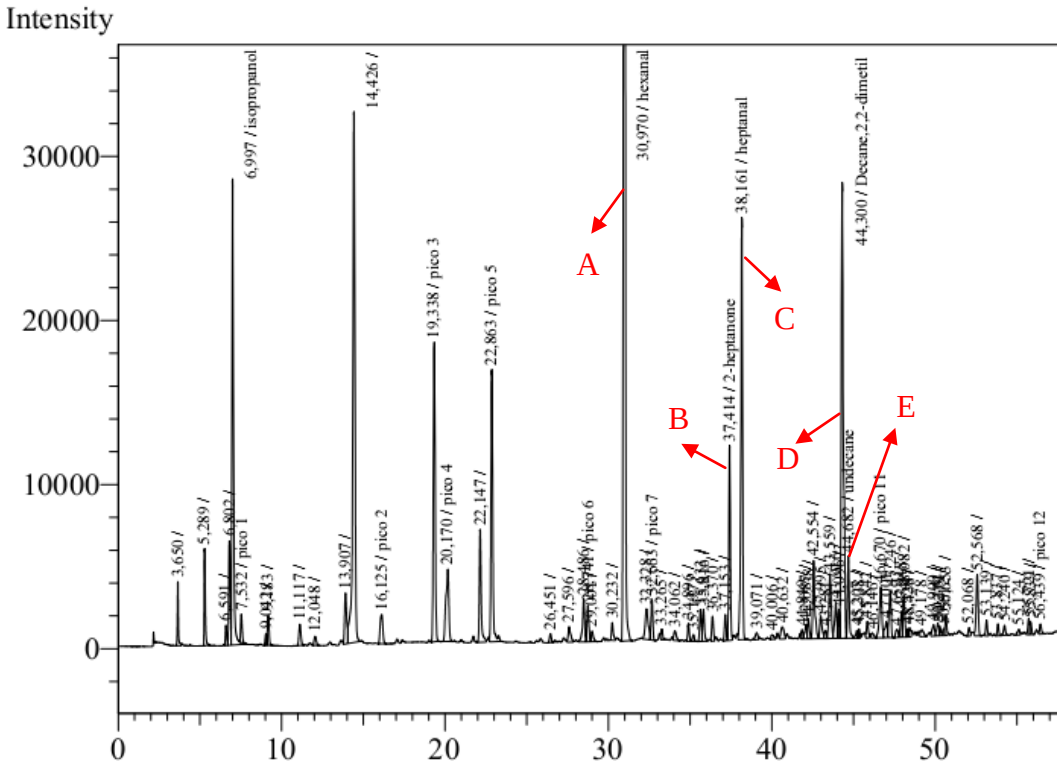

Figura 16. Cromatograma parcial da análise de quantificação dos compostos voláteis presentes nas micropartículas de CLA durante o teste de estabilidade obtido por CG-FID. Coluna Quadrex 007-5, 30 m operada à 30 ºC (10') + 3 ºC/min até 200 ºC (10'). A) Hexanal; B) 2-Heptanona; C) Heptanal; D) 2,2-Dimetil-decano e E) Decano.

Embora tenham sido identificados cinco compostos voláteis nas micropartículas (Hexanal, 2-Heptanona, Heptanal, 2,2-Dimetil-Decano e Decano), eles também estavam presentes nas matrizes encapsulantes em concentrações similares, exceto o heptanal, quando analisadas isoladamente. A ocorrência desses compostos voláteis no material de parede pode estar relacionada à presença de lipídios residuais dos grãos de ervilha, que provavelmente oxidaram. Neste sentido, apenas o Heptanal foi considerado um marcador da oxidação do

CLA durante a estocagem. Um estudo prévio demonstrou a presença de heptanal em um óleo rico em CLA e ausência no controle (óleo de cártamo), indicando assim que esse composto pode ser utilizado como um marcador específico da oxidação do CLA (García-Martínez *et al.*, 2009). No presente trabalho, o teor de Heptanal nas micropartículas aumentou até o 30° dia e depois permaneceu constante até o final do estudo (Figura 17B). Após os 60 dias de estudo, os teores de Heptanal nos dois tipos de micropartículas (CLA:CPE, 35,1 ± 4,5 µg/g e CLA:M:CPE, 31,7 ± 2,4 µg/g) foram menores que o demonstrado por García-Martínez *et al.* (2009) em um óleo rico em CLA , após dez dias de estocagem à 60 ºC. Estes resultados estão de acordo com as analises de estabilidade descritas anteriormente e indicam pequenas mudanças no CLA, devido ao processo de oxidação.

Visando avaliar a influência da matriz encapsulante sobre a estabilidade oxidativa das micropartículas, AAC foi calculada e a mesma reflete a produção total de voláteis pelo processo oxidativo durante o estudo de estabilidade (Figura 17C). O teor de Heptanal nas micropartículas aumentou até o 30° dia e depois permaneceu constante até o final do estudo, este comportamento do composto volátil foi igual nas duas formulações de micropartículas, assim como a produção total de compostos voláteis (CLA:M:CPE, 1412,7 ± 49,7 *vs.* CLA:CPE, 1442,3 ± 94,5; $p > 0,05$) (Figura 17C). Embora não tenhamos encontrado influência da matriz encapsulante sobre a produção total de voláteis, neste trabalho, Jimenez & García & Beristain (2006), ao microencapsular CLA, demonstraram associação entre a produção de aldeídos e a composição da matriz encapsulante. No estudo citado anteriormente, as micropartículas compostas por *whey protein*s, como único componente da matriz encapsulante, apresentaram a menor produção de aldeídos e a melhor microestrutura (conformação esférica, superfície lisa e livre de poros abertos e rachaduras). Contudo, outros estudos demonstraram que matrizes encpasulantes compostas apenas por proteínas possuem alta permeabilidade ao oxigênio e a adição de carboidratos pode reduzir esta característica (Sheu & Rosenberg, 1998; Kagami et al., 2003; Bae & Lee, 2008). Segundo Bae & Lee (2008) isso pode ocorrer, pois ao adicionar carboidratos na matriz encapsulante aumenta-se o caráter hidrofílico da matriz, reduzindo assim interações com o oxigênio, devido à sua natureza hidrofóbica.

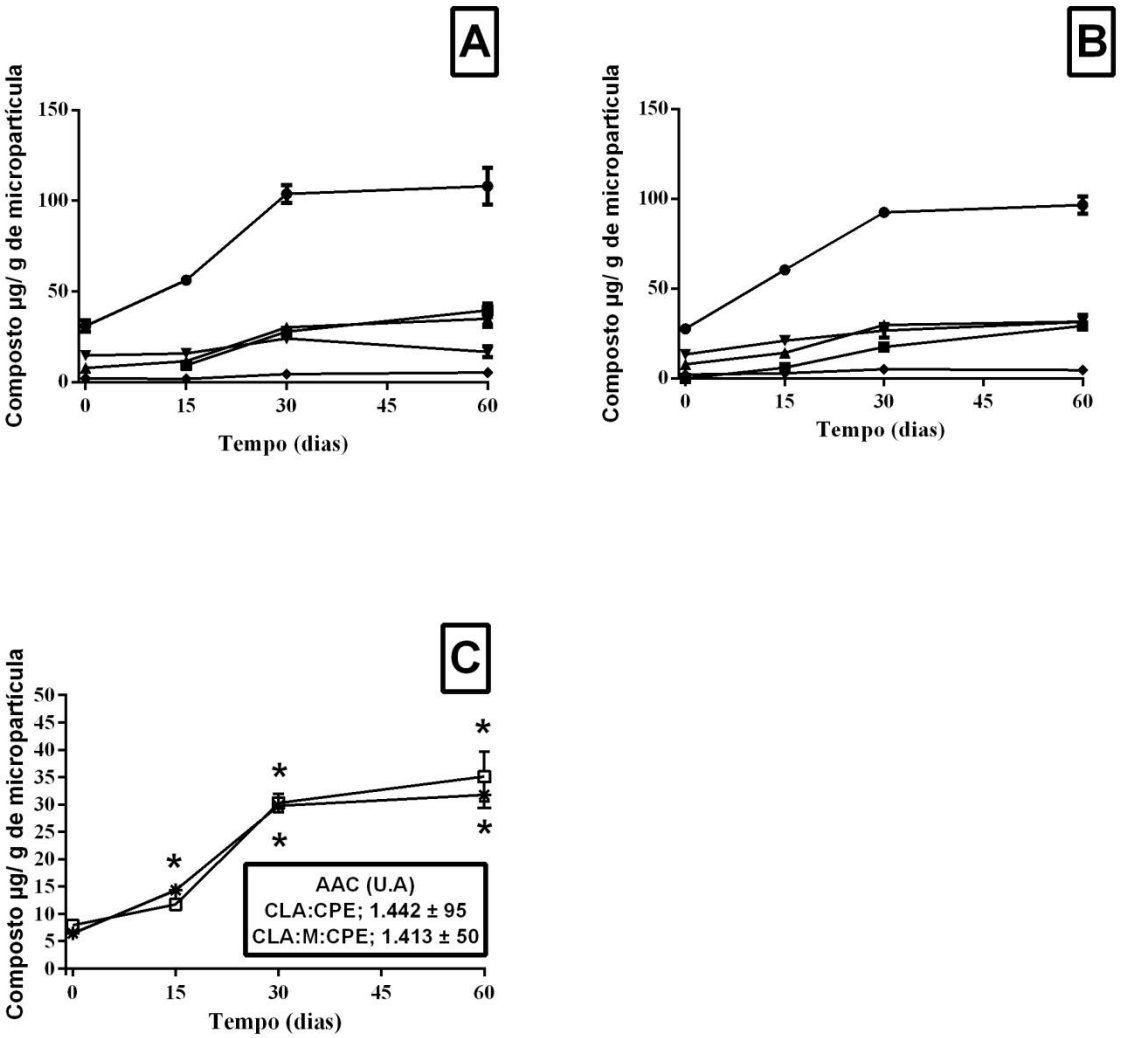

Figura 17. Formação de compostos voláteis durante o teste de estabilidade. A) CLA:CPE, B) CLA:M:CPE e C) Teores de Heptanal nas micropartículas. Hexanal: ●; Heptanal: ▲; 2,2-Dimetil-Decano: ▼; 2-Heptanona: ■; Decano: ◆; CLA:M:CPE: ✳ e CLA:CPE: □. * indica diferença significativa em relação ao dia 0 ($p < 0.05$; ANOVA medidas repetidas).

Não obstante, a difusão do oxigênio pela matriz encapsulante também pode depender da porosidade e integridade da matriz seca (Jimenez & García & Beristain, 2006) e de acordo com as analises morfológicas realizadas na presente dissertação, as duas formulações de micropartículas não apresentaram poros abertos e rachaduras em suas topografias. As micropartículas de CLA:CPE apresentaram mais invaginações e rugosidades em suas superfícies que as micropartículas de CLA:M:CPE. Segundo Walton & Mumford (1999) essas características podem aumentar a liberação do núcleo, devido à maior superfície de contato e consequentemente uma maior interação com o meio. Entretanto, as duas

formulações mantiveram o CLA estável durante dois meses, independente de rugosidades na superfície das micropartículas e variações na solubilidade da matriz encapsulante. Logo, neste caso, podemos sugerir que a morfologia das micropartículas não influenciou a estabilidade do núcleo. Provavelmente a topografia das micropartículas é relacionada as propriedades do material de parede, CPE, como demonstrado previamente por Bittencourt *et al.* (2013) e Pierucci *et al.* (2007).

3.3.4 Estabilidade oxidativa determinada pelo método de Rancimat®

Ahn *et al*., (2008) e Velasco & Dobarganes & Márquez-Ruiz (2000) foram bem sucedidos ao utilizar o método de Rancimat® para avaliar a estabilidade oxidativa de diferentes óleos microencapsulados.

No entanto, no presente estudo não foram obtidos resultados satisfatórios, pois o aparelho foi incapaz de determinar o tempo de indução das micropartículas de CLA. Diferente das curvas do CLA não microencapsulado, as curvas das micropartículas não apresentaram uma fases lag e log bem definidas (Figura 18), impossibilitando assim o cálculo manual do tempo de indução. Neste sentido, os resultados dessa análise não serão discutidos.

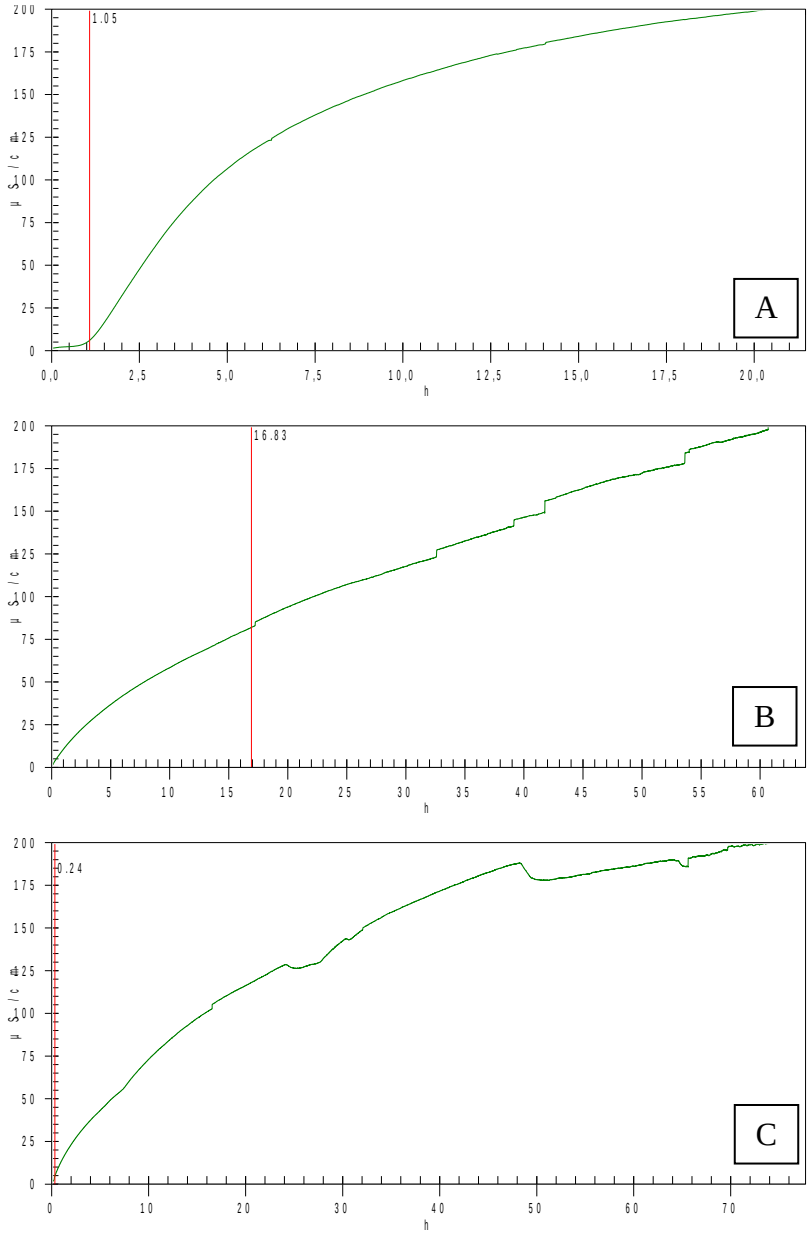

Figura 18. Curva de produção de compostos voláteis obtida pelo método de Rancimat durante o teste de estabilidade. A) CLA não microencapsulado, B) CLA:M:PPC (1:1:3) após 60 dias de estocagem e C) CLA:PPC (1:4) após 60 dias de estocagem.

6 Conclusão

- Os dois materiais utilizados (CPE e IPE) podem ser aplicados no microencapsulamento de CLA, visto que todas as formulações testadas produziram micropartículas com valores de retenção de CLA acima de 90%;

- As micropartículas contendo CPE apresentaram maiores valores de EM que as micropartículas contendo IPE. Indicando assim, que a interação do CLA com outros componentes não protéicos presentes no CPE pode ser responsável pelos maiores valores encontrados. A adição de carboidratos à ME influenciou positivamente a EM nos dois tipos de micropartículas, no entanto a proporção núcleo:ME influenciou a EM, apenas, das formulações contendo CPE. O tamanho médio das micropartículas produzidas variou de 5 a 11 µm. A adição de carboidratos reduziu o tamanho médio das partículas nos dois tipos de micropartículas, no entanto a relação núcleo:ME influenciou apenas o TP das micropartículas contendo IPE. A adição de CMC na matriz encapsulante promoveu uma redução no TP, mas reduziu a homogeneidade entre as partículas. Todas as formulações testadas produziram micropartículas de CLA com teores de umidade compatíveis com produtos secos em *spray-drying*.

- As micropartículas contendo CPE apresentaram melhores características físico-químicas, neste sentido a formulação CLA:M:CPE (1:1:3) foi escolhida para avaliar a influência da adição de carboidratos na ME sobre outros parâmetros físicos-químicos e a estabilidade oxidativa. Além disso, a formulação CLA:CPE (1:4) foi utilizada para fins de comparação, pois a mesma possui a mesma razão núcleo:ME e, também, para avaliar o desempenho do CPE quando aplicado isolado.

- As análises termogravimétricas realizadas nas micropartículas escolhidas demonstraram que o processo de microencapsulamento não alterou a estabilidade térmica do CLA. A presença de M na matriz encapsulante foi responsável por um aumento na Tg, solubilidade e dispersibilidade das micropartículas de CLA. Segundo à MEV, as micropartículas produzidas apresentaram geometria esférica com invaginações. A morfologia das mesmas também foi influenciada pela adição de M, visto que as micropartículas contendo M apresentaram superfície com um menor grau de rugosidade, menor aglomeração e uma menor variação de tamanho. Vale ressaltar que as duas micropartículas apresentaram superfícies íntegras, sem rachaduras ou poros.

- O teste de estabilidade realizado demonstrou que as duas formulações de micropartículas foram capazes de manter o CLA estável durante 60 dias à temperatura

ambiente e a presença de M na matriz encapsulante não influenciou os parâmetros analisados (variação do perfil de isômeros, concentração de CLA e produção de compostos voláteis). No entanto, a adição de carboidrato melhorou características físico-químicas capazes de viabilizar a inserção das micropartículas em diversos alimentos.

Os resultados aqui apresentados demonstram a possível utilização de um material de parede emergente, o CPE, no microencapsulamento de CLA. As micropartículas produzidas são versáteis, podendo ser adicionada em diversas matrizes alimentares, inclusive em sistemas alimentares aquosos. Essa característica pode contribuir para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios enriquecidos/fortificados com CLA e dessa forma aumentar o consumo do nutriente pela população.

Por fim, A formulação CLA:M:CPE (1:1:3) apresentou resultados que lhe permitem ser adicionada à qualquer matriz alimentar com maior facilidade, sendo assim mais compatível com outros alimentos em pó secos em *spray-drying*. Além disso, do ponto de vista econômico essa formulação é menos onerosa, devido ao menor custo de produção da M comparado ao CPE.

7 Sugestões para trabalhos futuros

- Caracterizar a emulsão em relação à estabilidade, viscosidade e tamanho das gotas;
- Estudar a cinética de liberação *in vitro* das microcápsulas por meio de dissolutor;
- Avaliar a estabilidade oxidativa das micropartículas após a inserção em um alimento;
- Avaliar sensorialmente a adição das micropartículas em um alimento;
- Realizar análise de colorimetria das micropartículas durante o armazenamento.

8 Referências Bibliográficas

AGUILERA, J.M., STANLEY, D.W. ***Microstructural Principles of Food Processing and Engineering***. Elsevier Applied Science: Cambridge; 1990. p. 343.

AHN, J., KIM, Y., SEO, E., CHOI, Y., KIM, H. Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high oleic sunflower oil. ***Journal of Food Engineering***. 2008; 84: 327-334.

AMERICAN OIL CHEMISTRY SOCIETY (AOCS). ***Official Methods and Recommended Practices of the AOCS***. 5 ed. AOCS: Champaign, Illinois, 2004.

ANDERSEN, A.B., RISBO, J., ANDERSEN, M.L., SKIBSTED, L.H. Oxygen permeation through an oil-encapsulating glassy food matrix studied by ESR line broadening using a nitroxyl spin probe. ***Food Chemistry***. 2000; 70(4); 499-508.

AUGUSTINI, M.A., SANGUANSRI, L., BODE, O. Maillard reaction products as encapsulants for fish oil powders. ***Journal of Food Science***. 2006; 71(2): 25-32.

AVALTRONI, F., BOUQUERAND, P.E. NORMAND, V. Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions. ***Carbohydrate Polymers***. 2004; 58: 323-334.

BAE, E. K., LEE, S.J. Microencapsulation of avocado oil by spray-drying using whey protein and maltodextrin. ***Journal of Microencapsulation***. 2008; 25(8): 549-560.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., JULIANO, P. Physical and chemical properties of food powders. In: Onwulata, C. editor. ***Encapsulated and powdered foods***. Boca Raton: Taylor & Francis; 2005. p. 39-71.

BASU, S., SMEDMAN, A., VESSBY, B. Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. ***FEBS Letters***. 2000: 468; 33-36.

BELL, L.N., HAGEMAN, M.J. Differentiating between the Effects of Water Activity and Glass Transition Dependent Mobility on a Solid State Chemical Reaction: Aspartame Degradation. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***. 1994: 42(11); 2398-2401.

BEMILLER, J.N., HUBER, K.C. Carbohydrates. In: DOMADORAN, S., PARKIN, K.L., FENNEMA, O.R., editores. ***Fennema's Food Chemistry***. 4ª ed. Boca Raton: CRC Press; 1996. p.83-154.

BHANDARI, B.R., DUMOULIN, E.D., RICHARD, H.M.J., NOLEAU, I., LEBERT, A.M. Flavour encapsulation by spray-drying: application to citral and linalyl acetate. ***Journal Food Science***. 1992; 57: 217-221.

BHANDARI, B.R., HOWES, T. Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. ***Journal of Food Engineering***. 1999; 40: 71-79.

BITTENCOURT, L.L.D.A., PEDROSA, C., SOUSA, V.P.De, PIERUCCI, A.P.T., CITELLI, M. Pea protein provides a promising matrix for microencapsulating iron. ***Plant Foods for Human Nutrition***. 2013; *68*(4): 333-9.

BLANKSON, H., STAKKESTAD, J.A., FAGERTUN, H., THOM, E., WADSTEIN, J., GUDMUNDSEN, O. Conjugated Linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. ***The Journal of Nutrition***. 2000; 130: 2943-2948.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico n° 23, de 17 de abril de 2007. Esclarecimentos sobre as avaliações de segurança e eficácia do Ácido Linoleico Conjugado – CLA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/23_190407.htm>. Acesso em: 1 nov. 2013.

CANO-CHAUCA, M., STRINGHETA, P.C., RAMOS, A.M., CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microestructure of mango powder obtained by spray-drying and its functional characterization. ***Innovative Food Science & Emerging Technologies***. 2005; 6: 420-428.

CHEN, L., REMONDETTO, G.E., SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. ***Trends in Food Sci. Technol***. 2006; 17(5):272-283.

CHEN, Z.Y., CHAN, P.T., KWAN, K.Y., ZHANG, A. Reassessment of the antioxidant activity of conjugated linoleic acids. ***J Am Oil Chem Soc***. 1997; 74:749–753.

CHOI, K., RYU, J., KWAK, H., KO, S. Spray-dried conjugated linoleic acid encapsulated with maillard reaction products of whey proteins and maltodextrin. ***Food Sci. Biotechnol***. 2010: 19(4); 957-965.

CHRISTIE, W.W., SÉBÉDIO, J.L., JUANÉDA, P. A pratical guide to the analysis of conjugated linoleic acid (CLA*)* .***Inform***. 2001: 12; 147-152.

CLÉMENT, L., POIRIER, H., NIOT, I., BOCHER, V., GUERRE-MILLO, M., KRIEF, S., STAELS, B., BESNARD, P. Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. ***Journal of Lipid Research***. 2002; 43: 1400-1409.

COLLOMB, M., SIEBER, R., BUTIKOFER, U. CLA *iso*mers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. ***Lipids***. 2004; 39: 355-364.

COOK, M.E., MILLER, C.C., PARK, Y., PARIZA, M.W. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. ***Poultry Science***. 1993: 72; 1301-1305

CORL, B.A., BAUMGARD, L.H., DWYER, D., GRIINARI, J.M., PHILLIPS, B.S., BAUNAN, D.E. The role of Δ^9-desaturase in the production of cis-9,trans-11 CLA. ***The Journal of Nutritional Biochemistry.*** 2001; 12: 622-30.

DA SILVA LANNES, S.C., MEDEIROS, M.L. Processamento de achocolatado de cupuaçu por spray-dryer. ***Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences***. 2003; 39(1).

DOBARGES, C., MÁRQUEZ-RUIZ, G. Oxidized fats in foods. ***Current opinion in clinical nutrition & metabolic care***. 2003; 6: 157-163.

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

DZIEZAK, J. D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. ***Food Technology***. 1988 Apr; 42(4): 136-151.

DZONDO-GADET, A., NZIKOU, J.M., ETOUMONGO, A., LINDER, A., DESOBRY, S. encapsulation and storage of safou pulp oil in 6 DE maltodextrin. ***Process Biochemistry***. 2005; 40: 265-271.

EASTMAN, J.E., MOORE, C.O. Cold water soluble granular starch for gelled food composition. ***US Patent 4 465 702***. 1984.

ELMORE, J.S., COOPER, S.L., ENSER, M., MOTTRAM, D.S., SINCLAIR, L.A., WILKINSON, R.G., WOOD, J.D. Dietary manipulation of fatty acid composition in lamb meat and its effect on the volatile aroma compounds of grilled lamb. ***Meat Science***. 2005; 69: 233-242.

FARHOOSH, R. The effect of operational parameters of the Rancimat method on the determination of the oxidative stability measures and shelf-life prediction of soybean oil. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***. 2007; 84: 205-209.

FERRARI, C.K.B. Lipid oxidation in food and biological systems: general mechanisms and nutritional and pathological implications. ***Revista de Nutrição***. 1998; 11(1): 3-14.

FRANKEL, E.N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. ***Trends in Food Science of Technology***. 1993; 4: 220- 225.

FRITSCHE, J., STEINHART, H. Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. ***Z Lebensm Unters Forsch***. 1998; 206: 77-82.

GANE, P.J., DUNWELL, J.M., WARWICKER, J. Modeling based on the structure of vicilins predicts a histidine cluster in the active site of oxalate oxidase. ***Journal of Molecular Evolution.*** 1998; 46: 488-493.

GARCÍA-MARTÍNEZ, M.C., MÁRQUEZ-RUIZ, G., FONTECHA, J., GORDON, M.H. Volatile oxidation compounds in a conjugated linoleic acid-rich oil. ***Food Chemistry***. 2009; 113: 926-931.

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

GHARSALLAOUI, A., SAUREL, R., CHAMBIN, O., CASES, E., VOILLEY, A., CAYOT, P. Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilised oil-in-water emulsions. ***Food Chemistry***. 2010; 122: 447-454.

GIUA, L., BLASI, F., SIMONETTI, M.S., COSSIGNANI, L. Oxidative modifications of conjugated and unconjugated linoleic acid during heating. ***Food Chemistry***. 2012.

GOUIN, S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. ***Trends in Food Science & Technology***. 2004 July-Aug; 15(7-8)**:** 330–347.

GRIINARI, J.M., CORL, B.A., LACY, S.H., CHOUINARD, P.Y., NURMELA, K.V.V., BAUMAN, D.E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9-desaturase. ***Nutrient Metabolism***. 2000: 130; 2285-2291.

GRUMMER, R.R. Effect of feed on the composition of milk fat. ***Journal of Dairy Science.*** 1991; 74: 3244- 3257.

HA, Y.L., GRIMM, N.K., PARIZA, M.W. Anticarcinogens from fried ground beef: altered derivatives of linoleic acid. ***Carcinogenesis***. 1987; 8: 1881–1887.

HA, Y.L., GRIMM, N.K., PARIZA, M.W., Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: Identification and quantification in natural and processed cheeses. ***Journal of Agricultural Food Chemistry***. 1989; 37: 75-81.

HAMILTON, R.J., ROSSELL, J.B., HUDSON, B.J.F., LÖLIGER, J. In: ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. (Eds). ***Rancity in Foods***. London: Applied Science Publishers LTD, 1983, 304.

HARA, A., RADIN, N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. ***Analytical Biochemistry***. 1978; 90: 420-426.

HARDY, J., SCHER, J., BANON, S. Water activity and hydration of dairy powders. *Le Lait*. 2002; 82: 441-452.

HOGAN, S.A., O'RIORDAN, E.D., O'SULLIVAN, M. Microencapsulation and oxidative stability of spray-dried fish oil emulsions. ***Microencapsulation***. 2003; 20(5): 675-688.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. São Paulo, 2008. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=0&func=startdown&id=1>. Acesso em: 2011 Jul. 23

IP, C., BANNI, S., ANGIONI, E., CARTA, G., MCGINLEY, J., THOMPSON, H.J., BARBANO, D., BAUMAN, D. Conjugated linoleic acid- enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. ***Journal of Nutrition***. 1999; 1296: 2135-2142.

IP, C., CHIN, S.F., SCIMECA, J.A., PARIZA, M.W. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. ***Cancer Research***.1991; 51: 6118–6124.

IP, C., SCIMECA, J.A., THOMPSON, H.J. Conjugated linoleic acid: A powerful anticarcinogen from animal fat sources. ***Cancer*.** 1994; 1050–1054.

JADHAV, S.J., NIMBALKAR, S.S., KULKARNI, A.D., MADHAVI, D.L., RAJALAKSHMI, D., NARASIMHAN, S. Lipid oxidation in biological and food systems. In: MADHAVI, D.L., DESHPANDE, S.S., SALUNKHE, D.K. editores. ***Food antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perpectives***. New York: Marcel Dekker Inc; 1996. p.5-63.

JAFARI, S.M., ASSADPOOR, E., BHANDARI, B., HE, Y. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray-drying. ***Food Research International***. 2008; 41: 172-183.

JIMENEZ, M., GARCÍA, H.S., BERISTAIN, C.I. Spray-dried encapsulation of conjugated linoleic acid (CLA) with polymeric matrices. ***Journal of the Science of Food and Agriculture.*** 2006; 86: 2431-2437.

JIMENEZ, M., GARCÍA, H.S., BERISTAIN, C.I. Spray-drying microencapsulation and oxidative stability of conjugated linoleic acid. ***European Food Research and Technology***. 2004; 219: 588-592.

JOSEPH, S.V., JACQUES, H., PLOURDE, M., MITCHELL, P.L., MCLEOD, R.S., JONES, P.J.H. Conjugated linoleic acid supplementation for 8 weeks does not affect body composition, lipid profile, or safety biomarkers in overweight, hyperlipidemic men. ***The Journal of Nutrition***. 2011; 141: 1286-1291.

KAGAMI, Y., SUGIMURA, S., FUJISHIMA, N., MATSUDA, K., KOMETANI, T., MATSUMURA, Y. Oxidative stability, structure, and physical characteristics of microcapsules formed by spray-drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. ***Food Engineering and Physical Properties***. 2003; 68(7): 2248-2255.

KATAOKA, H., LORD, H.L., PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. ***Journal of chromatography A***. 200: 880(1): 35-62.

KENNEDY, A., MARTINEZ, K., SCHMIDT, S., MANDRUP, S., LAPOINT, K., MCINTOSH, M. Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. ***The Journal of Nutritional Biochemistry***. 2010; 21(3): 171-179.

KEPLER, C.R., HIRONS, K.P., MCNEILL, J.J., TOVE, S.B. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by Butyrivibrio fibrisolvens*. ***The Journal of Biological Chemistry***. 1996: 241(6); 1350-1354.

KIM, H.J., MIN, D.B. Chemistry of lipid oxidation. In: AKOH, C.C., MIN, D.B., editores. Food Lipids: ***Chemistry, Nutrition and Biotechnology***. 3ª ed. Boca Raton: CRC Press; 2008. p.299-319.

KOSARAJU, S.L., D'ATH, L., LAWRENCE, A. Preparation and characterization of chitosan microspheres for antioxidant delivery. ***Carbohydrate Polymers***. 2006; 64: 163-167.

KOUASSI, G. K., TERIVEEDHI, V. K., MILBY, C. L., AHMAD, T., BOLEY, M.S., GOWDA, N.M., TERRY, R.J. Nano-Microencapsulation and Controlled Release of Linoleic Acid in Biopolymer Matrices: Effects of the Physical State, Water Activity, and Quercetin on Oxidative Stability. ***Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences***. 2012; 2: 1-10.

KOWALSKI, B., RATUSZ, K., KOWALSKA, D., BEKAS, W. Determination of the oxidative stability of vegetable oils by differential scanning calorimetry and Rancimat measurements. ***European Journal of Lipid Science and Technology***. 2004; 106(3): 165-169.

KRAMER, J.K.G., FELLNER, V., DUGAN, M.E.R., SAUER. F.D., MOSSOBA, M.M., YURAWECZ, M.P. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. ***Lipids***. 1997; 32: 1219-1228.

KRITCHEVESKY, D., TEPPER, S.A., WRIGHT, S., TSO, P., CZARNECKI, S.K. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression os atherosclerosis in rabbits. ***The Journal of the American College of Nutrition***. 2000; 19: 472S-477S.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. ***Nature***. 1970 Aug; 227(5259): 680-685.

LAI, H.M., CHENG, H.H. Properties of pregelatinized rice flour made by hot air or gum puffing. ***International Journal of Food Science & Technology.*** 2004; 39: 201-212.

LARICK, D.K., PARKER, J.D. 2001. Chromatografic Analysis of Secondary Lipid Oxidation Products. ***Current Protocols in Food Analytical Chemistry***. D2.2.1-D2.2.9.

LAWLESS, F., STANTON, C., L'ESCOP, P., DEVERY, P.D., DILLON, P., MURPHY, J.J. Influence of breed on bovine milk *cis*-9, *trans*-11 – conjugated linoleic acid content. ***Livestock Production Science***. 1999; 62: 43-49.

LEDOUX, M., CHARDIGNY, J.M., DARBOIS, M., SOUSTRE, Y., SEBEDIO, J.L., LALOUX, L. Fatty acid composition of French butters, with special emphasis on Conjugated linoleic acid (CLA) *iso*mers. ***Journal of Food Composition and Analysis***. 1995; 18: 409-425.

LEPAGE, G., ROY, C.C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction**.** ***The Journal of Lipid Research***. 1986; 27: 114-120.

LIMA, B.N.B., LIMA, F.F., TAVARES, M.I.B., COSTA, A.M.M., PIERUCCI, A.P.T.R. Determination of the centesimal composition and characterization of flours from fruit seeds. ***Food Chemistry***. 2014; 151: 293-299.

LOWRY, D. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. AND RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. ***Journal of Biological Chemistry***. 1951 Nov; 193(1): 265-275.

MCCLEMENTS, D., LESMES, U. Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. ***Trends in Food Science & Technology.*** 2009; 20:448-57.

MCCLEMENTS, D.J., DECKER, E.A. Lipids. In: DOMADORAN, S., PARKIN, K.L., FENNEMA, O.R., editores. ***Fennema's Food Chemistry***. 4ª ed. Boca Raton: CRC Press; 1996. p.155-216

MEDINA, E.A., HORN, W.F., KEIM, N.L., HAVEL, P.J., BENITO, P., KELLEY, D.S., NELSON, G.J., ERICKSON, K.L. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on circulating leptin concentrations and appetite. ***Lipids***. 2000; 35(7): 783-788.

MILLER, C.C., PARK, Y., PARIZA, M.W., COOK, M.E. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic response due to endotoxin injection. ***Biochemical and Biophysical Research Comunications.*** 1994: 198; 1107-1112.

MUSHTAQ, S., MANGIAPANE, H.E., HUNTER, K.A. Estimation of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in UK foods and assessment of dietary intake in a cohort of healthy adults. ***Britsh Journal of Nutrition***. 2010; 103: 1366-1374.

NEDOVIC, V., KALUSEVIC, A., MANOJLOVIC, V., LEVIC, S., BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. ***Procedia Food Science 1***. 2011; 1806-1815.

NOONE, E.J., ROCHE, H.M., NUGENT, A.P., GIBNEY, M.J. The effect of dietary supplementation using isomeric belnds of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy human subjects. ***British Journal of Nutrition***. 2002; 88: 243-251.

NUNES, J.C., TORRES, A.G. Fatty acid and CLA composition of Brazilian dairy products, and contribution to daily intake of CLA. ***Journal of Food Composition and Analysis***. 2010: 23; 782-789.

OLCOTT, H.S., EINSET, E. A weighing method for measuring the induction period marine and other oils. ***Journal of American Oil Chemistry Society***. 1958; 35: 161-162.

PARIZA, M.W., ASHOOR, S.H., CHU, F.S., LUND, D.B. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. ***Cancer Letters***. 1979; 7: 63-69.

PARIZA, M.W., PARK, Y., COOK, M.E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. ***Progress in Lipid Research***. 2001; 40: 283-289.

PARK, C.W., KIM, S.J., PARK, S.J., KIM, J.H., KIM, J.K., PARK, G.B., KIM, J.O., HA, Y.L. Inclusion complex of conjugated linoleic acid (CLA) with cyclodextrins. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***. 2002; 50: 2977-2983.

PARK, Y., KIM, J., SCRIMGEOUR, A.G., CONDLIN, M.L., KIM, D., Park, Y.. Conjugated linoleic acid and calcium co-supplementation improves bone health in ovariectomised mice. ***Food Chemistry***. (2013); 140(1-2), 280-288.

PARK, Y., ALLBRIGHT, K.J., LIU, W., STORKSON, J.M., COOK, M.E., PARIZA, M.W. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. ***Lipids***. 1997; 32: 853-858.

PARODI, P. W. Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agents. ***Journal of Nutrition.*** 1997; 127: 1055–1060.

PEDROSA, C., DE FELICE, F. G., TRISCIUZZI, C. E FERREIRA, S. T. Selective neoglycosylation increases the structural stability of vicilin, the 7s storage globulin from pea seeds. ***Archives of Biochemistry and Biophysics***. 2000; 382(2): 203-210.

PEDROSA, C., TRISCIUZZI, C., FERREIRA, S.T. Effects of glycosylation on functional properties of vivilin, the 7S storage globulin from pea (Pisum sativum). ***Journal of agricultural and Food Chemistry.*** 1997; 45: 2025-2030.

PENEDO, L.A., NUNES, J.C., GAMA, M.A.S., LEITE, P.E.C., QUIRICO-SANTOS, T.F., TORRES, A.G. Intake of butter naturally enriched with cis9,trans11 conjugated linoleic acid reduces systemic inflammatory mediators in healthy young adults. ***Journal of Nutritional Biochemistry***. 2013; 24: 2144-2151.

PEREIRA, H.V.R., SARAIVA, K.P., CARVALHO, L.M.J., ANDRADE, L.R., PEDROSA, C., PIERUCCI, A.P.T.R. Legumes seeds protein isolates in the production of ascorbic acid microparticles. ***Food Research International***. 2009; 42(1):115-121.

PFEUFFER, M., FIELITZ, K., LAUE, C., WINKLER, P., RUBIN, D., HELWIG, U., GILLER, K., KAMMANN, J., SCHWEDHELM, E., BÖGER, R.H., BUB, A., BELL, D., SCHREZENMEIR, J. CLA does not impair endothelial function and decreases body weight as compared with safflower oil in overweight and obese male subjects. ***Journal of the American College of Nutrition***. 2011; 30(1): 19-28

PIERUCCI, A. P. T. R., ANDRADE, L. R., BAPTISTA, E. B., VOLPATO, N. M., ROCHA-LEÃO, M H. M. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. ***Journal of Microencapsulation***. 2006 Sept.; 23(6): 654-662.

PIERUCCI, A. P. T. R., ANDRADE, L. R., FARINA, M., PEDROSA, C., ROCHA-LEÃO, M H. M. Comparison of α-tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. ***Journal of Microencapsulation***. 2007; 24(3): 201-213.

QIAN, M., REINECCIUS, G. Potent aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese studied using a dynamic headspace (purge-trap) method. **Flavour and Fragance Journal**. 2003; 18: 252-259.

RAHMAN, M.M., FERNANDES, G., WILLIAMS, P. Conjugated linoleic Acid prevents ovariectomy-induced bone loss in mice by modulating both osteoclastogenesis and osteoblastogenesis. ***Lipids***. 2014; 49(3): 211-24.

RAMIREZ-SANTANA, C., CASTELLOTE, C., CASTELL, M., RIVERO, M., RODRÍGUEZ-PALMERO, M., FRANCH, A., PÉREZ-CANO, F.J. Long-term feeding of the cis-9,trans-11 isomer of conjugated linoleic acid reforces the specific immune response in rats. ***The Journal of Nutrition.*** 2009; 139: 76-81.

RANGEL, A., DOMONT, G.D., PEDROSA, C., FERREIRA, S.T. Functional properties of purified vicilins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and pea (*Pisum sativum*) and cowpea protein isolate. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***. 2003 Aug.; 51(19): 5792-5797.

RÉ, M.I. Microencapsulation by spray-drying. ***Drying Technology***. 1998; 16(6): 1195–1236.

REINECCIUS, G.A. Spray-drying of food flavors. In G. A. Reineccius & S. J. Risch (Eds.), **Flavor encapsulation**.Washington, DC: American Chemical Society. 1988; pp. 55-66.

REINECCIUS, G.A. The spray-drying of food flavors. ***Drying Technology***. 2004; 22(6): 1289-1324.

RISÉRIUS, U., ARNER, P., BRISMAR, K., VESSBY, B. Treatment with dietary trans 10 cis 12 conjugated linoleic acid cause isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. ***Diabetes care***. 2002; 25(9): 1516-1521.

RISÉRIUS, U., BERGLUND, L., VESSBY, B. Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomized controlled trial. ***International Journal of Obesity***. 2001; 25: 1129-1135.

RISÉRIUS, U., VESSBY, B., ÄRNLÖV, J., BASU, S. Effects of cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflamatory markers in obese men. ***The American Journal of Clinical Nutrition***. 2004; 80: 279-83.

RITZENTHALER, K., MCGUIRE, M.K., FALEN, R., SHULTZ, T.D., DASGUPTA, N., MCGUIRE, M.A. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. ***J. Nutr***. 2001; 131(5): 1548-1554.

ROACH, J.A.G., MOSSOBA, M.M., YURAWECZ, M.P., KRAMER, J.K.G. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. ***Analytica Chimica Acta.*** 2002; 465: 207-226.

RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L.M., FONTECHA, J. Hot topic: fatty acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomer composition of commercial CLA-fortified dairy products: evaluation after processing and storage. ***Journal of Dairy Science***. 2007; 90: 2083-2090.

ROSENBERG, M., KOPELMAN, I.J., TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***. 1990; 38(5): 1288-1294

ROSENBERG, M., SHEU, T.Y. Microencapsulation of volatiles by spray-drying in whey protein-based wall systems. ***International Dairy Journal***. 1996; 6: 273-284.

RYDER, J.W., PORTOCARRERO, C.P., SONG, X.M., CUI, L., YU, M., COMBATSIARIS, T., GALUSKA, D., BAUMAN, D.E., BARBANO, D.M., CHARRON, M.J., ZIERATH, J.R., HOUSEKNECHT, K.L. Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid – improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. ***Diabetes***. 2001; 50: 1149-1157.

SANGUANSRI, P., AUGUSTIN, M. A. Nanoscale materials development – a food industry perspective. ***Trends in Food Science and Technology.*** 2006 Oct.; 17(10): 547-556.

SANKARIKUTTY, B., SREEKUMAR, M.M., NARAYANAN, MATHEW, A.G. Studies on microencapsulation of cardamom oil by spray-drying technique. ***Journal of Food Science and Technology.*** 1988; 25: 325-355.

SEHAT, N. KRAMER, J.K.G., MOSSOBA, M.M., YURAWECZ, M.P., ROACH, J.A.G., EULITZ, K., MOREHOUSE, K.M., KU, Y. Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparision of chromatographic elution sequence. ***Lipids***. 1998; 33: 963-971.

SHAHIDI, F., WANASUNDARA, U.N. Methods for measuring oxidative rancity in fats and oils. In: AKOH, C.C., MIN, D.B., editores. Food Lipids: ***Chemistry, Nutrition and Biotechnology***. 3ª ed. Boca Raton: CRC Press; 2008. p.387-407.

SHEU, T.Y, ROSENBERG, M.J. Microencapsulation by spray-drying ethyl caprylate in whey protein and carbohydrate wall systems. ***Journal of Food Science.*** 1995; 60(1): 98-103.

SHEU, T.Y., ROSENBERG, M. Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. ***Journal of Food Science.*** 1998; 63(3): 491-494.

SILVA, F.A.M., BORGES, M.F.M., FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. ***Química Nova***. 1999; 22(1): 94-103.

SMEDMAN, A., VESSBY, B. Conjugated linoleic acid supplementation in humans-metabolic effects. ***Lipids.*** 2001; 36(8): 773-781.

SOOTTITANTAWAT, A., YOSHII, H., FURUTA, T., OHGAWARA, M., FORSSELL, P., PARTANEN, R., POUTANEN, K., LINKO, P. Effect of water activity on the release characteristics and oxidative stability of D-Limonene encapsulated by spray-drying. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***. 2004; 52: 1269-1276.

SZORCSIK, A.; NAGY, L.; SCOPELLITI, M., PELLERITO, L.; SIPOS, P. Characterization of complexes formed between $[Me_2Sn^{VI}]^{2+}$ and carboxymethylcelluloses. ***Carbohydrate Research***. 2006; 341: 2083-2089.

TAN, L.H., CHAN, L.W., HENG, W.S. Effect of oil loading on microspheres produced by spray-drying. ***Journal of Microencapsulation***. 2005; 22(3): 253-259.

TEUNOU, E., FITZPATRICK, J.J., SYNOTT, E.C. Characterisation of food powder flowability. ***Journal of Food Engineering.*** 1999; 39(1): 31-37.

THOM, E., WADSTEIN, J., GUDMUNDSEN, O. Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. ***J Int Med Res***. 2001; 29: 392-396

TSUBOYAMA-KASAOKA, N., TAKAHASHI, M., TANEMURA, K., KIM, H.-J., TANGE, T., OKUYAMA, H., KASAI, M., IKEMOTO, S., EZAKI, O. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. ***Diabetes***. 2000; 49: 1534-1542.

VEGA, C., ROOS, Y.H. Spray-dried dairy and dairy-like emulsions-compositional considerations. ***Journal of Dairy Science***. 2006; 89: 384-401.

VELASCO, J., DOBARGANES, M.C., MÁRQUEZ-RUIZ, G. Aplication of the accelerated test Rancimat to evaluate oxidative stability of dried microencapsulated oils. ***Grasas y Aceites***. 2000; 51(4): 261-267.

VIEGAS, M.C, BASSOLI, D.G. Linear retention index for characterization of volatile compounds in soluble coffee using GC-MS and HP-Innowax column. ***Química Nova***. 2007; 30(8): 2031-2034.

WALTON, D.E., MUMFORD, C.J. The morphology of spray-dried particles: the effect of process variables upon the morphology of srpay-dryed particles. ***Chemical Engineering Research and Design***. 1999: 77(5): 442-460.

WOLFF, R.L., BAYARD, C.C., FABIEN, R.J. Evaluation of sequential methods for the determination of butterfat fatty acid composition with emphasis on trans-18:1 acids. Application to the study of seasonal variation in French butters. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***. 1995; 72: 1471-83.

YETTELLA, R., CASTRODALE, C., PROCTOR, A. Oxidative stability of conjugated linoleic acid rich soy oil. ***Journal of American Oil Chemistry Society***. 2012; 89: 685-693.

YING, Y., GU, Z., ZHANG, G. Delivery of bioactive conjugated linoleic acid with self-assembled amylose-CLA complex. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***. 2009; 57: 7125-7130.

YOSHII, H., SOOTTITANTAWAT, A., LIU, X.D., ATARASHI, T., FURUTA, T., AISHIMA, S., OHGAWARA, M., LINKO, P. Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. ***Innovative Food Science and Emerging Technologies***. 2001; 2, 55–61.

YOUSEFI, S., EMAM-DJOMEH, Z., MOUSAVI, S.M. Effect of carrier type and spray-drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (Punica Granatum L.). ***Journal of Food Science and Technology***. 2011; 48(6): 677-684.

ANEXO 1- ARTIGO CIENTÍFICO ACEITO NA REVISTA FOOD CHEMISTRY

Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein

Costa, A. M. M.[1,2*]; Nunes, J. C.[2]; Lima, B. N.B[3]; Pedrosa, C.[1]; Calado, V.[4]; Torres, A. G.[2]; Pierucci, A. P. T. R.[1]

[1] Laboratório de Desenvolvimento de Alimentos para Fins Especiais e Educacionais, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil;

[2] Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil;

[3] Instituto de Macromoléculas Heloisa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil;

[4] Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

* Corresponding author: Av. Carlos Chagas Filho, 373, Centro de Ciências da Saúde, Bloco J sub solo, Sala 08, CEP: 21941 090, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

e-mail: appierucci@gmail.com; Phone number: + 55 21 3938 6697; Fax, +55 21 2280 8343.

Food Chemistry 168 (2015) 157–166

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein

A.M.M. Costa [a,b], J.C. Nunes [b], B.N.B Lima [c], C. Pedrosa [a], V. Calado [d], A.G. Torres [b], A.P.T.R. Pierucci [a,*]

[a] Laboratório de Desenvolvimento de Alimentos para Fins Especiais e Educacionais, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
[b] Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
[c] Instituto de Macromoléculas Heloisa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
[d] Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 5 February 2014
Received in revised form 28 May 2014
Accepted 5 July 2014
Available online 11 July 2014

Keywords:
Encapsulation
Spray-drying
Pea protein concentrate
Maltodextrin
Carboxymethylcellulose
Lipid oxidation

ABSTRACT

CLA was microencapsulated by spray drying in ten varied wall systems (WS) consisting of pea protein isolate or pea protein concentrate (PPC) alone at varied core:WS ratios (1:2; 1:3 and 1:4), or blended with maltodextrin (M) and carboxymethylcellulose at a pea protein:carbohydrate ratio of 3:1. The physical–chemical properties of the CLA microparticles were characterised by core retention, microencapsulation efficiency (ME), particle size and moisture. CLA:M:PPC (1:1:3) showed the most promising results, thus we evaluated the effect of M addition in the WS on other physical–chemical characteristics and oxidative stability (CLA isomer profile, quantification of CLA and volatile compounds by SPME coupled with CG-MS) during two months of storage at room temperature, CLA:PPC (1:4) was selected for comparisons. CLA:M:PPC (1:1:3) microparticles demonstrated better morphology, solubility, dispersibility and higher glass-transition temperature values. M addition did not influence the oxidative stability of CLA, however its presence improved physical–chemical characteristics necessary for food applications.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Conjugated linoleic acid (CLA) is formed by rumen bacterial fermentation combined with mammalian Δ^9-desaturation, and therefore is found naturally in dairy products and beef. Much interest has been drawn to CLA due to its anti-atherogenic, anti-carcinogenic, anti-diabetic, immunomodulatory and anti-obesity effects (Whigham, Watras, & Schoeller, 2007). CLA consumption vary greatly according to populations habitual diet (15–1000 mg/day), however, on average, it is lower than typical doses presenting bioactivity (Nunes & Torres, 2010; Whigham et al., 2007). Direct addition of free CLA aiming to supplement food products is limited by CLA hydrophobic nature and oxidative instability. CLA is very unstable in aqueous media leading to oxidative rancidity and nutritional loss, decreasing products quality and shelf-life (García-Martínez, Márquez-Ruiz, Fontecha, & Gordon, 2009). Therefore, effective food supplementation with CLA should guarantee protection of these bioactive fatty acids and preserve foods physical and chemical stability.

Microencapsulation is used to protect unstable molecules from interaction with food components and the adjacent environment during storage and food processing. Among microencapsulation methods, spray drying is the most commonly used in the food industry, because of its flexibility and low cost (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel, 2007). Several wall systems (WS) composed of proteins, gums and modified starches protected microencapsulated edible oils. Moreover, the combination of additional highly-soluble material can improve the functionalities of the particles, such as encapsulation efficiency and water solubility (Choi, Ryu, Kwak, & Ko, 2010; Jimenez, García, & Beristain, 2006; Kagami et al., 2003). Nevertheless, the search for new wall materials that are biocompatible and sustainable is a promising area (Gharsallaoui et al., 2007).

Legume seeds are attractive for use in food products, because they are less allergenic than animal proteins and present interesting functional properties, such as emulsification, solubility and film formation (Rangel, Domont, Pedrosa, & Ferreira, 2003). Besides, the use of vegetable proteins as wall materials have been preferred than animal derived proteins as a reflection of the current "green" trend in the food industry. Wall materials derived from plants are emerging due to their more sustainable production and the recent increased consumer concerns over their diets, safety of animal-derived products and the animals' breeding and slaughter conditions (Nesterenko, Alric, Silvestre, & Durrieu, 2013). In the case of pea proteins, the presence of high quality proteins also adds nutritional value to the food additive (Tome, 2012). Previous works

* Corresponding author. Address: Av. Carlos Chagas Filho, 373, Centro de Ciências da Saúde, Bloco J sub solo, Sala 08, CEP: 21941 090, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: +55 21 3938 6697; fax: +55 21 2280 8343.
E-mail address: pierucci@nutricao.ufrj.br (A.P.T.R. Pierucci).

http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.016
0308-8146/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

from our group showed that pea protein was an effective wall material for microencapsulation of ascorbic acid and α-tocoferol (Pereira et al., 2009; Pierucci, Andrade, Farina, Pedrosa, & Rocha-Leão, 2007). For the best of our knowledge, CLA microencapsulation by spray drying and using pea protein as wall material was not investigated. We aimed to produce CLA microparticles by spray-drying using varied WS consisting of pea protein concentrate (PPC) or pea protein isolate (PPI) as single constituents in different core:WS ratios, or blended with maltodextrin (M) or carboxymethylcellulose (CMC), and to investigate the effects of the WS tested on the physical–chemical properties of the powders and on the oxidative stability of the encapsulated CLA stored at room temperature for 2 months.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Microparticles were prepared with CLA (*c*9,*t*11/*t*10,*c*12, 1:1, w/w; Cognis, Brazil) as core and as wall materials: pea protein concentrate (PPC; Labonatus, Brazil), pea protein isolate (PPI), produced according to Rangel et al. (2003), maltodextrin (M; MOR REX 1910; Corn Products, Brazil), and sodium-carboxymethylcellulose (CMC) (Latinoquímica, Argentina). A commercial mixture of fatty acid methyl esters (37-component FAME mix; Supelco, PA, US) and a commercial standard (glyceryl triheptadecanoate; Sigma–Aldrich, US) were used for qualitative and quantitative analysis, respectively. Standards for the CLA isomers were a generous gift from Dr. Robert Adlof (Formerly of the US Department of Agriculture, Peoria, IL, US). A commercial mixture of saturated alcanes (C_7–C_{30} saturated alkanes standard; Supelco, PA, US) was used for identification of volatiles. All reagents used were of chromatographic grade (Tedia, São Paulo, Brazil; Merck, US).

2.2. Production of CLA microparticles

Ten formulations of feed emulsions were prepared with different core:WS ratios and with varied WS components (Table 1). Feed emulsions were prepared with 8.6% total solids content and 150 mL final volume, except for the formulations containing CMC, which had 3.7% total solids in 350 mL, because of high viscosity. Emulsions were prepared by dissolving the wall materials (PPI or PPC) in distilled water and homogenising with a magnetic stirrer for 30 min. In parallel, M and CMC were dissolved in distilled water for 30 min. CLA was emulsified by slowly dropping into the PPI/PPC solution, under continuous stirring (13,500 rpm) with an Ultra-Turrax (T25-IKA®; Labotechnik, US). After CLA dispersion, the carbohydrate solution was mixed with the emulsion in two steps: (1) agitation (13,500 rpm/2 min) with Ultra-Turrax (T25-IKA®; Labotechnik, USA) and; (2) Ultrasonic (DRH-UP 100H; Hielscher Ultrasonics, Germany) agitation (90% amplitude/1 cycle/2 min). The emulsions were fed immediately into a Mini Spray Dryer Büchi 290 (Büchi Laboratoriums Technik Flawil, Switzerland), at an inlet and outlet air temperature of 184 ± 3.0 °C and 88 ± 1.5 °C, respectively, through a 0.3 mm nozzle, 6 mL min^{-1} feed rate, 6,900 mL min^{-1} and 0.3 bar air flow, and 32.5 m^3 h^{-1} aspiration rate. Microparticles' formulations were selected according to basic microencapsulation performance, assessed through the following factors: moisture, CLA microencapsulation efficiency, CLA retention, and particle size. Further investigations of microparticles were conducted exclusively on selected formulations.

2.3. Characterisation of CLA microparticles

2.3.1. CLA retention

CLA methyl esters were produced by direct transesterification of microparticles containing 7 mg of lipid as described by Lepage and Roy (1986). The methylated CLA were quantified by gas chromatography coupled with flame ionisation detector (GC-FID) in a GC-2010 chromatograph (Shimadzu, Japan) according to Nunes and Torres (2010), with modifications. Briefly, the split ratio used was 1:20 and the oven heating program was modified to optimise separations. Column oven temperature was held at 200 °C for 10 min, temperature programmed at 1.5 °C/min to 210 °C and then held for 25 min. A solution of glyceryl triheptadecanoate in hexane (0.2 μg/μL) was used as internal standard for CLA quantification. Before microparticles analyses, the non encapsulated CLA (raw CLA) was analysed to confirm label information, and the composition of the raw material was 66.0% total CLA (31.6% *c*9,*t*11; 31.9% *t*12,*c*10; 1% *c*,*c*; and 1,5% *t*,*c*) and 34% of other fatty acids: 16:0, 1.1%; 18:0, 4.9%; 18:1, 27.6%; 18:2n-6, 0.4% (Supplementary material). As control, we analysed all the wall systems' components (PPI, PPC, CMC and M) and for calculation of CLA retention these data was considered quantitatively. CLA retention was calculated by the following equation and assuming that 66% of the core was composed of CLA:

$$\text{CLA retention } (\%) = \frac{\text{CLA microparticles(g per 100 g solids)}}{\text{CLA emulsion(g per 100 g solids)}} \times 100$$

2.3.2. Microencapsulation efficiency (ME)

Total CLA content was determined by GC-FID as described in the Section 2.3.1. Extractable CLA was determined according to

Table 1
Formulations of the feed emulsions tested for the CLA microencapsulation by spray-drying.

Formulation (w/w)	Solids[a] (%)	Emulsion volume (mL)	Components quantity (g)				
			CLA	PPI	PPC	CMC	M
CLA:PPI (1:2)	8.6	150	4.4	8.6	–	–	–
CLA:PPC (1:2)	8.6	150	4.4	–	8.6	–	–
CLA:PPI (1:3)	8.6	150	3.25	9.75	–	–	–
CLA:PPC (1:3)	8.6	150	3.25	–	9.75	–	–
CLA:PPI (1:4)	8.6	150	2.6	10.4	–	–	–
CLA:PPC (1:4)	8.6	150	2.6	–	10.4	–	–
CLA:M:PPI (1:1:3)	8.6	150	2.6	7.8	–	–	2.6
CLA:M:PPC (1:1:3)	8.6	150	2.6	–	7.8	–	2.6
CLA:CMC:PPI (1:1:3)	3.7	350	2.6	7.8	–	2.6	–
CLA:CMC:PPC (1:1:3)	3.7	350	2.6	–	7.8	2.6	–

CLA: conjugated linoleic acid, PPI: pea protein isolate, PPC: pea protein concentrate, M: maltodextrin, CMC: carboxymethylcellulose and solids: total solids content in the feed emulsion.
[a] Total solids were 13 g in all formulations.

(Sankarikutty, Sreekumar, Narayanan, and Mathew (1988), with modifications (Kouassi et al., 2012). ME was calculated as follows:

$$\text{ME } (\%) = \frac{\text{Total CLA} - \text{Extractable CLA}}{\text{Total CLA}} \times 100$$

2.3.3. Particle size

Microparticles were dispersed in ultra-pure water (Mili-Q; Millipore, US) and analysed in a particle size analyser (Mastersizer 2000-Malvern Instruments, England) by the scattering pattern of a transverse laser light. Results were reported as D[0.5] and scattering index (span), which are defined as maximum size (μm) of 50% analysed particles and the particles size range, respectively.

2.3.4. Proximate composition of microparticles

Moisture was determined in all samples with a moisture balance (MA35-Sartorius; Germany), with 500 mg samples in a standardised protocol according to manufacturer's instructions (105 °C for 90 min) right after production. Protein, carbohydrate and lipid contents were determined on selected CLA microparticles. Protein and carbohydrate were assessed according to Lima, Lima, Tavares, Costa, and Pierucci (2014). Lipid and fatty acid content were determined by gas chromatography, as described in Section 2.3.1.

2.3.5. Infrared absorption spectrometry (FTIR)

The selected CLA microparticles were submitted to infrared absorption spectrophotometry in a Varian Excalibur 3100 FT-IR spectrometer in transmittance mode with 20 scans and resolution of 2 cm^{-1}. Each sample was macerated and homogenised with KBr to form pellets used to obtain the spectra. As control, each wall material and the WS dried without CLA were analysed.

2.3.6. Thermogravimetric analysis (TGA)

A thermogravimetric analyser, from Perkin-Elmer Pyris 1, was used to analyse the thermal stability of the selected CLA microparticles and their components. Samples (5.0 mg) were heated from 25 °C to 800 °C (10 °C/min) under nitrogen gas flow (30 mL/min). As control, each component of the microparticles and the WS dried without CLA were analysed.

2.3.7. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

A Differential Scanning Calorimeter, from Perkin-Elmer, model Diamond, was used to examine the glass-transition temperature (Tg) of the selected CLA microparticles. Under a nitrogen gas flow of 20 mL/min, samples (5.0 mg) were scanned at heating and cooling steps. Two heating steps were used from 0 °C to 180 °C at a heating rate of 20 °C/min. One cooling step was used from 180 °C to 0 °C at 100 °C/min. Before and after each run the samples' pans were weighed and Tg was determined as the middle point of the first jump in the DSC thermogram baseline. As control, each component of the microparticles and the wall system dried without CLA were analysed.

2.3.8. Solubility

The solubility in water of the selected CLA microparticles was determined as described by Lai and Cheng (2004) with modifications. Briefly, 1.25 g of CLA microparticles (dry sample weight), was reconstituted in 15 mL of distilled water by stirring with a magnetic bar at 25 °C for 30 min. The emulsion was centrifuged at 7577.7×*g* for 30 min; subsequently, a supernatant aliquot (10 mL) was placed in a Petri dish and its weigh was measured after drying at 105 °C for 5 h in an oven (dry supernatant). Solubility in water was calculated by the following equations:

$$\text{Dry supernatant in 15 mL (g)} = \text{dry supernatant in 10 mL (g)} \times 1.5$$

$$\text{Solubility } (\%) = (\text{dry supernatant in 15 mL (g)}/\text{dry sample weight (g)}) \times 100$$

2.3.9. Dispersibility

CLA microparticles samples (50 mg) were mixed with 25 mL of PBS at pH 7.4 during 10 min at 500 rpm. Then 500 μL of the mixture was diluted in 500 μL of PBS solution, stirred at 2200 rpm for 3 min and placed in a cuvette to measure the absorbance at 440 nm wavelength using a spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Japan) for 20 min (Choi et al., 2010). The results were expressed as the difference between initial absorbance and final absorbance (Δ Abs).

2.3.10. Morphology

Surface morphology of selected CLA microparticles was carried out by scanning electron microscopy (SEM). Samples of microparticles were directly deposited on carbon conductive tape on aluminum SEM stubs, and coated with a thin gold layer, using a gold-sputtering (Blazers Union, FL-9496). The samples were analysed using a JEOL SEM 5310, operated at 20 kV.

2.4. Microparticles stability at room temperature

Right after production, the selected CLA microparticles formulations were placed in plastic bags, sealed, covered with aluminum foil for light protection and stored in desiccators at room temperature (25 °C and below 20% relative humidity). Microparticles were periodically analysed for up 2 months (0, 15, 30, 60 days). The microparticles' core stability was assessed by: (1) CLA isomer profile, base-catalysed transesterification followed by GC-FID; (2) CLA quantification, acid-catalysed transesterification followed by GC-FID (Section 2.3.1); and (3) Volatile degradation products of CLA, by SPME-GC-FID. In addition, water activity (A_w) of the microparticles was assessed at day 0 and after 15 and 60 days.

2.4.1. CLA isomers profile and CLA quantification

For determination of CLA isomers profile, it is necessary to avoid isomerization during analysis, and therefore CLA methyl esters were produced by base-catalysed transesterification as described by Kramer et al. (1997). The CLA from the microparticles was extracted (Hara & Radin, 1978) and methylated, with modifications proposed by Nunes and Torres (2010). After derivatization, CLA methyl esters were analysed by GC-FID as described in Section 2.3.1. Contents of CLA isomers were determined by peak areas internal normalisation of the following groups of isomers: *cis,trans*; *trans,cis*; *cis,cis* and *trans,trans*, and the results were presented as g/100 g total CLA.

In contrast, for determination of CLA concentration in microparticles (g CLA/100 g of microparticles), direct acid-based methylation was used as described in Section 2.3.1. Direct derivatization of samples was more appropriate for quantitative analysis, when total CLA concentrations were to be determined.

2.4.2. Volatile degradation products of CLA by SPME-GC-FID

2.4.2.1. Quantification of volatile compounds. Volatile compounds from CLA microparticles were extracted by solid phase microextraction (SPME) using a divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber (Supelco, PA, USA) (Larick & Parker, 2001). Extraction fiber was conditioned for 60 min in the GC injection port at 260 °C. An aliquot (1 g) of CLA microparticles was weighed in a headspace vial and dissolved in 3.25 mL 3 M KCl with internal standard (4.4 μg/mL of isopropanol in KCl solution). Vials were capped with a PTFE-lined septum and placed in a glycerol bath (40 °C) under magnetic agitation

(30 min) until equilibrium. Septum was pierced and the fiber was exposed to the sample headspace for 10 min at 40 °C.

Volatiles were analysed with a GC-2010 (Shimadzu, Japan) gas chromatograph equipped with a FID detector, split/splitless injector and a fused silica column 5% phenil/95% methylpolysiloxane (30 m × 0.32 mm ID, 3 μm film thickness; 007-5, Quadrex, USA). Volatile compounds were desorbed from the SPME fiber in the injection port for 3 min, in splitless mode, and after 3 min sampling time, split purge was open at 3.0 mL/min. The injection and detector temperatures were 260 °C and 280 °C, respectively. Helium was used as the carrier gas and column pressure was set to attain a carrier speed of 25.0 cm/s. Column oven temperature was held at 30 °C for 10 min, temperature programmed at 3 °C/min to 200 °C and held for 25 min. A C_7–C_{30} mixture was run under the same conditions to obtain linear retention index (LRI) values for the volatile compounds (Viegas & Bassoli, 2007). Results were expressed in μg volatile compound/g of microparticles and for comparisons of production of volatile compounds during the stability test, the area under the curve (volatile content (μg/g) *vs*. time (d)) was calculated.

2.4.2.2. Identification of volatile compounds. Qualitative analysis was performed by GC–MS on a GC-17A gas chromatograph coupled to a QP5050A mass spectrometer (Shimadzu, Japan). Chromatographic conditions used were similar to described in the Section 2.4.2.1. The mass spectrometer was operated in electron impact mode at 70 eV. The interface and ion source temperatures were 260 °C. Analyses were performed in full scan acquisition mode, in the mass range 29–500 *m*/*z* at 0.5 scan/s. Data were collected by Lab Solutions GC–MS (Shimadzu, Japan). Compounds were identified first by comparison of mass spectra with the National Institute of Standards library and calculation of similarity index by the instruments software (Lab Solutions GC–MS; Shimadzu, Japan), and also by comparing LRI values with published data of fatty acids' volatile oxidation products.

2.4.3. Microparticles' water activity (A_w)

A water activity analyser (LabMaster-aw; Novasina, Switzerland) was used to assess the microparticles A_w. Briefly, approximately 1 g of sample was used and measurements were performed at 25 °C. Results were recorded after samples did not present temperature and A_w variations during 10 and 1 min, respectively.

2.5. Statistical analysis

All statistical comparisons were based on triplicate results, and all data is presented as mean and standard deviation. Comparisons between means were made by *t*-test or one-way ANOVA with Tukey's post-test, whenever appropriate. Repeated measures two-way ANOVA with Bonferroni's post-test was used to investigate time- and formulation-dependent differences in water activity, CLA isomer profile, CLA quantification and volatile products during the stability test. Data were analysed with GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad software, Inc, US). Significance was established at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Encapsulation performance of the wall materials

3.1.1. CLA retention

In our laboratory, the use of the pea protein (isolated or concentrated) as wall material in the microencapsulation of ascorbic acid and α-tocopherol has been evaluated (Pereira et al., 2009; Pierucci et al., 2007). The higher core retention presented in these works demonstrated the effectiveness of this material to protect substances during droplet formation and drying and when CLA was used as core, the retention values were similar. All the formulations showed CLA retention near 90% or higher (mean CLA retention: 105 ± 12.3%) and were satisfactory compared to other works that microencapsulated CLA by spray-drying, or by inclusion complex with amylose and different types of cyclodextrins (Jimenez et al., 2006; Yang, Gu, & Zhang, 2009). Tan, Chan, and Heng (2005) and Rosenberg, Kopelman, and Talmon (1990) showed that high core:wall system ratios influence negatively the core retention. Moreover, other researchers have demonstrated the effect of the addition of polysaccharide in the WS on the core retention (Pierucci, Andrade, Baptista, Volpato, & Rocha-Leão, 2006; Pierucci et al., 2007; Rosenberg & Sheu, 1996). In this work the varied WS and core:WS ratios did not influence the CLA retention.

3.1.2. Microencapsulation efficiency (ME)

The PPC microparticles showed higher ME values than PPI, when these materials were used as single wall component. The core:WS ratios influenced the ME of the PPC microparticles and the carbohydrates addition improved this parameter in the two types of microparticles. Choi et al. (2010) and Jimenez et al. (2006) microencapsulated CLA with WS composed by whey proteins and carbohydrates, they showed values of ME in the range of 57–99%. In this study the higher values of ME were demonstrated in the microparticles with CMC in their WS, 41.6 and 40.6% for CLA:CMC:PPI (1:1:3) and CLA:M:PPC (1:1:3), respectively (Table 2).

It is noteworthy that this analysis can also induce an extraction of encapsulated oil to some extent, depending on the porosity of the matrix (Rosenberg & Sheu, 1996), thus resulting in a lower ME then the actual. ME is commonly determined by extracting unencapsulated oil (i.e. free oil) present on the surface of microparticles through washing powders with an organic solvent. The presence of free oil influences adversely the physical properties of spray dried powders, such as flowability, dispersibility, solubility, as well as the stability toward oxidation (Bae & Lee, 2008; Drusch, Serfert, Scampicchio, Schmidt-Hansberg, & Schwarz, 2007).

Vicilin is the predominant protein and component of the two microparticles in this study (Pereira et al., 2009) and proteins are porous wall materials (Drusch et al., 2007; Rosenberg & Sheu, 1996). According to Rosenberg and Sheu (1996), the additions of lactose in a proteinaceous wall system diminish the diffusion of the solvent through the matrix. This phenomenon could be explained by the formation of a dry crust and a continuous glass phase in which the proteins are dispersed. The dextrose equivalent (DE) and the molecular weight of the carbohydrate influenced greatly the porosity of the matrix (Hogan, O'Riordan, & O'Sullivan, 2003; Sheu & Rosenberg, 1998). Kagami et al. (2003) microencapsulated fish oil in WS composed by a mixture of sodium caseinate (NaCas) and maltodextrin with different DE (4, 11 and 18), and found that maltodextrins with higher DE increased the oxidative stability and decreased the unencapsulated oil of the microparticles. In addition the presence of carbohydrates in the WS could also increase the hydrophilic nature of the WS, and therefore diminished the interaction with the extraction solvent (Rosenberg & Sheu, 1996). PPC is the concentrated form of vicilin, thus this material also has lipids and carbohydrates in its composition. We suggested that the presence of this minor components and their interaction with CLA, could explain the higher ME values of the PPC microparticles.

The effect of varied core:WS ratios on ME has already been investigated by Rosenberg et al. (1990) and Tan et al. (2005), they showed that high core:WS ratios decreased ME. According to these authors, the amount of WS is insufficient to encapsulate the core. However Hogan, O'Riordan, and O'Sullivan (2003) did not find

Table 2
Physical–chemical parameters (mean ± SD) of microparticles containing CLA according to the core:wall system ratio and to wall material composition of the formulations.

Formulation (w/w)	ME (%)	PS		Moisture (%)
		D[0.5] (μm)	Span	
PPI				
CLA:PPI (1:2)	N.D.^{Aa}	8.96 ± 0.18^{Aa}	1.98 ± 0.0^{Aa}	4.0 ± 0.3^{Aa}
CLA:PPI (1:3)	N.D.^{Aa}	8.03 ± 0.15^{Ab}	2.16 ± 0.02^{Ab}	2.6 ± 0.3^{Aa}
CLA:PPI (1:4)	N.D.^{Aa}	8.39 ± 0.21^{Ab}	2.43 ± 0.3^{Ac}	4.7 ± 0.1^{Aa}
CLA:M:PPI (1:1:3)	7.4 ± 1.4$^{A\beta}$	6.66 ± 0.1$^{A\beta}$	2.31 ± 0.03^{A}	4.2 ± 0.3^{A}
CLA:CMC:PPI (1:1:3)	41.6 ± 1.4$^{A\beta\alpha}$	5.08 ± 0.06$^{A\beta\alpha}$	18.22 ± 3.18$^{A\beta\alpha}$	5.2 ± 0.8^{A}
PPC				
CLA:PPC (1:2)	32.0 ± 1.7^{Ba}	9.22 ± 0.25^{Aa}	2.13 ± 0.02^{Ba}	2.9 ± 0.4^{Aa}
CLA:PPC (1:3)	35.5 ± 0.6^{Ba}	7.16 ± 0.47^{Bb}	2.41 ± 0.05^{Bb}	3.2 ± 1.1^{Aa}
CLA:PPC (1:4)	14.7 ± 1.3^{Bb}	11.07 ± 0.59^{Bc}	2.06 ± 0.04^{Ba}	3.6 ± 0.5^{Aa}
CLA:M:PPC (1:1:3)	36.4 ± 0.0$^{B\beta}$	9.71 ± 0.8^{B}	2.08 ± 0.02^{B}	2.9 ± 0.1^{B}
CLA:CMC:PPC (1:1:3)	40.6 ± 2.0$^{A\beta}$	8.12 ± 0.3$^{B\beta}$	2.96 ± 0.06$^{B\beta\alpha}$	3.6 ± 0.8^{A}

CLA: conjugated linoleic acid; PPI: pea protein isolate; PPC: pea protein concentrate; M: maltodextrin; CMC: carboxymethylcellulose; ME: microencapsulation efficiency; PS: particle size; D[0.5]: particle median size; span: particle size scattering index. Different capital letters within the same column indicate significant differences ($P < 0.05$, *T*-test) within the same formulation in different groups (PPI or PPC). Different lower case letters within the same column indicate significant differences ($P < 0.05$, ANOVA) between the formulations in the same group (PPI or PPC). Superscript β indicates differences ($P < 0.05$, *T*-test) related to the addition of carbohydrates (M or CMC) in the formulations CLA:PPI (1:4) or CLA:PPC (1:4). Superscript α represents significant difference between formulations containing carbohydrate (M or CMC) in the same group (PPI or PPC) ($P < 0.05$, *T*-test).

any relation with core:WS ratio and ME, when they microcapsulated menhaden oil with a WS composed by proteins and cabohydrates. In this study, the different core:WS ratios only influenced the PPC formulations and the microparticle with the lower core:WS value, CLA:PPC (1:4) (Table 2), showed the least ME value. Therefore, the determination of an optimal ratio of core:WS is necessary for high ME values.

3.1.3. Particle size (PS)

The PS analysis showed that the microparticles are in the microscale, with median particles sizes between 5 and 11 μm for CLA:CMC:PPI (1:1:3) and CLA:PPC (1:4), respectively (Table 2). In the PPI microparticles, CLA:PPI (1:2) showed the biggest particle size, this result is in accordance with Tan et al. (2005), they have demonstrated that the oil load influenced the PS. However the PPC microparticles did not follow this trend. Pierucci et al. (2007) showed that the addition of carbohydrate in the WS increased particle size. However, in this study we observed the opposite effect, in the microparticles with the same core:WS ratio (1:4) (Table 2), carbohydrates diminished the median particles size in the two types of microparticles. The conflicting results could be associated with physical–chemical characterises of the encapsulated molecule.

Although the addition of CMC decreased the mean particle size, the microparticles with this carbohydrate showed a bigger variation in particles sizes, indicated by the highest span 18,2 and 2,9 for CLA:CMC:PPI (1:1:3) and CLA:CMC:PPC (1:4), respectively (Table 2). High viscosities interfere with the atomization process and lead to the formation of elongated and large droplets that adversely affect the drying rate (Rosenberg et al., 1990). We did not analyse the viscosities of the feed emulsion, but we had to dilute the formulations containing CMC to avoid atomization obstruction and proper suction of the feed emulsion. Production of particles with a narrow particle size distribution is important for controlling the sustained released of the core and stability (Walton & Mumford, 1999).

3.1.4. Moisture

Microparticles showed expected values of moisture according with Reineccius (2004), ranging from 2.6% for CLA:PPI (1:3) to 5.2% for CLA:CMC:PPI (1:1:3) and can thus be considered to possess long-term stability against microbiological spoilage (Drusch et al., 2007) (Table 2). Pierucci et al. (2006) showed a relation between the amount of solids in the emulsion and the moisture of the microparticles. Here all the feed emulsions had the same solids content, and we just found a statistical difference when CLA:M:PPI (1:1:3) and CLA:M:PPC (1:1:3) were compared.

We selected the PPC microparticles for further investigations, because they were more homogeneous regarding to their size and showed higher ME values (Table 2). CLA:PPC (1:4) and CLA:M:PPC (1:1:3) were the formulations chosen, as we aimed at to evaluate the addition of carbohydrate in the WS on other physical–chemical parameters and the oxidative stability of the microparticles. M was the preferred carbohydrate, as the microparticles containing CMC showed great variation in their particle size and the drying process was longer, compromising future applications. CLA:PPC (1:4) was elected because it had equivalent core:WS ratio, moreover we also wanted to determine the effectiveness of PPC, when used isolated in the WS and the influence of a smaller ME in the oxidative stability of the microparticles. From this point, all the results are related to the microparticles selected (CLA:PPC, 1:4; and CLA:M:PPC, 1:1:3), and the composition of formulations will be suppressed for clarity.

3.2. Characterisation of the selected microparticles

3.2.1. Proximate composition

The microparticles presented protein content of 58.2 ± 0.1% and 42.5 ± 0.1% for CLA:PPC and CLA:M:PPC, respectively. As expected, CLA:M:PPC showed higher carbohydrate content (30.4 ± 1.0% *vs.* 11.9 ± 0.5%), and the two types of microparticles demonstrated similar lipids contents (CLA:PPC, 26.3 ± 0.6%; CLA:M:PPC, 24.2 ± 1.0%). According to the fatty acid composition estimation, *cis,trans* CLA (≈33%) and *trans,cis* CLA (≈34%) were the major fatty acids in the particles, and presented a 1:1 mass ratio.

3.2.2. FTIR spectrometry

FTIR analysis (Fig. 1A) was used to evaluate if the drying process could promote interactions between microparticles compounds. When the FTIR spectra of M:PPC (1:3) dried by spray-drying was compared with the compounds' physical mixture, any absorption peak appeared or disappeared. This same trend was observed when the FTIR spectra of the selected CLA:M:PPC (1:1:3) and CLA:PPC (1:4) were compared with the isolated wall materials (M and PPC).

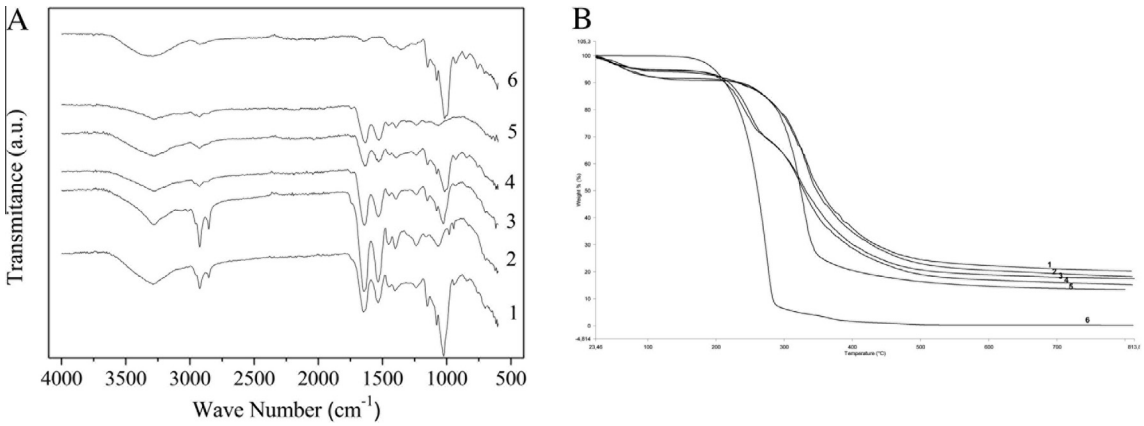

Fig. 1. Physical–chemical characterisation of CLA microparticles: (A) FTIR spectra of CLA microparticles and the wall system components. 1. CLA:M:PPC (1:1:3), 2. CLA:PPC (1:4), 3. M:PPC (dried in spray-drying), 4. M:PPC (physical mixing), 5.PPC and 6. M. (B) Thermogravimetric curves of all microcapsules components. 1. PPC, 2. M:PPC, 3. CLA:PPC (1:4), 4. CLA:M:PPC (1:1:3), 5. M, 6. CLA. CLA: conjugated linoleic acid, PPC: pea protein concentrate, M: maltodextrin.

The presence of peaks corresponding to the hydroxyl (≈3200 cm^{-1}), carbonyl (≈1640 cm^{-1}) and conjugated double bonds (≈1530 cm^{-1}) indicate the presence of CLA in the microparticles. Yang et al. (2009) produced self-assembled CLA complex with amylose and β-cyclodextrin, and found similar FTIR spectra. We also found 2 peaks (≈2920 cm^{-1} and ≈2850 cm^{-1}) corresponding to C–H simple bonds that vibrate by stretch, that could be related to the CLA in the microparticles (Fig. 1A).

Kosaraju, D'ath, and Lawrence (2006) observed interactions between olive leaf polyphenolic compounds with a chitosan matrix microencapsulated by spray-drying. In contrast, our results supports that the microencapsulation by spray-drying is a physical process, which did not change the chemical structure of the core substance.

3.2.3. Thermal stability

Differences in thermal stability among the microparticles and their components were examined by thermogravimetric analysis (Fig. 1B). All the substances, except CLA, showed an initial weight loss at temperatures under 100 °C, which is caused by sample dehydration. The initial weight loss of CLA:M:PPC and CLA:PPC microparticles were very similar to the moisture content assessed by the moisture balance. In addition, the absence of this initial weight loss in the CLA sample confirmed that this material was anhydrous (Table 2). Wall materials had similar degradation rates and degradation temperatures (M: 186.3 ± 1.8 °C and PPC: 158.5 ± 0.2 °C), thus the mixture of M with PPC did not increase the thermal stability of the WS. CLA:M:PPC and CLA:PPC microparticles showed lower degradation temperatures ($P < 0.05$), 131.0 ± 0.6 °C and 133.9 ± 0.4 °C, respectively, than CLA (145.5 ± 0.5 °C), suggesting that the microencapsulation process did not increase CLA thermal stability. The microparticles showed two stages of weight loss; the first stage corresponding to CLA degradation, and the second to WS degradation, as previously shown (Yang et al., 2009).

3.2.4. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The addition of M in the WS increased the Tg value of the CLA microparticles (CLA:M:PPC *vs.* CLA:PPC), however there were no differences when the wall materials were compared (PPC *vs.* M:PPC), suggesting that the differences observed could be related to the presence of CLA (Table 3). In the present work, we could not determine the CLA Tg. The addition of high molecular weight carbohydrates tended to increase Tg values of spray-dried fruit juices (Yousefi, Emam-Djomeh, & Mousavi, 2011).

Table 3
Glass-transition temperature (Tg), solubility and dispersibility of the microparticles and their components (mean ± SD).

Samples	Tg (°C) [A]	Solubility (%)[A]	Dispersibility (Δ Abs, $\times 10^{-3}$)[B]
Microparticles			
CLA:PPC (1:4)	41.4 ± 1.0a	22.4 ± 0.1[a]	38.8 ± 2.3[a]
CLA:M:PPC (1:1:3)	67.8 ± 2.2[b]	38.5 ± 1.8[b]	7.1 ± 0.8[b]
Materials			
CLA	ND	NA	NA
PPC	74.1 ± 2.1[b]	22.4 ± 0.1[a]	NA
M	156.3 ± 1.9[c]	86.3 ± 0.7[c]	NA
M:PPC	76.6 ± 5.4[b]	NA	NA

CLA: conjugated linoleic acid, PPC: pea protein concentrate, M: maltodextrin, ND: not detected and NA: not analysed.
[A] Different letters mean significant difference in the same column ($P < 0.05$, ANOVA).
[B] Different letters mean significant difference in the same column ($P < 0.05$, *T*-test).

Spray-drying products should be kept under their Tg to maintain quality during storage. At temperatures above Tg, an amorphous solid exists in a "rubbery" state in which the molecular mobility of the wall system is higher and the reactions are accelerated, resulting in physical–chemical changes and nutritional losses (Bhandari & Howes, 1999; Reineccius, 2004).

The microparticles produced showed satisfactory values of Tg compared to previous works (Kouassi et al., 2012; Yousefi et al., 2011). From the economical point of view, microparticles with high Tg are more appealing, because they are stable at ambient temperature, not requiring refrigeration during storage. However these results must be interpreted carefully, because other factors during storage, such as relative humidity, tend to influence core stability. In addition, even at temperatures below the Tg some reactions might occur at low rates, such as non-enzymatic browning, and some small molecules such as oxygen and water might diffuse through the glassy matrix (Andersen, Risbo, Andersen, & Skibsted, 2000; Bell & Hageman, 1994).

3.2.5. Solubility

Rangel et al. (2003) have demonstrated the high solubility of vicilin, the major component of PPC, in a wide range of pH values. However the solubilities of PPC and the microparticles (CLA:PPC, 1:4; and CLA:M:PPC, 1:1:3) (Table 3) were lower compared to previous data (>75%) of microencapsulated CLA in whey proteins (isolate or concentrate), M and Maillard reaction products (Choi et al.,

2010). Maltodextrin showed the highest solubility and addition of this carbohydrate in the WS improved microparticles solubility (Table 3). This high molecular weight carbohydrate is one of the most used wall materials in spray-drying processes because of its physical properties, such as high solubility and high Tg (Yousefi et al., 2011).

3.2.6. Dispersibility

Dispersibility is primarily influenced by particle size, density and the WS used (Reineccius, 2004). The small values of Δ_{Abs} observed for the microparticles indicate good dispersibility (Table 3). When the particles settle down rapidly, high values of Δ_{Abs} are found, and vice versa.

In the present work we only evaluated the influence of the WS, because the two formulations had similar particle size (Table 2). CLA:M:PPC presented higher dispersibility than CLA:PPC, possibly because of addition of a soluble carbohydrate (M). According to Choi et al. (2010) the interactions protein-water and sugar-water are responsible for differences in microparticles' dispersibility. The results of dispersibility and solubility in the present work are consistent, and taken together suggest that the CLA microparticles produce stable emulsions when dispersed in water.

3.2.7. Morphology

Scanning electron micrograph (SEM) images showed that all microparticles presented spherical geometry but differed in surface topography. CLA:PPC was characterised by intense invaginations and roughness (Fig. 2A and B). In contrast, CLA:M:PPC surface topography was less rough, and did not present agglomeration problems (Fig. 2C and D). These results are in contrast with Pierucci et al. (2007), that showed maltodextrin combined with pea protein as WS did not affect particle surface morphology.

Microstructure of spray-dried microcapsules is affected by wall composition and properties, core-to-wall ratio, drying parameters, and storage conditions (Jimenez et al., 2006; Sheu & Rosenberg, 1998). Invaginations formation has been attributed to effects of drying rate, viscoelastic properties of the wall matrix and uneven shrinkage at early stages of drying (Sheu & Rosenberg, 1998). Additionally, protein-to-sugar ratio in the WS affected morphology of spray-dried CLA microparticles (Choi et al., 2010). Protein content in microparticles was negatively associated with surface invaginations, and therefore formulations with higher protein contents presented less invaginations (Choi et al., 2010). Another factor explored by Choi et al. (2010) was protein extract purity, especially concerning carbohydrates, because lactose seemed to stimulate invaginations' formation. Accordingly, the protein concentrate used in the present work presented carbohydrates.

Invaginations adversely affect powder floatability, reconstitution properties and core material stability (Rosenberg & Sheu, 1996). Microparticles with rough and/or invaginated surfaces present accelerated release of encapsulated material due to a greater surface area (Walton & Mumford, 1999). In the present work, we did not observe cracks and open pores in CLA:PPC and CLA:M:PPC microparticles, which according to Sheu and Rosenberg (1998) might result in appropriate encapsulating ability of the core material.

3.3. Stability test

3.3.1. CLA isomer profile

CLA biological effects are isomer-specific (Whigham et al., 2007), thus the production of microparticles that could keep initial CLA isomer profile during storage is a relevant issue. Microencapsulated CLA isomer profile remained fairly stable during storage

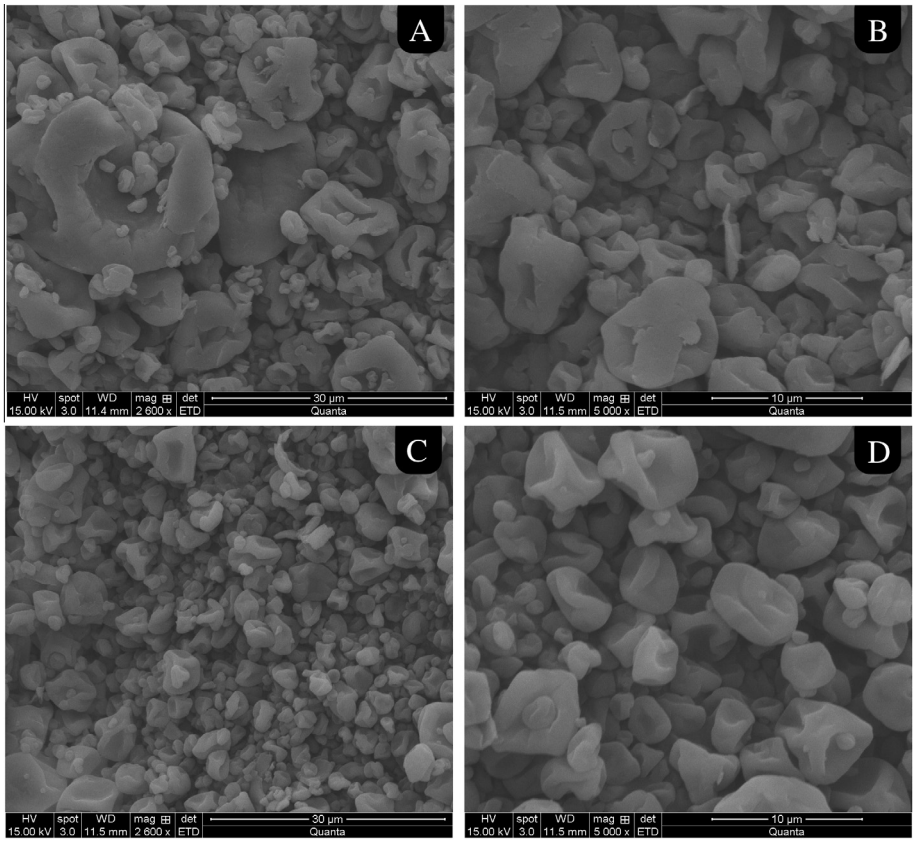

Fig. 2. Structure of the microparticles produced. CLA:PPC, bar:, 30 µm and 10 µm for A and B, respectively. CLA:M:PPC, bar: 30 µm and 10 µm for C and D, respectively.

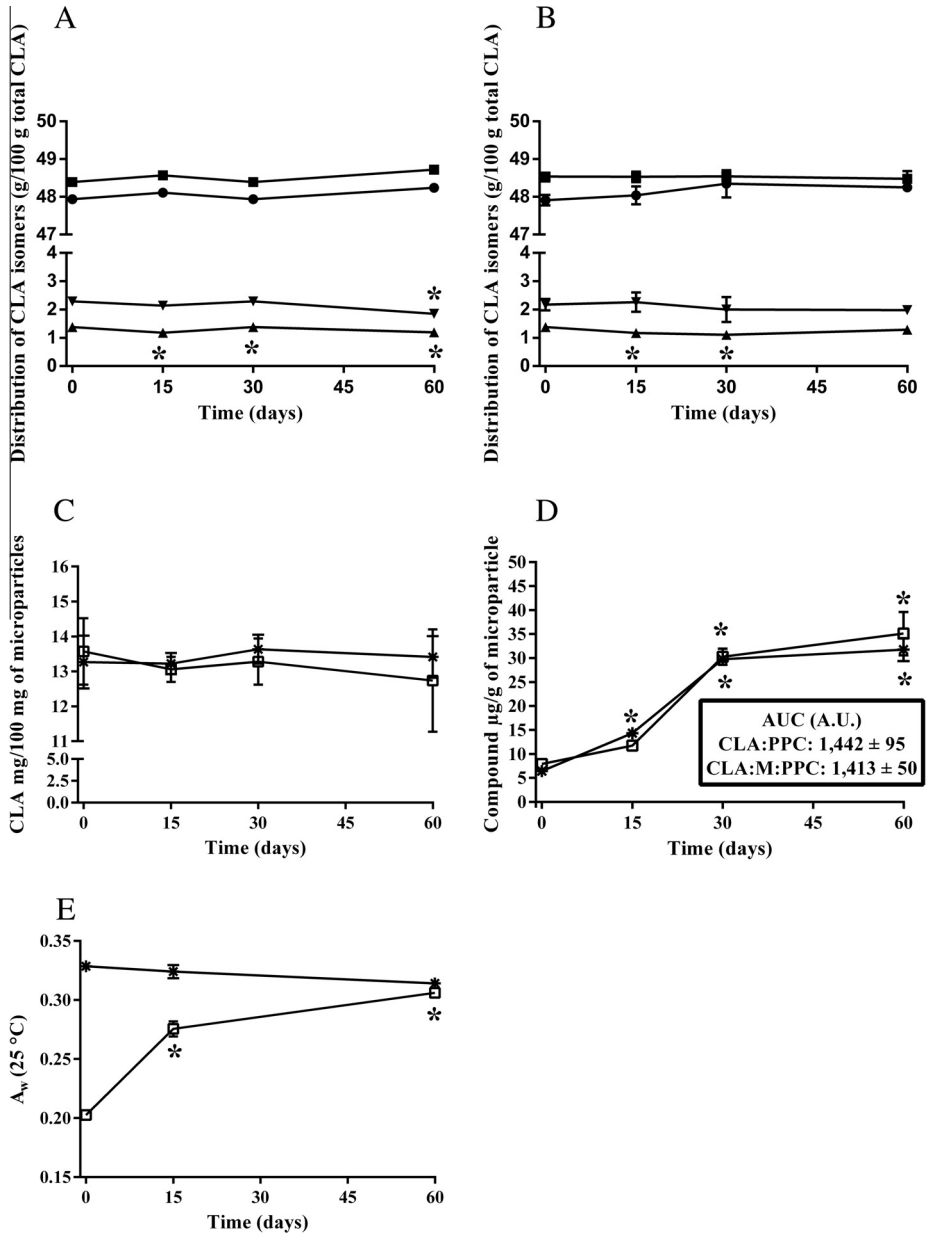

Fig. 3. Chemical stability of CLA:M:PPC and CLA:PPC microparticles stored at room temperature. CLA isomer profile (%) of (A) CLA:PPC and (B) CLA:M:PPC; (C) Total CLA (mg/100 g) in microparticles and (D) Heptanal production in microparticles (µg/g microparticles). (E) Water activity (A_w) of the microparticles at 25 °C. Standard deviations in Fig 3E were estimated based on the average variation of the samples. CLA *cis,trans*: ●; CLA *trans,cis*: ■; CLA *cis,cis*: ▲; CLA *trans,trans*: ▼; CLA:M:PPC: ✳ and CLA:PPC: □. *Significantly different from day 0 ($P < 0.05$; repeated measures two-way-ANOVA).

at room temperature for 2 months (Fig. 3A and B). Slight changes of the two minor groups of CLA isomers (*cis,cis* and *trans,trans*) were observed in the two microparticles. In the CLA:PPC *cis,cis* isomers decreased from zero to 15 days, and stabilized thereafter. In contrast, *trans,trans* isomers distribution was stable during the first 30 days, and decreased thereafter. Concerning CLA:M:PPC microparticles, *cis,cis* isomers decreased from zero to 15 days, stabilized from 15 to 30 days, and increased back to initial values at the end of the study. However, *trans,trans* isomers remained constant during the stability test.

These results are in accordance with other studies that showed a decrease of the minor CLA isomers during thermal processing and storage (Giua, Blasi, Simonetti, & Cossignani, 2012; Rodríguez-Alcalá & Fontecha, 2007). We also evaluated the influence of the drying process on the CLA profile of the microparticles (data not shown). Although high temperatures (150–220 °C) are used for microparticles production by spray-drying, CLA isomer profile was not influenced. Inside the drying chamber, drying takes place almost instantaneously and an intense evaporation takes place at the surface of each droplet. Consequently to the high evaporation rate, droplet remains at moderate temperatures (50–80 °C) until dry state is reached (Gharsallaoui et al., 2007).

3.3.2. CLA quantification

To avoid misleading interpretations that could be caused by CLA isomer profile estimated by internal normalisation, we also evaluated CLA concentration in the microparticles during the stability test (Fig. 3C). CLA contents did not vary between CLA:PPC and CLA:M:PPC microparticles, and were stable in both powders during storage for 60 days (Fig. 3C). Furthermore, water activity

(A_w, 25 °C) of the microparticles was determined during storage to assess if powders were absorbing or losing water. Water activity of CLA:M:PPC powder was stable between zero and 60 days of storage (0.322 ± 0.007). In contrast, the CLA:PPC microparticles presented a slight increase in A_w (25 °C) during storage for 60 days (day 0: 0.203 ± 0.001 A_w *vs.* day 60: 0.306 ± 0.003 A_w; Fig. 3E). Although moisture was not determined during storage and sorption isotherms of the microparticles were not determined in the present work, based on samples' A_w variation during storage and on published sorption isotherms of powders with similar composition (Hardy, Scher, & Banon, 2002) it might be inferred that moisture variation was only slight and lead to a weight variation in the range of 2–3%, which is negligible to microcapsules composition during the stability test. Therefore, results of CLA quantification (Fig. 3C) were in accordance with stability of CLA isomer profile (Fig. 3A and B) and were consistent with the efficacy of the two wall systems for CLA protection.

3.3.3. Volatile oxidation products

Although five volatile compounds were identified in the microparticles (hexanal, 2-heptanone, heptanal, 2,2-dimethyl-decane and decane), these were also present in similar amounts in the wall material, with the exception of heptanal. The occurrence of these volatile compounds in the wall material was probably due to the presence of residual pea lipids, which were probably oxidised. Therefore, only heptanal was considered as a marker of CLA oxidation during storage. Heptanal was previously found as oxidation product in CLA-rich oil, and not in control (safflower oil), indicating that it might be a useful specific marker of CLA oxidation progress (García-Martínez et al., 2009). In the present study, heptanal concentrations increased up to 30 days and stabilized thereafter (Fig. 3D). After 60 days of storage, heptanal contents in the two types of microparticles (CLA:M:PPC, 31.7 ± 2.4; CLA:PPC, 35.1 ± 4.5) were smaller than the concentration of this volatile in a CLA-rich oil after ten days at 60 °C demonstrated by García-Martínez et al. (2009). These results are consistent with CLA stability (Fig. 3A–C) and indicate only minor changes in CLA by oxidation.

In order to evaluate the influence of microparticles WS composition in oxidative stability, AUC was calculated and reflect total production of heptanal by CLA oxidation (Fig. 3D). Heptanal increased up to 30 days and stabilized thereafter to the end of the study and this behaviour was similar between microparticles, and also total volatiles produced (CLA:M:PPC, 1412.7 ± 49.7 *vs.* CLA:PPC, 1442.3 ± 94.5) were not significantly different ($P > 0.05$) (Fig. 3D). Although we did not find influence of WS on total volatile production, Jimenez et al. (2006) showed that aldehyde accumulation was associated with WS composition of microencapsulated CLA. In this study microparticles solely with whey protein showed the lowest aldehyde accumulation and the best microstructure (spherically-shaped, smooth-surface and free of visible cracks and pores) (Jimenez et al., 2006). However, in other studies with WS comprising only protein(s) presented high oxygen permeability that could be reduced by addition of carbohydrates (Bae & Lee, 2008; Kagami et al., 2003). This may be partly due to the hydrophobic nature of oxygen gas and therefore, the presence of hydrophilic components, such as carbohydrates, could reduce wall matrix permeability to oxygen (Bae & Lee, 2008).

In contrast, oxygen diffusion across the wall greatly depends on dried WS porosity and integrity (Jimenez et al., 2006), and according to the morphological analysis in the present study the two types of microparticles produced had a surface topography devoid of open pores and cracks. CLA:PPC microparticles presented surface topography with more invaginations and roughness than CLA:M:PPC microparticles. According to Walton and Mumford (1999) these characteristics could increase core release, because of larger surface area and consequently higher interaction with medium. However, the two formulations showed effective core protection, despite of surface roughness and variation in solubility, demonstrating that in this case microparticles' morphology did not influence core stability. Possibly, microparticles' surface topography in this case is related to the material properties of pea protein preparations, as previously shown (Pierucci et al., 2007).

4. Conclusion

PPC microparticles showed higher microencapsulation efficiency values and more homogeneous particles. In this sense, we selected the CLA:M:PPC (1:1:3) formulation for further characterisations and stability testing, CLA:PPC (1:4) was also used for comparisons. Carbohydrate addition to the WS improved morphological properties, such as surface topography, dispersibility, solubility, and increased microparticles Tg values. Microencapsulation in the two WS was able to keep CLA stable at room temperature for 60 days, as both CLA:PPC and CLA:M:PPC microparticles showed similar and satisfactory results in stability tests. Although carbohydrate addition did not affect core stability in the proportion tested, M improved WS characteristics, such as morphological properties, dispersibility, solubility and Tg, that could favour food applications. This work was the first in which a highly hydrophobic molecule, CLA, was microencapsulated with pea proteins as the WS major component. Besides, the results here presented contribute to confirm the versatility of wall systems composed by more than one material and to increase the application range of pea protein, a natural, low cost, sustainable and hypoallergenic wall material.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq, CAPES and FAPERJ (Brazil). A.M.M.C. was a recipient of a CAPES MSc studentship, and B.N.N.L. and J.C.N. were recipients of a CAPES DSc studentship. The authors are gratefull to Mair Machado Medeiros and Leonardo Andrade for morphology analyzes assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.016.

References

Andersen, A., Risbo, J., Andersen, M., & Skibsted, L. (2000). Oxygen permeation through an oil-encapsulating glassy food matrix studied by ESR line broadening using a nitroxyl spin probe. *Food Chemistry, 70*, 499–508.

Bae, E. K., & Lee, S. J. (2008). Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation, 25*(8), 549–560.

Bell, L. N., & Hageman, M. J. (1994). Differentiating between the effects of water activity and glass transition dependent mobility on a solid state chemical reaction: Aspartame degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42*(11), 2398–2401.

Bhandari, B., & Howes, T. (1999). Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering, 40*(1–2), 71–79.

Choi, K.-O., Ryu, J., Kwak, H.-S., & Ko, S. (2010). Spray-dried conjugated linoleic acid encapsulated with Maillard reaction products of whey proteins and maltodextrin. *Food Science and Biotechnology, 19*(4), 957–965.

Drusch, S., Serfert, Y., Scampicchio, M., Schmidt-Hansberg, B., & Schwarz, K. (2007). Impact of physicochemical characteristics on the oxidative stability of fish oil microencapsulated by spray-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*(26), 11044–11051.

García-Martínez, M. C., Márquez-Ruiz, G., Fontecha, J., & Gordon, M. H. (2009). Volatile oxidation compounds in a conjugated linoleic acid-rich oil. *Food Chemistry, 113*(4), 926–931.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International, 40*(9), 1107–1121.

Giua, L., Blasi, F., Simonetti, M. S., & Cossignani, L. (2012). Oxidative modifications of conjugated and unconjugated linoleic acid during heating. *Food Chemistry*.

Hara, A., & Radin, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry, 90*(1), 420–426.

Hardy, J., Scher, J., & Banon, S. (2002). Water activity and hydration of dairy powders. *Le Lait, 82*, 441–452.

Hogan, S. A., O'Riordan, E. D., & O'Sullivan, M. (2003). Microencapsulation and oxidative stability of spray-dried fish oil emulsions. *Journal of Microencapsulation, 20*(5), 675–688.

Jimenez, M., García, H. S., & Beristain, C. I. (2006). Spray-dried encapsulation of Conjugated Linoleic Acid (CLA) with polymeric matrices. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 2437*, 2431–2437 [May 2005].

Kagami, Y., Sugimura, S., Fujishima, N., Matsuda, K., Kometani, T., & Matsumura, Y. (2003). Oxidative stability, structure, and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *Journal of Food Science, 68*(7), 2248–2255.

Kosaraju, S. L., D'ath, L., & Lawrence, A. (2006). Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydrate Polymers, 64*(2), 163–167.

Kouassi, G. K., Teriveedhi, V. K., Milby, C. L., Ahmad, T., Boley, M. S., Gowda, N. M., & Terry, R. J. (2012). Nano-microencapsulation and controlled release of linoleic acid in biopolymer matrices: Effects of the physical state, water activity, and quercetin on oxidative stability, 2(March), 1–10.

Kramer, J. G., Fellner, V., Dugan, M. R., Sauer, F., Mossoba, M., & Yurawecz, M. (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids, 32*(11), 1219–1228.

Lai, H.-M., & Cheng, H.-H. (2004). Properties of pregelatinized rice flour made by hot air or gum puffing. *International Journal of Food Science & Technology, 39*(2), 201–212.

Larick, D. K., & Parker, J. D. (2001). Chromatographic analysis of secondary lipid oxidation products. In R. E. Wrolstad, T. E. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, ... P. Sporns (Eds.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (pp. 1–9). John Wiley & Sons, Inc..

Lepage, G., & Roy, C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research, 27*(1), 114–120.

Lima, B. N. B., Lima, F. F., Tavares, M. I. B., Costa, A. M. M., & Pierucci, A. P. T. R. (2014). Determination of the centesimal composition and characterization of flours from fruit seeds. *Food Chemistry, 151*, 293–299.

Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., & Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*.

Nunes, J. C., & Torres, A. G. (2010). Fatty acid and CLA composition of Brazilian dairy products, and contribution to daily intake of CLA. *Journal of Food Composition and Analysis, 23*(8), 782–789.

Pereira, H. V. R., Saraiva, K. P., Carvalho, L. M. J., Andrade, L. R., Pedrosa, C., & Pierucci, A. P. T. R. (2009). Legumes seeds protein isolates in the production of ascorbic acid microparticles. *Food Research International, 42*(1), 115–121.

Pierucci, A. P. T. R., Andrade, L. R., Baptista, E. B., Volpato, N. M., & Rocha-Leão, M. H. M. (2006). New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *Journal of Microencapsulation, 23*(6), 654–662.

Pierucci, A. P. T. R., Andrade, L. R., Farina, M., Pedrosa, C., & Rocha-Leão, M. H. M. (2007). Comparison of alpha-tocopherol microparticles produced with different wall materials: Pea protein a new interesting alternative. *Journal of Microencapsulation, 24*(3), 201–213.

Rangel, A., Domont, G. B., Pedrosa, C., & Ferreira, S. T. (2003). Functional properties of purified Vicilins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and pea (*Pisum sativum*) and cowpea protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(19), 5792–5797.

Reineccius, G. A. (2004). The spray drying of food flavors. *Drying Technology, 22*(6), 1289–1324.

Rodríguez-Alcalá, L. M., & Fontecha, J. (2007). Hot topic: Fatty acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomer composition of commercial CLA-fortified dairy products: Evaluation after processing and storage. *Journal of Dairy Science, 90*, 2083–2090.

Rosenberg, M., Kopelman, I. J., & Talmon, Y. (1990). Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38*(5), 1288–1294.

Rosenberg, M., & Sheu, T.-Y. (1996). Microencapsulation of volatiles by spray-drying in whey protein-based wall systems. *International Dairy Journal, 6*(3), 273–284.

Sankarikutty, B., Sreekumar, M. M., Narayanan, C. S., & Mathew, A. G. (1988). Studies on microencapsulation of cardamom oil by spray drying technique. *Journal of Food Science and Technology, 25*(6), 325–355.

Sheu, T.-Y., & Rosenberg, M. (1998). Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. *Journal of Food Science, 63*(3), 491–494.

Tan, L. H., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2005). Effect of oil loading on microspheres produced by spray drying. *Journal of Microencapsulation, 22*(3), 253–259.

Tome, D. (2012). Criteria and markers for protein quality assessment – a review. *The British Journal of Nutrition, 108*, S222–S229 [Suppl].

Viegas, M. C., & Bassoli, D. G. (2007). Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. *Química Nova*.

Walton, D., & Mumford, C. (1999). The morphology of spray-dried particles: The effect of process variables upon the morphology of spray-dried particles. *Chemical Engineering Research and Design, 77*(July), 442–460.

Whigham, L. D., Watras, A. C., & Schoeller, D. A. (2007). Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: A meta-analysis in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition, 85*(5), 1203–1211.

Yang, Y., Gu, Z., & Zhang, G. (2009). Delivery of bioactive conjugated linoleic acid with self-assembled amylose–CLA complex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57*(15), 7125–7130.

Yousefi, S., Emam-Djomeh, Z., & Mousavi, S. M. (2011). Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica granatum* L.). *Journal of Food Science and Technology, 48*(6), 677–684.