

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

MICROENCAPSULAÇÃO DE β -CAROTENO PELA COACERVAÇÃO
COMPLEXA EMPREGANDO COMO MATERIAL DE PAREDE
OVALBUMINA E ALGINATO DE SÓDIO

Alan Marques Farias

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

**MICROENCAPSULAÇÃO DE β -CAROTENO PELA COACERVAÇÃO COMPLEXA
EMPREGANDO COMO MATERIAL DE PAREDE OVALBUMINA E ALGINATO
DE SÓDIO**

Alan Marques Farias

Sob a orientação do Professor
Dr. Edwin Elard Garcia-Rojas

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ
Outubro, 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F224m Farias, Alan Marques, 1988-
Microencapsulação de β -caroteno pela coacervação
complexa empregando como material de parede
ovalbumina e alginato de sódio / Alan Marques Farias.
Volta Redonda, 2022.
75 f.: il.

Orientador: Edwin Elard Garcia Rojas.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Tecnologia de Alimentos, 2022.

1. Biopolímeros. 2. Interação Eletrostática. 3.
Diagrama de Fases. 4. Eficiência de Encapsulamento.
5. Fortificação. I. Rojas, Edwin Elard Garcia, 1972-,
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos III. Título.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível
Superior-Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



TERMO Nº 1105/2022 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.065651/2022-91

Seropédica-RJ, 21 de outubro de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ALAN MARQUES FARIAS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/10/2022

EDWIN ELARD GARCIA ROJAS (Dr) UFF (orientador)
BERNARDO DE SA COSTA (Dr.) UFF
JUAREZ VICENTE (Dr.) IFC

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 21/10/2022 16:32)
EDWIN ELARD GARCIA ROJAS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.996-##

(Assinado digitalmente em 25/10/2022 13:19)
JUAREZ VICENTE
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.469-##

(Assinado digitalmente em 24/10/2022 08:01)
BERNARDO DE SÁ COSTA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.337-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **1105**, ano: **2022**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **21/10/2022** e o código de verificação: **3b947a2f7c**

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Graciete e Anilton (*in memoriam*)
que me educaram para a vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção e sustento diários.

Ao orientador, Prof. Edwin, pela enorme paciência, compreensão e apoio na orientação possibilitando a realização do presente trabalho.

À minha família pelos momentos de apoio e conselhos norteadores.

Aos meus irmãos Wilker e Willes pelo afeto.

Aos meus amigos, a doutoranda Schalana Oliveira e o prof. Juliano Minto, pelo apoio e incentivo na realização do mestrado.

Aos meus avós Marly Lobo e José Lobo (*in memoriam*), e minha prima Rayane Lobo pelo afeto, apoio e conselhos ao longo de toda a caminhada pessoal e acadêmica.

Aos amigos que conheci no LETA, em especial o Augusto que sempre me auxiliou com seu conhecimento e boa vontade em ajudar. A Barbara e Jéssica sempre prontas a ajudar. Obrigado a todos pelos momentos de conselhos, descontração e apoio no dia a dia do laboratório e nas realizações das análises.

A todos que me ajudaram, direta e indiretamente, e que marcaram com sua presença em minha trajetória, acadêmica e social.

Aos colegas do mestrado, por me presentear com suas experiências profissionais e de vida, durante os últimos dois anos.

Agradeço a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade de aperfeiçoamento pessoal e profissional.

RESUMO

FARIAS, Alan Marques. **Microencapsulação de β -caroteno pela coacervação complexa empregando como material de parede ovalbumina e alginato de sódio**. 2022. 75p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

O β -caroteno (β C) é um composto lipossolúvel natural necessário para a saúde humana, sendo uma fonte alimentar importante de provitamina A, mas apresenta alta instabilidade química, que aumenta sua oxidação na presença de fatores extrínsecos. O presente estudo teve como objetivo microencapsular β C em complexos coacervados formados pela interação entre ovalbumina (OVA) e alginato de sódio (NaAlg). A técnica de microencapsulação foi empregada em pH 4,0 e proporção 8:1 (OVA:NaAlg, m/m) após confirmação da afinidade desses complexos com potencial zeta, estudo do diagrama de fases, análises turbidimétrica e de calorimetria de titulação isotérmica. As cápsulas formadas a partir do complexo OVA:NaAlg apresentaram morfologia esférica com núcleo bem definido e alta eficiência de encapsulação (~ 97,5 %). A presença de OVA, NaAlg e β C nas microcápsulas foram confirmadas pela análise de espectroscopia no infravermelho. A Simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* das microcápsulas constatou que 71,39 % do β C encapsulado foi liberado no intestino, com bioacessibilidade de 32,78 %. O perfil cinético de liberação se ajustou melhor ao modelo de primeira ordem ($R^2 = 0,98$), cujo mecanismo de liberação é por difusão, de modo que o β C encapsulado migra do meio mais concentrado para o menos concentrado por meio de poros formados no material de parede. Atividade antioxidante foi comprovada ao aplicar microcápsulas de β C na produção de biscoitos, resultando no dobro de proteção do bioativo em relação ao β C livre. Assim, os resultados apresentados sugerem que as microcápsulas de β C formadas com os material de parede OVA:NaAlg podem ser inseridas eficientemente na fortificação de biscoitos.

Palavras-chave: Bioacessibilidade; β -caroteno encapsulado; Simulação gastrointestinal; Atividade antioxidante.

ABSTRACT

FARIAS, Alan Marques. **Microencapsulation of β -carotene by complex coacervation using ovalbumin and sodium alginate as wall material.** 2022. 75p. Dissertation (MSc in Food Science and Technology). Institute of Technology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

β -carotene (β C) is a natural fat-soluble compound necessary for human health, being an important food source of provitamin A, but it has high chemical instability, which increases its oxidation in the presence of extrinsic factors. The present study aimed to microencapsulate β C in complex coacervated formed by the interaction between ovalbumin (OVA) and sodium alginate (NaAlg). The microencapsulation technique was used at pH 4.0 and 8:1 ratio (OVA:NaAlg, w/w) after confirming the affinity of these complexes with zeta potential, study of the phase diagram, turbidimetric and isothermal titration calorimetry analyses. The capsules formed from the OVA:NaAlg complex showed spherical morphology with a well-defined nucleus and high encapsulation efficiency (~97.5 %). The presence of OVA, NaAlg and β C in the microcapsules were confirmed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The in vitro gastrointestinal digestion simulation of microcapsules found that 71.39 % of the encapsulated β C was released in the intestine, with a bioaccessibility of 32.78 %. The kinetic release profile was better adjusted to the first order model ($R^2 = 0.98$), whose release mechanism is by diffusion, so that the encapsulated β C migrates from the more concentrated medium to the less concentrated one through pores formed in the wall material. Antioxidant activity was proven when applying β C microcapsules in the production of cookies, resulting in twice the protection of the bioactive in relation to free β C. Thus, the results presented suggest that β C microcapsules formed with the OVA:NaAlg wall material can be efficiently inserted in biscuit fortification.

Keywords: Bioaccessibility; encapsulated β -carotene; Gastrointestinal simulation; Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Configurações estruturais das microcápsulas ((a) simples, (b) agrupamento de cápsulas, (c) multi-núcleos, (d) multi-paredes, (e) irregular) e da microesfera ((f) matrix insolúvel).....	6
Figura 2. Processo de interação eletrostática entre o grupo amino positivo da ovalbumina (OVA) com o grupo carboxila negativo do alginato de sódio (NaAlg) para formação dos coacervados com adição do cloreto de cálcio (CaCl ₂) para promoção do <i>cross-linking</i>	8
Figura 3. Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade nos sistemas de emulsões..	10
Figura 4. Parâmetros que influenciam a formação dos coacervados complexos.	11
Figura 5. Interação eletrostática entre o grupo amino positivo da proteína com o grupo carboxila negativo do polissacarídeo.....	12
Figura 6. Esquema representativo do modelo <i>egg-box</i>	13
Figura 7. Característica estrutural geral da cadeia principal da ovalbumina.....	18
Figura 8. Composição da estrutura molecular do alginato, apresentando os ácidos β-D-manurônico (M) e α-L-gulurônico (G) unidos pela ligação 1→4..	20
Figura 9. Representação da estrutura molecular do β-caroteno.....	23
Figura 10. ζ -potencial e SEI da OVA, NaAlg e do complexo OVA/NaAlg.	34
Figura 11. Turbidez (100 - %T) em função das diferentes razões de OVA:NaAlg em pH 4,0.....	35
Figura 12. Turbidez (100 - %T) em função do pH dos sistemas contendo OVA e NaAlg individualmente e na razão 8:1.....	36
Figura 13. (A) Termograma de fluxo de calor (μcal/s) em função do tempo (s), obtido durante a titulação de 250 μl de 0,175 mM de OVA em 1200 μl de 1,29 x 10 ⁻³ mM de NaAlg em tampão de citrato a 10 mM, ambos em pH 4,0 a 25 °C e (B) Representação gráfica da integral das áreas em cada pico (kcal/mol) em função da razão molar da OVA/NaAlg em pH 4(p < 0,05).....	37
Figura 14. Diagrama de fase das misturas de OVA e NaAlg em diferentes razões em pH 4,0. Os símbolos representam (▪) solução translúcida, (□) solução turbida / leitosa, (○) solução	

nebulosa com precipitados, (●) solução límpida com precipitados e (◇) solução translúcida com precipitados, respectivamente.....	38
Figura 15. Esquema parcial do processamento de microcápsulas de β -caroteno obtidas por coacervação complexa utilizando os biopolímeros ovalbumina (OVA) e alginato de sódio (NaAlg) como material de parede..	39
Figura 16. Diagrama de fase das misturas de OVA e NaAlg com bioativo (β C dissolvido em óleo de coco) em diferentes razões em pH 4. Os símbolos representam (○) solução nebulosa com precipitados e (●) solução límpida com precipitados, respectivamente.....	43
Figura 17. Interação entre as diferentes misturas de OVA e NaAlg em pH 4 nas concentrações totais de biopolímeros de 0,5 %, 1,0 % e 1,5 % (m/m), com razões de misturas de 1:1 (S1, S4 e S7), 2:1 (S2, S5 e S8) e 4:1 (S3, S6 e S9) (WM:C), sendo a aparência observada, após armazenamento a 4 °C por 48 h, em pé.	43
Figura 18. Microscopia óptica de microcápsulas 48 h após a precipitação. A fotografia foi tirada com aumento de 10 x. As barras de escala são de 100 μ m.	44
Figura 19. Espectros FT-IR de Ovalbumina (OVA), alginato de sódio (NaAlg), óleo de coco (CN), núcleo (C), complexo (OVA – NaAlg), β -Caroteno (β C) e microcápsulas carregadas de β C (MP- β C).....	45
Figura 20. Liberação do β C encapsulado em microcápsulas com material de parede OVA/NaAlg durante a digestão <i>in vitro</i>	47
Figura 21. Perfil da cinética de liberação do β C em microcápsulas submetidas a uma simulação alimentar em óleo de soja.	49
Figura 22. Modelos de ajuste de liberação de β -caroteno de biscoitos em simulações <i>in vitro</i> de digestão intestinal. As barras de erro representam \pm desvio padrão, n = 2.....	50
Figura 23. Biscoitos (a) sem β C livre ou encapsulado, e incorporados com (b) β C puro e (c) com MP- β C.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos e técnicas utilizados na encapsulação de bioativos, probióticos e prebióticos.	7
Tabela 2. Trabalhos recentes sobre microencapsulação de bioativos por coacervação complexa usando diferentes pares poliméricos como materiais de parede.	14
Tabela 3. Trabalhos recentes sobre microencapsulação por coacervação simples e complexa usando ovalbumina com diferentes pares poliméricos como materiais de parede.	18
Tabela 4. Trabalhos recentes empregando a técnica por coacervação complexa usando alginato de sódio com diferentes pares poliméricos como materiais de parede para encapsular compostos bioativos.	21
Tabela 5. Trabalhos recentes sobre microencapsulação de β -caroteno com diferentes pares poliméricos como materiais de parede.	23
Tabela 6. Eficiência de encapsulamento (% EE) do β C em coacervados complexos formados por proteína ovalbumina (OVA) e polissacarídeo alginato de sódio (NaAlg).	42
Tabela 7. Formulações dos biscoitos contendo/não contendo microcápsulas de β C.	51

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

β C – β -caroteno

OVA – Ovalbumina

NaAlg – Alginato de sódio

CN - Óleo de coco

C – Núcleo

WM – Material de parede

FTIR – Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier

ITC – Calorimetria de Titulação Isotérmica

pH – potencial hidrogeniônico

pI – Ponto isoelétrico

kDa – Quilodalton

LDL – lipoproteína de baixa densidade

EE – Eficiência de encapsulação

τ – Turbidez

T – Transmitância

MP- β C – Microcápsulas com β -Caroteno

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

ABTS – 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfônico)

FRAP – Poder antioxidante de redução do ferro

ζ – Zeta

▪ – solução translúcida

□ – solução túrbida / leitosa

○ – solução nebulosa com precipitados

● – solução límpida com precipitados

◇ – solução translúcida com precipitados

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	4
Objetivo Geral	4
Objetivos Específicos	4
1 MICROENCAPSULAÇÃO.....	5
1.1 Microencapsulação em alimentos	6
1.2 Técnicas de microencapsulação.....	7
1.2.1 Processo de coacervação complexa	8
1.3 Material de parede	16
1.4 Proteínas e polissacarídeos	16
1.4.1 Ovalbumina.....	17
1.4.2 Alginato de sódio	19
1.5 Bioativos: lipídios bioativos	21
1.5.1 Carotenoides	21
1.5.2 β -caroteno	22
1.6 Simulação gastrointestinal	24
1.7 Liberação controlada dos bioativos microencapsulados.....	25
2 MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1 Materiais	26
2.2. Estudo do material de parede formado por OVA e NaAlg.....	26
2.3 Encapsulação do β C	28
2.3.2 Microestrutura óptica de microcápsulas de β C.....	28
2.3.3 Eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento	29
2.4 Caracterizações das microcápsulas contendo β C.....	29
2.4.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	29
2.4.2 Simulação gastrointestinal	30
2.4.3 Bioacessibilidade do β C encapsulado.....	30
2.4.4 Estabilidade do β C encapsulado.....	31

2.4.5 Biodisponibilidade efetiva do β C encapsulado.....	31
2.4.6 Cinética de Liberação do β C encapsulado	31
2.5. Enriquecimento dos biscoitos com microcápsulas contendo β C	32
2.5.1 Atividade Antioxidante (ABTS e FRAP)	32
2.6 Análises estatísticas	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1 Formação do complexo coacervados a partir de OVA/ NaAlg	33
3.1.1 Influencia do pH na formação do complexo coacervado	33
3.1.2 Titulação turbidimétrica da mistura dos biopolímeros (OVA e NaAlg)	34
3.1.3 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	36
3.1.4 Diagrama de fases dos complexos	38
3.2 Microencapsulação do β C.....	39
3.2.1 Eficiência de encapsulação	39
3.2.2 Diagrama de fases dos sistemas contendo microcápsulas do β C	40
3.2.3 Microscopia óptica das microcápsulas	43
3.2.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) ...	44
3.2.5 Simulação da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> das microcápsulas de β C... 47	
3.2.6 Liberação controlada.....	48
3.2.7 Bioacessibilidade, biodisponibilidade efetiva e estabilidade do β C	50
3.3 Enriquecimentos dos biscoitos com microcápsulas de β C	51
3.3.1 Biscoitos incorporados com microcápsulas de β C	51
3.3.2 Propriedades da atividade antioxidante de biscoitos incorporados com microcápsulas de β C	52
4. CONCLUSÃO.....	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

INTRODUÇÃO

As indústrias alimentícias produzem alimentos que fazem uso de biopolímeros naturais, como as proteínas e, ou, os polissacarídeos, ao ponto que ambos são responsáveis por inúmeras características e propriedades tecnológicas nos alimentos. As proteínas são utilizadas na formação de géis, estabilização de espumas e como emulsificantes, assim como os polissacarídeos são utilizados na formação de géis e como estabilizantes em emulsões alimentares, ambos atribuindo aos alimentos características voltadas para sua estabilidade estrutural e textura, melhorando e estendendo a vida de prateleira dos produtos (BASTOS; DE CARVALHO; GARCIA-ROJAS, 2018; LEITE et al., 2015; NIU et al., 2014).

As proteínas e os polissacarídeos estão entre os ingredientes alimentares presentes na dieta humana. Auxiliam na conformação dos invólucros das microcápsulas na coacervação complexa, conferidas pelas propriedades funcionais individuais de cada proteína e de cada polissacarídeo, estando ou não modificadas quimicamente, enzimaticamente ou fisicamente (NIU et al., 2014; SANTOS; CARVALHO; GARCIA-ROJAS, 2021a). Nesse processo, temos a proteína ovalbumina (peso molecular, 45 kDa), extraída da clara do ovo e que apresenta propriedades funcionais importantes para a indústria de alimentos, ao ser utilizada como emulsificante e estabilizante de espumas (SOARES et al., 2019; ZHANG et al., 2021b). O polissacarídeo alginato de sódio (peso molecular, 138 kDa), extraído de algas marinhas marrons, é capaz de formar matrizes altamente versáteis, além de ser relativamente barato, fácil de geleificar, biodegradável, inócuo e biocompatível com diversos sistemas alimentares (BASTOS et al., 2020a; SOARES et al., 2019; YEUNG et al., 2016; ZHANG; ZHANG; MCCLEMENTS, 2016).

Características importantes das proteínas e dos polissacarídeos consistem no surgimento de cargas eletrostáticas opostas quando submetidos a determinados valores de pH em relação ao ponto isoelétrico (pI) das proteínas e a constante de dissociação ácida (pKa) dos polissacarídeos, havendo a partir dessa variação alteração da densidade de carga superficial das moléculas, favorecendo as interações iônicas (NIU et al., 2014). Tal fenômeno beneficia as indústrias de alimentos, pois a partir dele se configura a formação de materiais de paredes usados na encapsulação de bioativos alimentares hidrofílicos e lipofílicos, por meio da técnica conhecida como encapsulação (CORREIA-FILHO et al., 2019).

A encapsulação consiste em um processo tecnológico em constante inovação, empregada na proteção de compostos bioativos de interesse, preservando características

como: sabor, coloração, propriedades biológicas, acidulação dos alimentos e até mesmo a conservação do valor nutricional do produto final. Tal técnica permite revesti-los em um processo de empacotamento, formando micropartículas ou nanopartículas, que irão impedir, por meio dos materiais de parede ou invólucros, que os fatores ambientais possam afetá-los até seu consumo efetivo, permitindo que essas micropartículas ou nanopartículas liberem os bioativos no local indicado e no momento ideal, de forma segura e controlada, por mecanismos que englobam o esforço mecânico, as variações da temperatura e do pH do meio em que estão imersas (AZEREDO, 2005; MENEZES et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2019; SILVA et al., 2015b).

Com a encapsulação produz-se produtos de melhor qualidade. Entretanto, devido ao alto custo operacional e sua complexidade no processo produtivo, o método é reservado a aplicações especiais de elevado valor agregado (GARTI, 2008), apresentando ainda outro fator limitante, que é o longo tempo de processo até o produto liofilizado (AZEREDO, 2005; GARTI; MCCLEMENTS, 2012; OZKAN et al., 2019).

Na técnica de coacervação, ao utilizar apenas um polímero para obter o coacervado, obtém-se, assim, a coacervação simples que envolve somente um tipo de biopolímero acrescido com um agente hidrofílico forte à solução coloidal (OZKAN et al., 2019). Em contrapartida, ao utilizar dois ou mais biopolímeros, a técnica passa a ser identificada como coacervação complexa, perpassando por fases intrínsecas presentes nesse método que garantem a eficácia da técnica, como a emulsificação, coacervação e, por fim, a reticulação química ou enzimática (JAIN et al., 2015, 2016; THAKUR et al., 2017).

Na microencapsulação, o material de parede é um dos fatores que requer cuidados especiais, principalmente na seleção dos materiais que irão compor essa parede ou membrana. O material escolhido deve proporcionar a membrana formada estabilidade, propriedade emulsificante, solubilidade, adequado peso molecular, difusividade, cristalinidade, ampla faixa entre os valores do pI e da pKa, além de garantir ao núcleo sua preservação durante todo o período de estocagem, sem que haja reação entre ambos (GAONKAR et al., 2014; JATO, 2001; NASCIMENTO et al., 2019; SOUZA et al., 2015). Os materiais utilizados para compor essa membrana que irá proteger e garantir que os materiais bioativos nos interiores dos encapsulados são variados, estando dentre eles as gomas, os polissacarídeos, materiais orgânicos, as celuloses, lipídeos e, as proteínas (CARMO; FERNANDES; BORGES, 2015; NASCIMENTO et al., 2019; SERVAT et al., 2010; SUAVE et al., 2006).

Com o passar dos anos a procura por fortificar produtos alimentícios com nutracêuticos que tenham potencial benéfico na promoção da saúde humana e o bem-estar no geral. Com isso, os derivados de alimentos naturais, como os bioativos, ganharam especial destaque, sendo enfatizado atributos como antioxidantes naturais ou compostos que demonstram capacidade de reduzir riscos de certas doenças crônicas, despertando o interesse e a procura por compostos bioativos, em especial os lipossolúveis, que demonstram capacidade de reduzir riscos de doenças cardiovasculares, oculares e certos cânceres oriundas de suas atividades biológicas (HU et al., 2021; ZHANG; ZHANG; MCCLEMENTS, 2016).

Como exemplo, temos o β -caroteno que é obtido a partir de certas frutas, vegetais coloridos e grãos coloridos, sendo um precursor da vitamina A. Entretanto, sua estrutura molecular estendida de hidrocarbonetos e seu alto grau de insaturação comprometem sua incorporação, reduzindo sua solubilidade aquosa, aumentando a instabilidade química e a atividade antioxidante, além de reduzir consideravelmente sua bioacessibilidade, ressaltando que os demais fatores externos, como baixo pH, umidade, luz, oxigênio e o ácido estomacal contribuem para a redução da sua bioacessibilidade, já que sua transformação química ocorre no trato gastrointestinal (XIE et al., 2021; ZHANG; ZHANG; MCCLEMENTS, 2016).

A indústria de alimentos parte de uma premissa voltada para a facilidade dos consumidores, desde a fabricação até a mesa do consumidor. Tais demandas são saciadas no contexto de atender as expectativas dos consumidores, ao empregar nos produtos ingredientes naturais que possam suprir as necessidades nutricionais dos consumidores (SRIVASTAVA; MISHRA, 2021). Para tanto a técnica da coacervação complexa será uma alternativa para a preservação das funcionalidades do β -caroteno a ser incorporado em um produto alimentício assado, como os biscoitos. Esses, por sua vez, apresentam boa capacidade de adequação a novos ingredientes, além de possuir uma preparação fácil, mas em escala industrial, longa vida de prateleira e boa aceitação pela população, independente da classe social (ALMEIDA et al., 2018).

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a formação de complexos entre OVA e NaAlg para encapsulamento de β C e fortificação de biscoitos. Inicialmente, os complexos foram estudados usando o potencial zeta, a análise de titulação isotérmica e o diagrama de fases. Posteriormente, o β C foi encapsulado e depois foi avaliada a cinética de liberação do β C encapsulado, a digestão gastrointestinal *in vitro*, a bioacessibilidade e a estabilidade efetiva frente às condições extremas provocadas pelo intestino. Por fim, foram adicionadas microcápsulas nos biscoitos e estudados a atividade antioxidante.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar o processo de coacervação complexa formada entre a proteína globular, ovalbumina, e o polissacarídeo, alginato de sódio, para encapsular β -caroteno.

Objetivos Específicos

- ✓ Estudar a formação e caracterizar a interação do complexo coacervado obtido a partir da ovalbumina e alginato de sódio;
- ✓ Microencapsular β -caroteno pelo processo de coacervação complexa empregando os materiais de parede em estudo e caracterizar as cápsulas obtidas;
- ✓ Estudar a simulação gastrointestinal do β -caroteno microencapsulado; bioacessibilidade, estabilidade e liberação controlada.
- ✓ Avaliar as propriedades antioxidantes dos biscoitos enriquecidos com microcápsulas contendo β -caroteno.

1 MICROENCAPSULAÇÃO

Estudos aliados a crescente busca e utilização de fármacos ou alimentos naturais ou nutracêuticos à base de compostos bioativos vem sendo despertados em todo o mundo, configurando, assim, em uma preocupação industrial, pois muitos desses compostos naturais apresentam fragilidades em relação aos fatores ambientais e, ou, biológicos, configurando em degradação dos seus constituintes, implicando em perdas irreversíveis no produto (SERVAT et al., 2010; SILVA et al., 2015b). Nesse sentido, surge o emprego dos microencapsulados, que segundo Gaonkar et al., (2014); Servat et al., (2010); Silva et al., (2015b); Suave et al., (2006), consistem no processo de recobrimento de substâncias nas fases líquida, sólida ou gasosa, por meio de um material de parede, que pode ser conhecido também como invólucro, casca, parede de revestimento, fase externa, fase de suporte, membrana ou matriz, utilizado para isolar a substância de interesse que compõe o núcleo dos microencapsulados, geralmente tal núcleo pode ser chamado também de ativo, carga útil, fase interna, encapsulado ou preenchimento, sendo tal técnica inovadora e favorável na prolongação da vida útil do produto.

Esse novo processo tecnológico, denominado microencapsulação, surgiu do modelo estrutural desempenhado pelas células, de modo que são envolvidas por uma membrana celular, e em seu interior possui um núcleo, citoplasma e organelas, sendo protegidos por essa membrana, que além de proteção desempenha outras atividades, como o controle de entrada e saída dos materiais de dentro da célula (SUAVE et al., 2006). De forma análoga, foram desenvolvidos produtos resultantes deste processo tecnológico, denominados de cápsulas, sendo que essas cápsulas são classificadas de acordo com seus tamanhos em nanopartículas (0,01 a 0,2 μm), micropartículas (1 a 100 μm) ou macropartículas ($> 100 \mu\text{m}$) (JATO, 2001; NASCIMENTO et al., 2019).

A microencapsulação como processo tecnológico garante a proteção das partículas de interesse, como compostos que preservam o sabor, a pigmentação, propriedades biológicas, acidulação dos alimentos e o valor nutricional do produto final, com microencapsulados que tenham em seu interior: nutrientes, enzimas ou conservantes, revestindo-os em um processo de empacotamento, formando micropartículas, que irão impedir danos provocados pelos fatores ambientais, protegendo-os até seu consumo efetivo, permitindo que essas micropartículas liberem os bioativos no local indicado e no momento ideal, de forma segura e controlada, por mecanismos que englobam o esforço mecânico, as variações da temperatura e

do pH do meio em que estão imersas (AZEREDO, 2005; MENEZES et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2019; SILVA et al., 2015b).

As microcápsulas podem ser caracterizadas como partículas sólidas que são subdivididas em diferentes categorias, de modo que cada uma está vinculada a sua estrutura morfológica. Sendo elas: microcápsula simples, matriz (microesfera: quando observa-se no material matriz a substância distribuída uniformemente em seu interior), microcápsula irregular, multi-núcleos, multi-paredes ou ainda agrupamento de cápsulas (NASCIMENTO et al., 2019), conforme exposto na Figura 1.

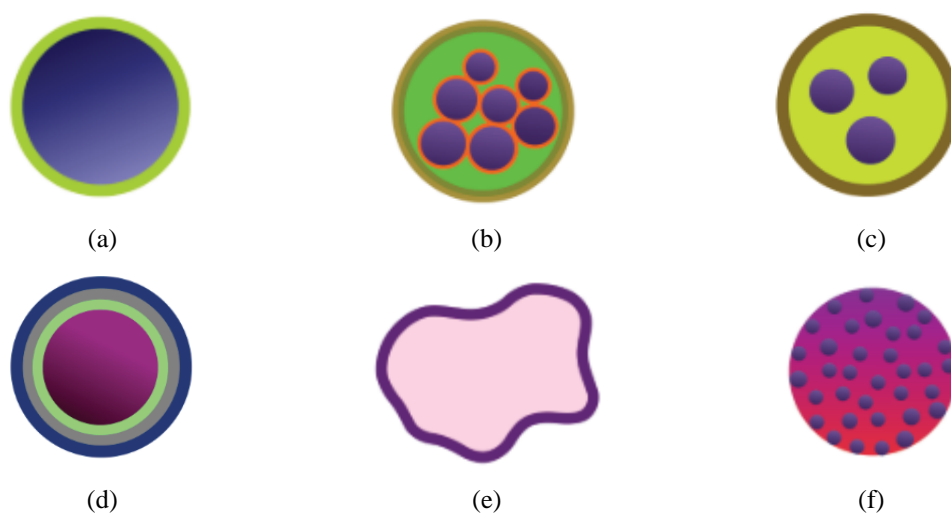


Figura 1. Configurações estruturais das microcápsulas ((a) simples, (b) agrupamento de cápsulas, (c) multi-núcleos, (d) multi-paredes, (e) irregular) e da microesfera ((f) matrix insolúvel). Adaptado de Gaonkar et al. (2014) e Nascimento et al. (2019).

1.1 Microencapsulação em alimentos

Como tendência na indústria de alimentos, a microencapsulação vem ganhando espaço, diante de questões globais, tais como desperdício de alimentos, envelhecimento da população, mudanças climáticas e acessos fáceis as informações, sendo fatores importantes nas atitudes e no poder de decisão do consumidor por alimentos saudáveis e sustentáveis (ARENAS-JAL; SUÑÉ-NEGRE; GARCÍA-MONTOYA, 2020). Para tanto, os consumidores passaram a desenvolver uma visão social e consciente, com uma atenção maior a saúde, contribuindo para o desenvolvimento potencial das indústrias alimentícias que passaram a investir cientificamente e comercialmente na produção alimentos funcionais (GAONKAR et al., 2014).

Polímeros são utilizados na microencapsulação, como materiais de parede, como será abordado nos próximos tópicos. Entretanto, há uma limitação que requer atenção, pois polímeros alimentícios permitidos são limitados, gerando um desafio na seleção e uso desses materiais no emprego da técnica, já que devem atender legalmente aos padrões alimentares no país de fabricação e exportação (ARENAS-JAL; SUÑÉ-NEGRE; GARCÍA-MONTOYA, 2020). Vale ressaltar que mesmo com tais limitações há espaço para inovações, mesmo que seja uma técnica de alto custo na produção em escala, difundida mundialmente e em diferentes setores industriais. Dessa forma, o setor alimentício busca constantemente técnicas novas, materiais e métodos de encapsulação inovadoras e de menor custo.

1.2 Técnicas de microencapsulação

A microencapsulação é obtida a partir de métodos e técnicas distintas, como apresentado na Tabela 1, sendo divididos em: físicos, químicos e físico-químicos.

Tabela 1. Métodos e técnicas utilizados na encapsulação de bioativos, probióticos e prebióticos.

MÉTODOS	TÉCNICAS
Físico	Extrusão estacionária (REBELLO, 2009; SOUZA et al., 2015); bocal submerso (SOUZA et al., 2015); extrusão centrífuga (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2017; SILVA et al., 2015b); bocal vibrante (RABELLO, 2009); <i>spray drying</i> (CARMO; FERNANDES; BORGES, 2015; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2017); disco rotativo (JATO, 2001); <i>spray chilling</i> (SILVA et al., 2015a, 2019); <i>spray cooling</i> (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2017; SILVA et al., 2014); leiteo fluidizado (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2017); cristalização e liofilização (SILVA et al., 2015b).
Químico	Polimerização interfacial e inclusão molecular (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2017; JATO, 2001; SUAVE et al., 2006); e, polimerização <i>in situ</i> (RABELLO, 2009).
Físico-químico	Coacervação (JATO, 2001; SILVA et al., 2015b), lipossomas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2017; SERVAT et al., 2010), lipoesferas (BARBOSA et al., 2002) e evaporação do solvente (JATO, 2001; SERVAT et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

A escolha do método e da técnica que serão empregadas na obtenção do encapsulado, dependem de fatores importantes, como a busca da aplicação tecnológica de interesse na preparação do encapsulado (OZKAN et al., 2019). O método e técnica escolhidos, de acordo com Servat et al. (2010), devem levar em consideração os quesitos que relacionam as propriedades dos materiais que constituirão o núcleo e o material de parede. Para ingredientes ativos avalia-se a composição atômica, peso molecular, conformação, flexibilidade,

polaridade e as cargas elétricas, além da eficiência na proteção e na liberação do material encapsulado, podendo ele ser probiótico ou prebiótico, disperso no núcleo ou na matriz polimérica das microcápsulas (GAONKAR et al., 2014; OZKAN et al., 2019).

1.2.1 Processo de coacervação complexa

O processo de encapsulamento por coacervação complexa consiste em 3 etapas: emulsificação, coacervação e reticulação (ZHANG et al., 2012), conforme demonstrado na Figura 2. Normalmente, ao final do processo, após obter um precipitado de microcápsulas é feita a secagem do material por pulverização ou liofilização resultando em um pó (GAONKAR et al., 2014; ZHANG et al., 2012).

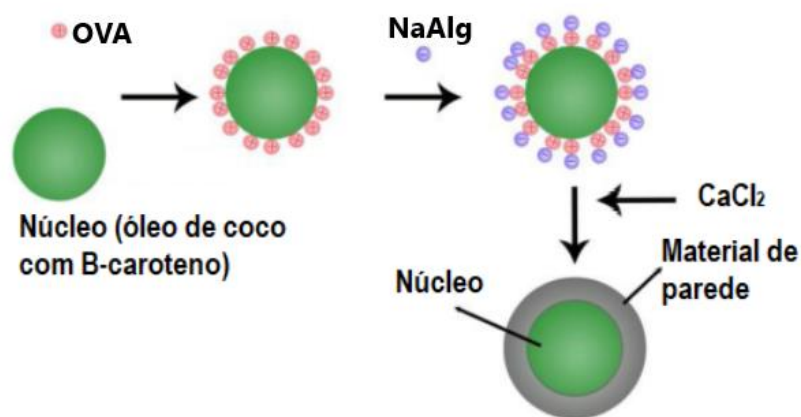


Figura 2. Processo de interação eletrostática entre o grupo amino positivo da ovalbumina (OVA) com o grupo carboxila negativo do alginato de sódio (NaAlg) para formação dos coacervados com adição do cloreto de cálcio (CaCl₂) para promoção do *cross-linking*. Adaptado de Tian et al. (2020).

1.2.1.1 Emulsificação no preparo de microcápsulas

Emulsão consiste de um sistema coloidal fluido heterogêneo, no qual gotículas de um líquido imiscível estão dispersas em outro, sendo esse outro líquido conhecido como fase contínua (ARAÚJO, 2006; IUPAC, 2014). Segundo Araújo (2006) e HU et al. (2017), tais sistemas coloidais apresentam classificações em relação a distribuição de suas fases oleosa e aquosa, de modo que, se a dispersão das gotas de óleo estiverem dispersas na fase contínua aquosa, haverá, assim, o fenômeno da emulsão conhecida como óleo em água (O/A), como ocorre, por exemplo, em maioneses, cremes, leites e sopas. Os mesmos autores, traz o contrário também, tendo gotas de água dispersas na fase contínua oleosa, sendo observado o

fenômeno da emulsão conhecida como água em óleo (A/O), como ocorre, por exemplo, em manteigas e margarinas.

Na emulsificação, a mistura da solução de proteínas, com pH acima do pI, com o óleo contendo o bioativo de interesse para que sejam submetidos a uma homogeneização perpassam por alguns dos seguintes parâmetros, como temperatura de inversão de fase, ponto de inversão de emulsão, emulsificação espontânea, homogeneização a alta pressão, microfluidização, atomização ou agitação mecânica (MCCLEMENTS, 2015). Com ênfase na agitação mecânica faz-se uso normalmente da alta velocidade derivada da utilização do ultra turrax e/ou do uso do ultrassom. Ambas metodologias fornecem energia suficiente para quebrar as moléculas de óleo e, assim, fazer com que fiquem dispersas na solução polimérica de interesse, para posteriormente adicionar a solução de polissacarídeos que irão interagir com as proteínas e fortificar as paredes proteicas que envolvem os invólucros de óleo com bioativo (núcleo) durante a complexação (GAONKAR et al., 2014; MCCLEMENTS, 2015).

Na complexação dos biopolímeros presentes na solução emulsionada, inicia-se o processo de correção do pH, para que estabilize entre o pI da proteína e a pKa do polissacarídeo, zona que irá garantir que as cargas elétricas superficiais das moléculas fiquem opostas, permitindo a interação eletrostática entre os biopolímeros que compõem a solução polimérica (SPONTON; PEREZ; SANTIAGO, 2017). Após, observa-se nitidamente no sistema a separação de fases, sendo uma fase mais translúcida, definida como sobrenadante e outra fase denominada de precipitado, onde estará concentrada com os biopolímeros e o núcleo (GAONKAR et al., 2014; MCCLEMENTS, 2015).

Segundo McClements (2015), para a obtenção de encapsulados de componentes lipofílicos como material ativo são empregados usualmente em emulsões convencionais, do tipo óleo em água, criadas com operações simples de processamento (mistura e homogeneização). Essas operações fazem parte do processo de produção das nanocápsulas, com diâmetros de 1 nm a 100 nm, ou microcápsulas, com diâmetros entre 100 nm e 1000 nm (GAONKAR et al., 2014). Essas emulsões convencionais ou simples de camada única são sistemas viáveis economicamente e desfavoráveis termodinamicamente em qualquer meio aquoso, por serem instáveis ao longo do tempo. Essa instabilidade contribui na quebra das emulsões por diferentes mecanismos, tais como separação gravitacional, floculação, coalescência, coalescência parcial, amadurecimento de Ostwald e separação de fases (GAONKAR et al., 2014), como demonstrados na Figura 3. No sentido de suprir essa instabilidade termodinâmica emprega-se a reticulação dos encapsulados, reforçando a

interação entre biopolímeros por meio de interações covalentes com o agente reticulante (MCCLEMENTS, 2015).

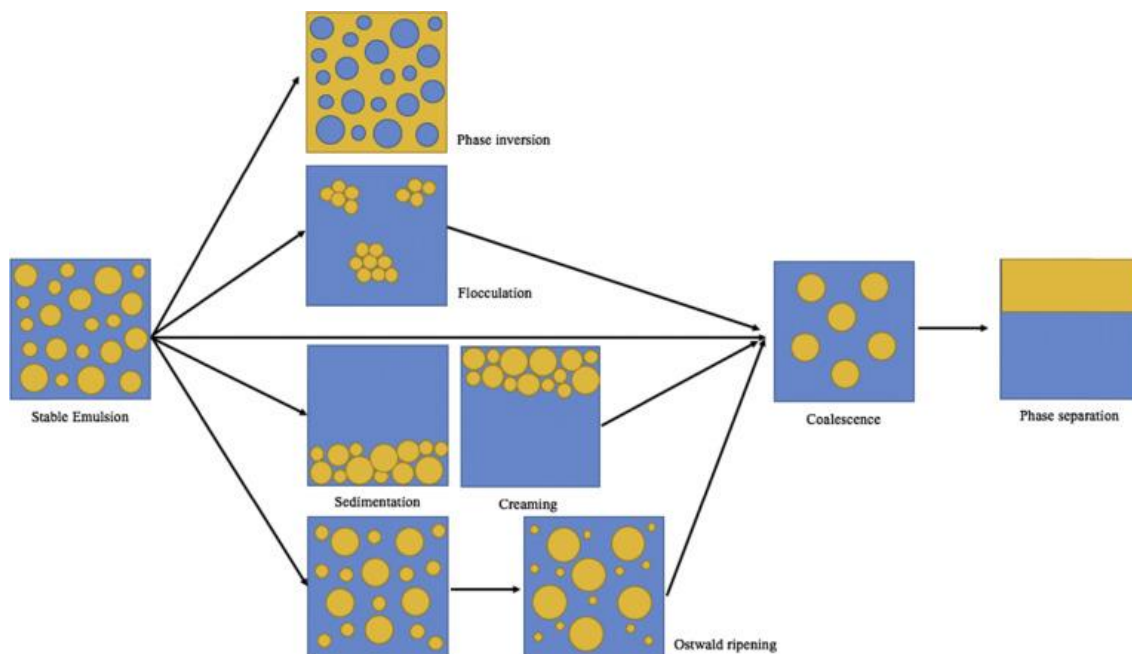


Figura 3. Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade nos sistemas de emulsões. Hu et al. (2017).

1.2.1.2 Coacervação Complexa

A coacervação se deriva do fenômeno coloidal que envolve a separação das fases líquido - líquido de uma solução de um polímero ou mistura de dois polímeros com cargas opostas em solução aquosa (IUPAC, 2014). Essa interação polimérica ou agregação macromolecular é desencadeada por meio de interações eletrostáticas de cargas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas das soluções poliméricas em emulsão, que se depositam, no formato de gotículas, no fundo do recipiente em que o sistema coloidal se encontra (OZKAN et al., 2019). Após o ajuste do pH do sistema coloidal haverá uma separação de fases, na qual resultará em duas fases líquidas (JATO, 2001; LIU et al., 2018). A fase mais densa, que se deposita no fundo do recipiente, rica em coloides é chamada de coacervado, enquanto que a fase menos densa e mais líquida, por ser pobre em coloides, se encontra sobre o coacervado, é denominada de sobrenadante (IUPAC, 2014).

Na coacervação complexa ocorre interações eletrostáticas entre duas, ou mais, soluções poliméricas, sendo empregado normalmente os polissacarídeos, com características aniônicas, em conjunto com as proteínas, de modo que ambos se apresentam com cargas

opostas, fazendo com que o sistema coloidal se divida espontaneamente em duas fases líquidas totalmente imiscíveis: o coacervado e o sobrenadante. Entretanto, sua sensibilidade a diversos parâmetros é alta sobre a natureza das proteínas, dos polissacarídeos e dos ingredientes bioativos, como peso molecular, densidade de carga e suas conformações (GAONKAR et al., 2014). Vale ressaltar e complementar nesse método outros parâmetros que influenciam a físico-química nas características do meio, a partir dos fatores demonstrados na Figura 4 como pH, força iônica, % dos sólidos totais, temperatura, bioativo de interesse, concentração e cisalhamento entre materiais, estando todos estes fatores intrinsicamente ligados as condições emulsionantes, ou seja, propriedades físico-químicas dos biopolímeros, como suas polaridades, pois partindo do princípio das cargas opostas dos biopolímeros que a coacervação acontece (GAONKAR et al., 2014; SERVAT et al., 2010; SUAVE et al., 2006).

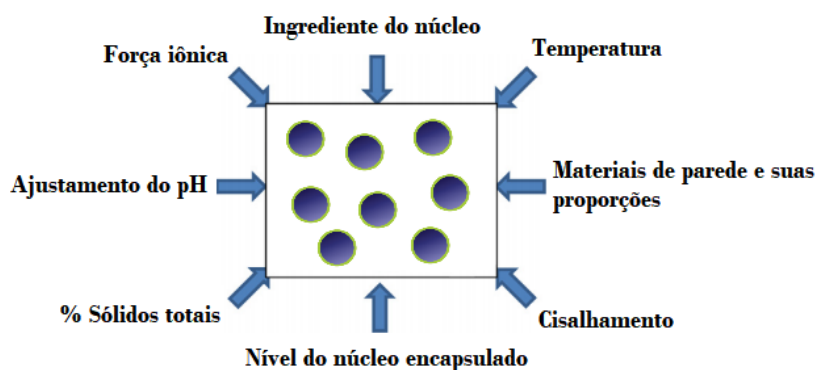


Figura 4. Parâmetros que influenciam a formação dos coacervados complexos. Adaptado de Gaonkar et al. (2014).

Ao reduzir o pH da emulsão, composta por material bioativo e por biopolímeros (proteínas e polissacarídeo), abaixo do ponto isoelétrico das proteínas e acima do pKa dos polissacarídeos, aumenta-se o número de cargas positivas na mesma estrutura das proteínas e mantém o número elevado de cargas negativas na estrutura dos polissacarídeos (SPONTON; PEREZ; SANTIAGO, 2017). Tal fenômeno ocorre devido a protonação do grupamento amino das proteínas, passando de $-NH_2$ para $-NH_3^+$. No caso dos polissacarídeos, com o pH acima da pKa, ocorrerá a desprotonação dos grupamentos compostos por ácido carboxílicos presentes em sua estrutura, passando de $-COOH$ para $-COO^-$ (GAONKAR et al., 2014). Logo, os grupos aniônicos dos polissacarídeos presentes na mesma solução irão se associar com os grupos catiônicos formados nas proteínas com a redução do pH ($pI > pH > pKa$),

ocorrendo, dessa forma, as atrações eletrostáticas dos biopolímeros (Figura 5), devido as cargas opostas resultantes do processo (GAONKAR et al., 2014; MCCLEMENTS, 2015).

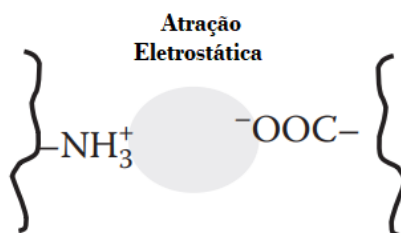


Figura 5. Interação eletrostática entre o grupo amino positivo da proteína com o grupo carboxila negativo do polissacarídeo. Adaptado de McClements (2015, p. 288).

Nos últimos 10 anos, vastas referências sobre trabalhos empregando a técnica de coacervação complexa, tendo os bioativos como compostos lipofílicos em sua maioria, são demonstrados na Tabela 2, na qual podemos observar alguns desses trabalhos, ressaltando os bioativos analisados que apresentam grande potencial nutracêutico, além de pares poliméricos empregados como materiais de parede, dos pH's em que ocorrem as coacervações em cada par polimérico, as principais análises de interesse realizadas e os agentes reticulantes empregados em cada trabalho.

1.2.1.3 Reticulação

Na fase da reticulação (*cross-linking*), o invólucro é submetido a um agente reticulante enzimático, como a transglutaminase (MATALANIS; MCCLEMENTS, 2013; MIHALCEA et al., 2017); agente reticulante natural como o genipin (JAIN et al., 2016; THAKUR et al., 2017); agentes reticulantes químicos, porém tóxicos, como o glutaraldeído (JAIN et al., 2015; SINGH; VENNAPUSA; CHATTOPADHYAY, 2020) e o formaldeído (TANG; SCHER; JEOH, 2020), e os não tóxicos, como o cloreto de cálcio (SOARES et al., 2019; ZHANG et al., 2021a), entre outros.

Os reticulantes no geral interagem com os grupamentos aminos e ácidos carboxílicos livres das proteínas, reforçando as ligações estruturais do invólucro, resultando no seu endurecimento ao redor do núcleo, por meio das interações covalentes, aumentando a estabilidade e a resistência mecânica das cápsulas geradas, como foi demonstrado na Figura 2. Pois, na coacervação complexa, sem a fase da reticulação, a mesma apresentará uma instabilidade termodinâmica, tendo como consequência uma baixa resistência estrutural e

mecânica, devido à natureza iônica proveniente das interações entre as camadas poliméricas (GAONKAR et al., 2014; MCCLEMENTS, 2015).

Com o emprego do cloreto de cálcio (CaCl_2) na reticulação, o mesmo irá liberar cátions de Ca^{2+} que irão interagir juntamente aos íons carboxilatos do ácido gulurônico presentes nas estruturas do alginato de sódio, por meio de interações eletrostáticas que formarão uma estrutura denominada modelo *egg-box* (BAGHERI et al., 2014; PAMIES et al., 2010), como demonstrado na Figura 6.

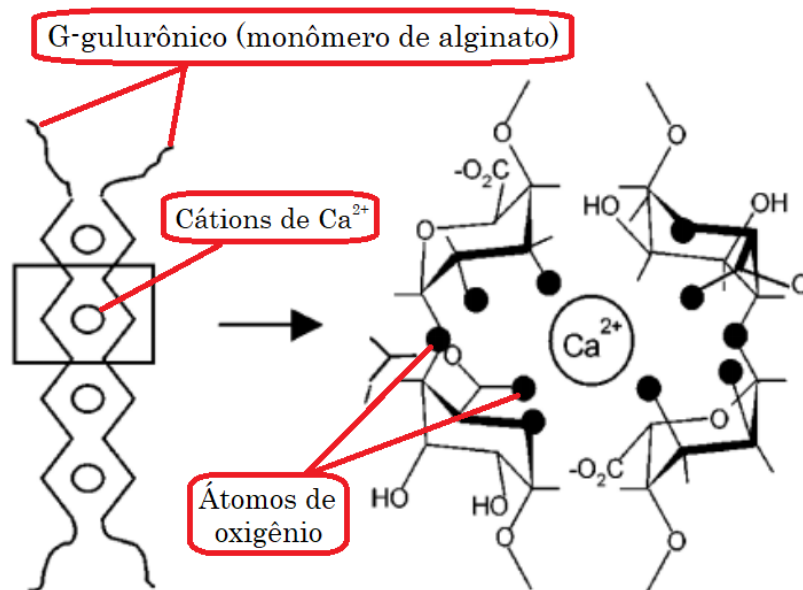


Figura 6. Esquema representativo do modelo *egg-box*. Adaptado de Phillips, Williams (2009) e Braccini, Pérez (2001).

Tabela 2. Trabalhos recentes sobre microencapsulação de bioativos por coacervação complexa usando diferentes pares poliméricos como materiais de parede.

Bioativo	Material de parede	pH	Análises Realizadas	Agente Reticulante	Referências
Óleo de milho	Caseinato de sódio e pectina	5,0	PZ; DTP; DE; DIC; MM	Transglutaminase	(MATALANIS; MCCLEMENTS, 2013)
β -caroteno	Isolado proteico de soja e goma acácia	4,2	RC; PZ; MM; EE; EITF; DE; DV	Glutaraldeído	(JAIN et al., 2015)
β -caroteno	Caseína e goma tragacanth	2,0	E; DTP; PZ; DAA; RC; EE; EITF; MEV; AM	Genipin	(JAIN et al., 2016)
β -caroteno	Caseína e goma guar	5,0	PZ; EITF; AM; EE; DV; DAA	Genipin	(THAKUR et al., 2017)
Óleo de peixe	Gelatina e goma arábica	4,0	MM; MEV; EE; GC-MS; MC; DTP	NI	(HABIBI et al., 2017)
β -caroteno em óleo de palma	Quitosana e goma xantana	5,6	DSC; EE; DV; AM; AMA	NI	(RUTZ et al., 2017)
β -caroteno	Isolado proteico de soja e goma acácia	3,75	HPLC; EITF; EE; DAA; AM; AA	Transglutaminase	(MIHALCEA et al., 2017)
β -caroteno	Caseinato de sódio e alginato	4,5	PZ; DV; DBE; DE	NI	(LIU et al., 2018)
Vitamina D	Mucilagem de sementes de agrião e gelatina	3,4	AT; MEV; EITF; DIV; EE; AM	NI	(JANNASARI et al., 2019)
Óleo de pimenta preta	Lactoferrina e Alginato de sódio	4,0	EE; EITF; MEV; DIV	Transglutaminase	(BASTOS et al., 2020b)
Óleo de pimenta preta	B-lactoglobulina e Alginato de sódio	4,5	EE; EITF; MEV; DI; DTP	Transglutaminase	(BASTOS et al., 2020a)
Ácido cáprico	Goma arábica e gelatina	4,5	CVD; AT; MEV; EITF; RDE; DR	Glutaraldeído	(SINGH; VENNAPUSA; CHATTOPADHYAY, 2020)
β -caroteno	Carboximetilcelulose e proteína isolada do soro de leite	3,5	EE; EITF; DE; MM; PZ	Transglutaminase	(BARBOSA; BASTOS; GARCIA-ROJAS, 2021)
Vitamina D3	Goma tara carboximetil e gelatina Tipo A	4,0	EITF; DIV; T; CVD	Transglutaminase	(SANTOS; CARVALHO; GARCIA-ROJAS, 2021a)
Vitamina D3	Proteína isolada do amaranto e lactoferrina	6,5	EE; EITF; CTI; MM; PZ	Transglutaminase	(CONSTANTINO; GARCIA-ROJAS, 2022a)
β -caroteno	Carboximetilcelulose e lactoferrina	5,0	CTI; EE; EITF; PZ; MM	Transglutaminase	(BARBOSA et al., 2022)
Betanina	Carboximetilcelulose de sódio e isolado de proteína do amaranto	3,0	PZ; AT; CTI; EE; EITF; AM; AA	NI	(CONSTANTINO; GARCIA-ROJAS, 2022b)

Tabela 2. Continuação

Legenda: AA (Atividade Antifúngica); AMA (Adição de Micropartículas de Alimentos); AM (Análise Morfológica); AT (Analisador Termogravimétrico); CTI (Calorimetria de Titulação Isotérmica); CVD (Calorímetro de Varredura Diferencial); DAA (Determinação de Atividade Antioxidante); DE (Determinação de Estabilidade); DBE (Degradação do β -caroteno em Estoque); DIV (Digestão *in vitro*); DR (Difração de Raio-X); DV (Dinâmica de Viscoelasticidade); DTP (Distribuição do Tamanho da Partícula); E (Espectrofotometria); EE (Eficiência de Encapsulação); EITF (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier); GC-MS (Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa); HPLC (Cromatografia líquida de alta performance); MC (Medicação da Cor); MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura); MM (Morfologia das Microcápsulas); NI (Não Informado); PZ (Potencial Zeta); RC (Rendimento de Coacervação); RDE (Raio-X Dispersivo de Energia); T (Análise Turbidimétrica).

1.3 Material de parede

Na microencapsulação, o material de parede é um dos fatores que requer cuidados especiais, principalmente na seleção dos materiais que irão compor essa parede, membrana ou invólucro. O material escolhido deve proporcionar ao invólucro estabilidade, propriedade emulsificante, solubilidade, adequado peso molecular, difusividade, cristalinidade, além de garantir ao núcleo sua preservação durante todo o período de estocagem, sem que haja reação entre ambos. Ressalta-se, ainda, que após esse período de estocagem, a membrana que reveste a microcápsula rompa e libere o material ativo presente em seu interior de forma programada, no local adequado ou momento ideal, sob condições favoráveis, estando embutido por trás de todo esse processo, seu baixo custo e sua disponibilidade comercial (JATO, 2001; NASCIMENTO et al., 2019; SOUZA et al., 2015). Segundo Nascimento et al. (2019), as características que englobam a morfologia do núcleo e do invólucro irão determinar qual será o mecanismo para a liberação do núcleo. Os principais mecanismos envolvidos nessa liberação são controlados e ativados por difusão, degradação, solvente, pH, temperatura e pressão mecânica

Os materiais utilizados para compor essa membrana que irá proteger e garantir que os materiais ativos nos interiores das microcápsulas são variados, estando dentre eles as gomas (arábica, ágar, alginato e carragena), os carboidratos (amidos, amidos modificados, dextrinas e sacaroses), materiais orgânicos (sulfato de cálcio e silicatos), as celuloses (acetilcelulose, carboximerilcelulose e nitrocelulose), lipídeos (monoacilgliceróis, diacilgliceróis, parafina, gorduras e óleos) e, as proteínas (glúten, caseína, gelatina, ovalbumina, lisozima e albumina) (CARMO; FERNANDES; BORGES, 2015; NASCIMENTO et al., 2019; SERVAT et al., 2010; SUAVE et al., 2006).

1.4 Proteínas e polissacarídeos

Utilizadas como materiais de parede, de acordo com Carmo, Fernandes e Borges (2015) e Santos, Costa e Garcia-Rojas (2018), as proteínas e os polissacarídeos estão entre os ingredientes alimentares presentes na dieta humana e que auxiliam na conformação dos invólucros das microcápsulas, a partir de interações eletrostáticas de cargas opostas, conferidas pelas propriedades funcionais individuais de cada proteína e de cada polissacarídeo, estando ou não modificadas quimicamente, enzimaticamente ou fisicamente. Levando em consideração, ainda, a facilidade na digestão das proteínas dentro do corpo

humano, atuando como antioxidantes, além de conferir valor nutricional. Estando envolvidas, em especial, nesse processo a proteína ovalbumina, extraída da clara do ovo e o polissacarídeo alginato de sódio, extraído de algas marinhas marrons.

1.4.1 Ovalbumina

Uma das fontes importantes na alimentação humana, rica em proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais é o ovo de galinha, apresentando 13 tipos diferentes de proteínas, que apresentam notórios valores nutricionais que enriquecem sua composição, além de apresentarem uma gama de atributos que conferem proteção ao embrião, quando em desenvolvimento, garantindo sua defesa contra infecções bacterianas e virais (DIARRASSOUBA et al., 2015; BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

De acordo com Belitz; Grosch; Schieberle (2009) e Souza; Garcia-Rojas (2015), das proteínas que compõem os ovos temos, em especial, a ovalbumina, que compreende na composição centesimal da clara do ovo o quantitativo de 54 a 65 % e temperatura de desnaturação em torno de 84,5 °C. Apresentando, também, solubilidade em água, ponto isoelétrico em torno de 4,5 e peso molecular em torno de 45 kDa (MCCLEMENTS, 2015; SANTOS; COSTA; GARCIA-ROJAS, 2018).

A ovalbumina apresenta propriedades funcionais importantes para a indústria de alimentos, sendo utilizada, em geral, para emulsificar e estabilizar espumas, além de atuar nos produtos com propriedades antioxidantes, anticarcinogênica e antimutagênica, fornecendo tais atuações ao organismo humano e, ainda, fortificando-o com imunomoduladores (SANTOS; COSTA; GARCIA-ROJAS, 2018; SOUZA; GARCIA-ROJAS, 2015). Esta proteína globular contém em sua cadeia estrutural (Figura 7) 385 resíduos de aminoácidos, alguns com grupos sulfetos (-SH), que só reagem quimicamente com a proteína desnaturada, e grupos de ácido fosfórico, que só reagiram enzimaticamente pela ação de fosfatases (FEDDAOUI et al., 2019; YAMASAKI; TAKAHASHI; HIROSE, 2003).

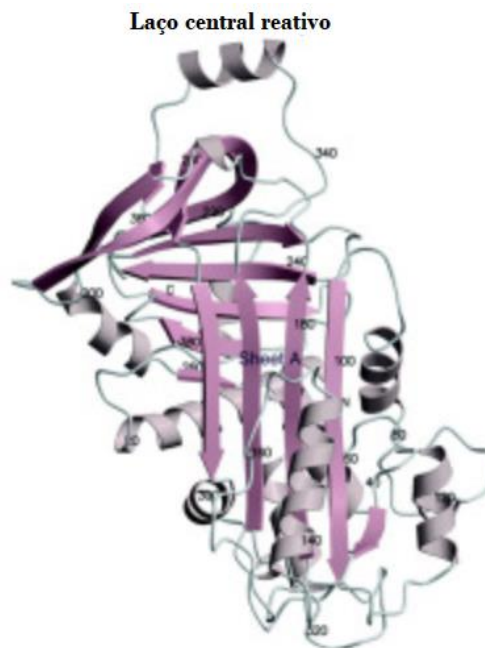


Figura 7. Característica estrutural geral da cadeia principal da ovalbumina. Adaptado de Yamasaki; Takahashi; Hirose (2003).

Recentes trabalhos empregando ovalbumina como material de parede em processos de coacervação complexa, são demonstrados na Tabela 3, além de complexos promissores na preservação de compostos lipofílicos. Pode-se observar que os ingredientes ativos analisados e envolvidos por esse biopolímero não interagem, principalmente durante a emulsificação, contribuindo para a preservação funcional do bioativo, sendo tal preservação das funcionalidades constatadas pelas análises realizadas.

Tabela 3. Trabalhos recentes sobre microencapsulação por coacervação simples e complexa usando ovalbumina com diferentes pares poliméricos como materiais de parede.

Bioativo	Material de parede	PH	Análises Realizadas	Agente Reticulante	Referências
--	Ovalbumina e pectina	3,55	T; PZ; DR	NI	(SOUZA; GARCIA-ROJAS, 2015)
--	Ovalbumina e quitosana	5,5	T; PZ; MVLC; CTI	NI	(XIONG et al., 2016)
--	Ovalbumina e carboximetilcelulose	3,5	T; DME; MVLC; CTI; MR	NI	(XIONG et al., 2017)
Óleo de sacha inchi	Ovalbumina	NI	EITR; DR; AT; MEV; EE; DIV	NI	(VICENTE et al., 2017)
Óleo de sacha inchi	Ovalbumina e pectina	NI	EITR; DR; AT; MEV; EE; DIV	NI	
Óleo de sacha inchi	Ovalbumina e goma xantana	NI	EITR; DR; AT; MEV; EE; DIV	NI	

Tabela 3. Continuação

--	Ovalbumina e lisozima	7,5	PZ; EITR; T; CTI; MEV	NI	(SANTOS; COSTA; GARCIA-ROJAS, 2018)
--	Ovalbumina e 4-estireno sulfonato de sódio	4,0	T; MCE; MR; MDDL	NI	(FEDDAOUI et al., 2019)
--	Alginato e quitosana	3,25	TP; PZ; CTI; T; EITF	NI	(RABELO et al., 2019)
--	Parafina, gelatina e alginato de sódio	4,5	EITF; DR; MEV; EDE; AT; CVD	Cloreto de cálcio e glutaraldeído	(TIAN et al., 2020)
Carvacrol	Ovalbumina	5	APT; T; EE; CVD; PAN	Carvacrol	(RAO et al., 2020)
--	Ovalbumina e pectina	2,5	T; RC; PZ; MFA; EITR; EDC; AT; MQAD	NI	(ZHANG et al., 2021b)
--	Ovalbumina e pectina	4,2	T; ME; CTI; DAG	NI	(PILLAI; GULDIKEN; NICKERSON, 2021)
--	Pea albumina e pectina	3,6	T; ME; CTI; DAG	NI	(PILLAI; GULDIKEN; NICKERSON, 2021)

Legenda: AT (Analisador Termogravimétrico); APT (Análise do Perfil de Textura); CDD (Calorimetria de Digitalização Diferencial); CVD (Calorímetro de Varredura Diferencial); CTI (Calorimetria de Titulação Isotérmica); DAG (Determinação dos Ácidos Galacturônicos); DIV (Digestão *in vitro*); DME (Determinação de Mobilidade Eletroforética); DR (Difração de Raio-X); EDE (Espectrômetro Dispersivo de Energia); EE (Eficiência de Encapsulação); EITR (Espectroscopia Infravermelha de Transformação de Fourier); MCE (Medições de Condutividade Elétrica); MDDL (Medições Dinâmicas de Dispersão da Luz); ME (Mobilidade Eletroforética); MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura); PAN (Propriedades Antimicrobianas Nanopartículas); MFA (Microscopia de Força Atômica); MQAD (Microequilíbrio de Quartzo com Análise de Dissipação); MR (Medidas Reológicas); MVLC (Microscópio de Varredura a laser confocal); PZ (Potencial Zeta); RC (Rendimento de Coacervação); T (Análise Turbidimétrica).

1.4.2 Alginato de sódio

Dentre os biopolímeros mais utilizados como material encapsulador, o alginato de sódio tem se destacado por sua capacidade de formar uma matriz altamente versátil, relativamente barato, fácil de gelificar, biodegradável e biocompatível com diversos sistemas alimentares, além de ser inócuo, em relação a toxicidade, para a proteção de componentes ativos, células e principalmente microrganismos probióticos sensíveis as variações de calor, pH, oxigênio e outros fatores, intrínsecos e extrínsecos, em que as matrizes alimentares são expostas durante seu processamento e armazenamento, além de ser insolúvel em etanol (BAGHERI et al., 2014; ETCHEPARE et al., 2015; TANG; SCHER; JEOH, 2020; YEUNG et al., 2016).

Segundo Etchepare et al. (2015) e Tang; Scher; Jeoh (2020), o alginato de sódio apresenta, como material encapsulador, boa capacidade hidrofílica e hidrosfópica, garantindo facilidades em seu manuseio. Apresenta também outras características, como gelagem, estabilização e espessamento, razões pelas quais têm sido de grande interesse para as indústrias alimentícias, sendo um polissacarídeo de cadeia linear com densidade de carga que contribui para sua promoção como material encapsulante de bioativos e bactérias ácidas lácticas, devido a esses atributos relatados.

O alginato apresenta peso molecular de 138 kDa e, em particular, possui constante de dissociação do ácido (pKa) entre os valores de 3,38 a 3,65, devido aos seus constituintes (Figura 8), que são o ácido manurônico e o ácido galurônico, respectivamente. Ressalta-se, ainda, que caso o pH da solução de alginato seja inferior ao pKa, haverá precipitação e formação do ácido algínico, sendo esse insolúvel em água. Entretanto, quando o pH se encontra acima de valor de pKa, ocorrerá a negatização da carga do alginato, de modo que a estabilidade química do alginato se encontra entre os valores de pH de 5 a 10 (BASTOS et al., 2020a; MCCLEMENTS, 2015; ZHANG; ZHANG; MCCLEMENTS, 2016).

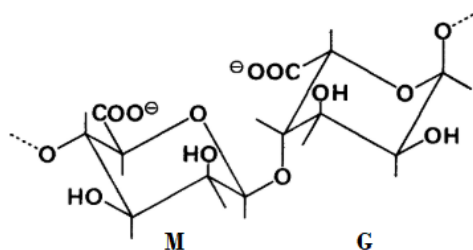


Figura 8. Composição da estrutura molecular do alginato, apresentando os ácidos β -D-manurônico (M) e α -L-galurônico (G) unidos pela ligação 1 \rightarrow 4. Adaptado de Belitz; Grosch; Schieberle (2009, p. 303).

Este biopolímero, que é extraído de algas marinhas marrons (*Phaeophyceae*) e algumas bactérias específicas, pode ser apresentado como um aditivo alimentar na forma de um pó marrom amarelado ou branco, inodoro e insípido (BASTOS; DE CARVALHO; GARCIA-ROJAS, 2018; ETCHEPARE et al., 2015; PAMIES et al., 2010). Ressalta-se, ainda, que sua digestão não ocorre no trato gastrointestinal superior (boca, estômago e intestino delgado), mas sim no trato gastrointestinal inferior (cólon) por enzimas secretadas pelas bactérias coloniais presentes no cólon. Dessa forma, observa-se que essas características de digestão do alginato de sódio indicam que ele pode ser usado para desenvolver microgéis que encapsulam e retêm probióticos ou até mesmo bioativos no trato gastrointestinal superior, mas depois os liberam no trato gastrointestinal inferior (ZHANG et al., 2021d).

Recentes trabalhos empregando alginato de sódio como material de parede na coacervação complexa são apresentados na Tabela 4. Nesta tabela pode-se observar que o alginato de sódio se apresenta como material de parede promissor na preservação de compostos lipofílicos. Os ingredientes ativos analisados e envolvidos por esse biopolímero não interagem com o material de parede, contribuindo para a preservação funcional do bioativo, como foi constatado nas análises realizadas.

Tabela 4. Trabalhos recentes empregando a técnica por coacervação complexa usando alginato de sódio com diferentes pares poliméricos como materiais de parede para encapsular compostos bioativos.

Bioativo	Material de parede	PH	Análises Realizadas	Agente Reticulante	Referências
β-caroteno	Caseinato de sódio e alginato	4,5	PZ; DV; DBE; DE	NI	(LIU et al., 2018)
Óleo de sacha inchi	Ovalbumina e alginato de sódio	3,8	T; PZ; CDD; EE; EITF; MEV; DIV	Cloreto de cálcio	(SOARES et al., 2019)
Óleo de pimenta preta	Lactoferrina e Alginato de sódio	4,0	EE; EITF; MEV; DIV	Transglutaminase	(BASTOS et al., 2020b)
Óleo de pimenta preta	B-lactoglobulina e Alginato de sódio	4,5	EE; EITF; MEV; DI; DTP	Transglutaminase	(BASTOS et al., 2020a)
D-limoneno	Alginato e gelatina	8,5	DECC; DTP; MEV; MRV	NI	(TANG; SCHER; JEOH, 2020)
<i>Lactobacillus casei</i> LC2W	Alginato de sódio, proteína de soro de leite e nano cristais de celulose	NI	CLC2W; AM; MEV; EE	Cloreto de cálcio	(ZHANG et al., 2021a)

Legenda: AM (Análise Morfológica); AT (Analisador Termogravimétrico); CTI (Calorimetria de Titulação Isotérmica); CLC2W (Cultivo de LC2W); DE (Determinação de Estabilidade); DBE (Degradação do β-caroteno em Estoque); DECC (Determinação da Extensão da Coacervação Complexa); DIV (Digestão *in vitro*); DR (Difração de Raio-X); DV (Dinâmica de Viscoelasticidade); DTP (Distribuição do Tamanho da Partícula); EE (Eficiência de Encapsulação); EITF (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier); EQ (Estabilidade Química); MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura); NI (Não Informado); PZ (Potencial Zeta); T (Análise Turbidimétrica); TP (Titulação Potencialmétrica).

1.5 Bioativos: lipídios bioativos

1.5.1 Carotenoides

Consiste de hidrocarbonetos com mais de três duplas ligações altamente conjugados e insolúveis em água e solúveis em óleos e gorduras, com eficiência antioxidante acima de 9 insaturações conjugadas na estrutura molecular (ARAÚJO, 2006; BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009), sendo responsáveis nas frutas, legumes e grãos integrais pelas

colorações amarelo, vermelho e laranja (JAIN et al., 2016; THAKUR et al., 2017), sendo adquiridos, evidentemente, na dieta, ou seja, pelo consumo regular dessas frutas, legumes e grãos integrais, recompondo e regulando constantemente o mecanismo de defesa endógena do organismo contra as reações de oxidação-redução promovidas pelos radicais livres que aumentam na corrente sanguínea com o passar dos anos, impedindo, diretamente, que os componentes celulares sofram danos a curto prazo com a ação danosa desses radicais livres (ARAÚJO, 2006).

Os carotenoides apresentam aproximadamente 600 tipos de pigmentos e, esses, por sua vez, possuem moléculas polienes conjugadas, longas e flexíveis, nos quais a luteína, a zeaxantina, o licopeno e o β -caroteno se destacam dos demais (ARAÚJO, 2006). Dentre todos, o β -caroteno é quem possui considerável potencial de ação antioxidante natural, protegendo da oxidação os depósitos de gorduras e de lipídeos presentes na composição das membranas celulares de animais e vegetais, além de ter atividade provitamina A na saúde humana, reduzindo o risco do desenvolvimento de doenças causadas pela sua ausência (JAIN et al., 2015, 2016; MCCLEMENTS, 2015).

1.5.2 β -caroteno

O β -caroteno (Figura 9) é um dos principais carotenoides que contribui na promoção da saúde e bem-estar humano devido a sua alta atividade biológica antioxidante elucidada no item anterior (LIU et al., 2018). Porém suas propriedades e características moleculares restringem sua aplicação em muitos alimentos e bebidas, devido sua baixa solubilidade aquosa e alta instabilidade química, que afetam sua bioacessibilidade (ZHANG et al., 2021c; ZHANG; ZHANG; MCCLEMENTS, 2016). O poliene em sua molécula apresenta sensibilidade com relação aos fatores externos, como exposição ao ar, luz, temperatura e acidez, acarretando, como promoção, alterações estruturais em suas moléculas, como ciclização, migração da dupla ligação e acréscimos de moléculas de oxigênio singlete e radicais livres (JAIN et al., 2015; THAKUR et al., 2017). Mas, em contrapartida, essas alterações no organismo neutralizam ou eliminam os radicais livres gerados pelo oxigênio singlete, que é altamente reativo, impedindo que ocorra a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e, com isso, mantendo o transporte saudável do colesterol sintetizado no fígado para todos os tecidos do corpo, reduzindo consideravelmente as possibilidades dos riscos de desenvolvimento de doenças crônicas e graves como a arteriosclerose, os

carcinomas, as cardiovasculares e oculares, dentre outras, relacionadas à idade (ARAÚJO, 2006; ZHANG; ZHANG; MCCLEMENTS, 2016).

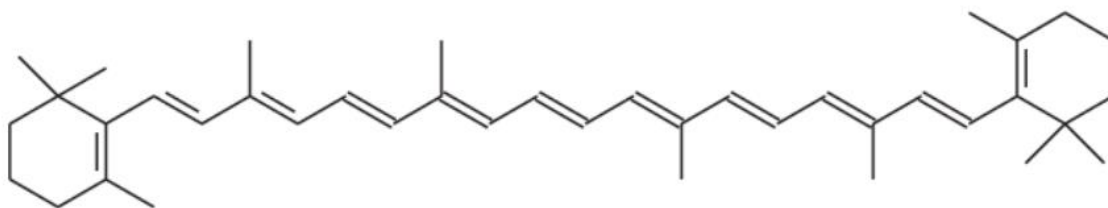


Figura 9. Representação da estrutura molecular do β -caroteno. Belitz; Grosch; Schieberle, (2009, p. 237).

Atualmente, vários estudos empregando β -caroteno com diferentes materiais de parede são realizados (Tabela 5). Entretanto, suas características moleculares lhe conferem desvantagens diante dos meios ambientais e no emprego em alimentos. Mas seu potencial nutracêuticos vem despertando e contribuindo na busca por alternativas metodológicas e técnicas que possam manter ou maximizar seu potencial no corpo humano.

Tabela 5. Trabalhos recentes sobre microencapsulação de β -caroteno com diferentes pares poliméricos como materiais de parede.

Material de parede	PH	Técnica	Análises Realizadas	Agente Reticulante	Referências
Isolado proteico de soja e goma acácia	4,2	Coacervação complexa	RC; PZ; MM; EE; EITF; DE; DV	Gluteraldeido	(JAIN et al., 2015)
Caseína e goma tragacanth	2,0	Coacervação complexa	E; DTP; PZ; DAA; RC; EE; EITF; MEV; AM	Genipin	(JAIN et al., 2016)
Isolado proteico de soja e goma acácia	3,75	Coacervação complexa	HPLC; EITF; EE; DAA; AM; AA	Transglutaminase	(MIHALCEA et al., 2017)
Quitosana e goma xantana	5,6	Coacervação complexa	DSC; EE; DV; AM; AMA	NI	(RUTZ et al., 2017)
Caseinato de sódio e alginato	4,5	Coacervação complexa	PZ; DV; DBE; DE	NI	(LIU et al., 2018)
Caseinato de sódio, goma arábica e maltodextrina	7,0	Emulsão e liofilização	CR; EE; HPLC; PT	NI	(NO; SHIN; MUN, 2020)
Carboximetilcelulose e proteína isolada do soro de leite	3,5	Coacervação complexa	CL; B; EE; EITF; DE; DF; MM; PZ	Transglutaminase	(BARBOSA; BASTOS; GARCIA-ROJAS, 2021)
Carboximetilcelulose e lactoferrina	5,0	Coacervação complexa	B; CL; CTI; EE; EITF; PZ; MM	Transglutaminase	(BARBOSA et al., 2022)

Legenda: AA (Atividade Antifúngica); AMA (Adição de Micropartículas de Alimentos); AM (Análise Morfológica); B (Bioacessibilidade); CL (Cinética de Liberação); CR (Comportamento de Redispersão); CTI (Calorimetria de Titulação Isotérmica); DAA (Determinação de Atividade Antioxidante); DBE (Degradação do β -caroteno em Estoque); DE (Determinação de Estabilidade); DF (Degradação Fotolítica); DV (Dinâmica de

Tabela 5. Continuação

Viscoelasticidade); DTP (Distribuição do Tamanho da Partícula); E (Espectrofotometria); EE (Eficiência de Encapsulação); EITF (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier); HPLC (Cromatografia líquida de alta performance); MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura); MM (Morfologia das Microcápsulas); NI (Não Informado); PT (Propriedades Texturais); PZ (Potencial Zeta); RC (Rendimento de Coacervação).

1.6 Simulação gastrointestinal

Com a crescente conscientização humana relacionada a qualidade nutricional, houve aumento na comercialização de alimentos enriquecidos com vitaminas e minerais, contribuindo no interesse industrial por pesquisas no desenvolvimento de produtos fortificados com nutracêuticos (TAN et al., 2020). Nesse âmbito, a simulação gastrointestinal vem desempenhando um importante papel, devido aos dados obtidos no processo físico-químico e fisiológico dos compostos bioativos analisados na digestão *in vitro*, contribuindo para a projeção de sistemas que melhore a biodisponibilidade desses compostos (SALVIA-TRUJILLO et al., 2013). Determinando o local exato de liberação do composto bioativo, e se o local contribuirá para sua degradação ou absorção no corpo humano, ou seja, podendo aumentar ou reduzir sua solubilidade e permeabilidade, afetando conseqüentemente na sua absorção (MCCLEMENTS, 2015).

A simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* de microcápsulas e produtos fortificados com microcápsulas é realizada em etapas (MINEKUS et al., 2014). A primeira etapa consiste da fase oral, a segunda etapa a fase gástrica, a terceira etapa a fase intestinal e, por fim, a quarta e última a fase do cólon (MCCLEMENTS, 2015; ZHANG et al., 2016). A simulação gastrointestinal tem por intuito submeter os encapsulados as mesmas condições que enfrentariam ao serem ingeridos na alimentação, recriando as mesmas condições fisiológicas humanas *in vivo*, fazendo uso de enzimas digestivas nas concentrações ideais, além dos controles de pH, concentrações de sais, tempo e temperatura que ocorrem durante a digestão e, além dos demais fatores que influenciam a digestão dos alimentos (BRODKORB et al., 2019; MINEKUS et al., 2014).

O emprego simulado da digestão gastrointestinal *in vitro* em pesquisas científicas é amplamente difundido nas áreas das ciências alimentares e nutricionais, sendo realizados, especialmente, em estudos que envolvem a tecnologia da microencapsulação de compostos

bioativos, probióticos e prebióticos (BRODKORB et al., 2019), utilizados como núcleos, tais como β -caroteno (BASTOS et al., 2020a; JAIN et al., 2015, 2016; THAKUR et al., 2017; ZHANG; ZHANG; MCCLEMENTS, 2016); vitamina D3 (JANNASARI et al., 2019; SANTOS; CARVALHO; GARCIA-ROJAS, 2021a); *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2000; SILVA et al., 2015a); mistura de extrato de café, maltodextrina e inulina (ZAPATA; ARANGO; RODRÍGUEZ-BARONA, 2019); e, antocianinas (ZHANG et al., 2020).

1.7 Liberação controlada dos bioativos microencapsulados

A liberação controlada de bioativos é um dos fatores mais importantes para os sistemas de entregas coloidais, sendo determinada e conhecida como perfil de liberação de bioativos encapsulados. O perfil de liberação parte de modelos cinéticos ou modelos teóricos empíricos e matemáticos que descrevem e preveem os perfis de liberação dos ingredientes bioativos a partir de partículas coloidais, como vitaminas, minerais e nutracêuticos (MCCLEMENTS, 2015). No estudo comportamental da liberação controlada de ingredientes ativos *in vitro*, os modelos cinéticos direcionam o perfil de liberação que o composto apresentará no corpo humano, de acordo com o meio e o simulador alimentar empregado (DIMA et al., 2020). Nesse contexto, os mecanismos mais conhecidos relacionados a liberação controlada de ingredientes ativos são por difusão (Fickiana e não Fickiana), erosão e inchaço (MEHRAN; MASOUM; MEMARZADEH, 2020; SIEPMANN; PEPPAS, 2012).

O aumento da bioacessibilidade dos compostos bioativos no organismo podem ser determinados a partir do estudo de liberação controlada. Sendo determinados por meio da fração do bioativo alimentar, que compõe o núcleo das microcápsulas e que poderão estar disponíveis para as funções fisiológicas normais imediatas do corpo humano e, ou, o seu armazenamento (LIU et al., 2012). Nesse sentido, para o estudo da bioacessibilidade, o processo envolve modelos estatísticos e dinâmicos, que irão dimensionar a solubilização e a interação dos compostos bioativos durante a liberação no sistema gastrointestinal (DIMA et al., 2020). Como exemplo de compostos bioativos, temos os carotenoides, que são lipofílicos e estão presentes nas matrizes alimentares. Com a liberação destes, no formato de partículas dispersas em emulsões lipídicas, juntamente com solubilização em micelas de sal biliar devido movimentação mecânica (movimentos peristálticos) do organismo, haverá captação de carotenoides por meio das células que compõem a mucosa intestinal e seu transporte através

das lipoproteínas linfáticas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010). Ou seja, ocorrendo a sua absorção pelo organismo.

2 Materiais e métodos

2.1 Materiais

O óleo de coco foi adquirido no mercado local (Volta Redonda, Brasil). A OVA (ref. A5253) (pureza de 66 – 88 %), NaAlg (ref. 180947), α -amilase (ref. A3403), pepsina suína (ref. P6887), pancreatina suína (ref. P7545), extrato de bile suína (ref. B3883) e o pó sintético de β C (ref. C9750) com pureza $\geq 93\%$ (UV), sal de diamônio de 2,2 azino bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) (ref. A1888) e ácido 8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (ref. A238813) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich[®] Company (St. Louis, USA). A azida de sódio (ref. 494) foi adquirida da VETEC[®] Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Os reagentes utilizados foram de grau PA e adquiridos da VETEC[®] Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). A água ultrapura com condutividade de 0,05 μ S/cm foi utilizada para realização dos experimentos e preparação das soluções (Master System R&D, Gehaka, Brasil).

2.2. Estudo do material de parede formado por OVA e NaAlg

2.2.1 Preparação das soluções

Soluções aquosas de OVA e NaAlg foram preparadas em concentrações de 0,1% (m/m). Os biopolímeros foram pesados em balança analítica (B-TEC-210, Tecnal, Brasil) e agitadas usando um agitador magnético (NT 101, Novatecnica, Brasil) a 25 °C por 1 h e 24 h, respectivamente.

2.2.2 Determinação do Potencial Zeta

Os ζ -potenciais dos biopolímeros (OVA e NaAlg) foram determinados por um Zetasizer (Malvern instruments, Nano ZS90, Reino Unido). O pH das soluções foi ajustado, a partir do resultado obtido ao colocar as amostras com 0,1 % (m/m) em um autotitulado MPT-

2 (Malvern Instruments, Reino Unido) e as análises foram conduzidas em função das variações dos pH de 8,0 até 2,0 a 25 °C. A força da interação eletrostática (SEI) entre polieletrólitos de carga oposta será estimada de acordo com a Eq. 1.

$$SEI(mV^2) = |ZP_1 \times ZP_2| \quad (\text{Eq. 1})$$

onde ZP_1 e ZP_2 são os potenciais zeta absolutos dos polímeros a um determinado pH.

2.2.3 Análise Turbidimétrica

A turbidez em função do pH foi medida usando um espectrofotômetro (Biocrom, Libra S12, Inglaterra) a 600 nm calibrado com água ultrapura para 100 % de transmitância (%T). Os pH's das soluções, variando de 8,0 a 2,0, foram ajustados com NaOH 0,1 M e 0,5 M e HCl 0,1 M e 0,5 M utilizando o pHmetro de bancada (mPA – 210, Tecnoyon, Brasil) e um agitador magnético a 300 rpm.

2.2.4 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A análise termodinâmica por calorimetria de titulação isotérmica foi realizada com o equipamento Nano-ITC (TA Instruments, New Castle, USA). A análise foi realizada a pH 4,0 usando tampão citrato 10 mM. A solução de OVA foi de $1,75 \times 10^{-1}$ mM e o NaAlg foi de $1,29 \times 10^{-3}$ mM. Após, as soluções já dissolvidas foram dialisadas com membranas de 3,5 kDa (Sigma-Aldrich, Midi 3500, USA) por 4 h para equilibrar a força iônica e o pH. As soluções foram filtradas (0,45 μ m) e degaseificadas sob vácuo em uma estação de degaseificação (TA instruments, New Castle, USA) por 2 min. No ITC, 10 μ L de OVA foram injetadas na célula de amostra em 150 s. No total, 250 μ L da solução de OVA foi titulada em uma célula de amostra contendo 1200 μ L da solução de NaAlg sob agitação a 310 rpm. Os parâmetros termodinâmicos foram obtidos por meio do programa TA Nano Analyze® e os resultados foram expressos em nível de significância de 0,05.

2.2.5 Diagrama de fase do complexo coacervado

Soluções estoques de OVA e NaAlg a 1,5 % (m/m) foram preparadas com solução de água ultrapura contendo 0,02 % (m/m) de azida de sódio. Seguindo a metodologia proposta

por Lan; Chen; Rao, (2018) foram avaliadas as concentrações totais de 0,1, 0,5, 1,0 e 1,5 % (m/m) em pH 4 em diferentes proporções de OVA:NaAlg e avaliados após repouso estático de 48 h à 4 °C.

2.3 Encapsulação do β C

A microencapsulação do β C foi baseada nos estudos realizados por Oliveira et al. (2020) e Soares et al., (2019). Para tanto, os materiais de parede foram utilizados nas concentrações 0,5 %, 1,0 % e 1,5 % (m/m) e razões de C: WM (1:1, 1:2 e 1:4). Inicialmente, emulsões óleo em água (O/A) foram preparadas usando óleo de coco contendo β C (5 %, m/m) e diferentes concentrações da solução de OVA. A emulsificação foi conduzida a 8 000 rpm por 1 min no ultra turrax (IKA, T25D Ultra Turrax, Alemanha) e em seguida no ultrassom UP100H (Hilcher, Germany) (100 % de amplitude e 0,5 ciclos/s) por 5 min. Após a formação das emulsões, foram adicionadas soluções de NaAlg, de acordo com as proporções mencionadas na Table 1. Para promover a coacervação complexa o pH da mistura foi ajustada para 4,0 fazendo uso da concentração de ácido acético a 25 % (v/v) com auxílio de um pHmetro de bancada. Em seguida, o sistema foi mantido sob agitação por 10 min a 300 rpm e colocado em banho de gelo por 1 h. Posteriormente, para induzir a reticulação, foram acrescentados 5 mL de CaCl₂ (30 mg/mL), e então mantidos refrigerados a 10 °C por 48 h. Após, o sobrenadante foi retirado e os precipitados obtidos foram congelados em nitrogênio líquido e, posteriormente, sua secagem foi realizada em liofilizador (Terroni, Enterprise I, Brasil) durante 48 h. Após a secagem foram armazenadas em dessecador para realização das demais análises.

2.3.1 Diagrama de fase dos sistemas contendo as microcápsulas

O diagrama de fase construído usando as concentrações totais de biopolímeros de 0,5, 1,0 e 1,5 % (m/m) na razão 8:1 (OVA:NaAlg) em pH 4,0 e razões de C: WM (1:1, 1:2 e 1:4), seguindo a metodologia proposta por (LAN et al., 2020; LAN; CHEN; RAO, 2018) com algumas modificações.

2.3.2 Microestrutura óptica de microcápsulas de β C

Uma alíquota da microcápsula (S9) preparada foi espalhada como uma camada fina entre a lâmina e a lamínula e observada ao microscópio óptico (K220, Kasvi, China) acoplado a uma câmera Moticam (5 MP, Kasvi, China).

2.3.3 Eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento

Para determinar a concentração de β C encapsulado, foi utilizado o método descrito e adaptado de Barbosa; Bastos; Garcia-Rojas (2021). Assim o valor teórico de β C (OT%) é dado pela Equação 2, o conteúdo carregado de β C (LC%) é dado pela Equação 3. A eficiência de encapsulação (EE%) é o conteúdo carregado de β C (LC%) dividido pelo valor teórico de β C (OT%), dado pela Equação 4.

$$OT (\%) = \frac{WI_{\beta\text{-caroteno}}}{WI_{\text{cápsula}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$LC (\%) = \frac{WF_{\beta\text{-caroteno}}}{WF_{\text{cápsula}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$EE (\%) = \frac{LC (\%)}{OT (\%)} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

onde $WI_{\beta\text{-caroteno}}$ é a massa inicial de β C adicionada ao sistema, $WI_{\text{cápsula}}$ é a massa inicial da cápsula, $WF_{\beta\text{-caroteno}}$ é o conteúdo de β C após o encapsulamento e $WF_{\text{cápsula}}$ é a massa final da cápsula após a liofilização.

Para determinar a concentração real de β C encapsulado, uma curva de calibração ($y = 0,0097x - 0,0269$, $R^2 = 0,987$) foi construída com β C dissolvido em hexano (0 a 1,2 mg/mL). A absorção das soluções padrão foram medidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm, e os resultados foram expressos em μg de β C por g^{-1} .

2.4 Caracterizações das microcápsulas contendo β C

2.4.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

OVA, NaAlg, óleo de coco (CN), β C em pó e microcápsulas liofilizadas contendo β C foram detectados por um Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier – FT-IR (Bruker, vertex 70, Germany). Os espectros foram obtidos em comprimentos de onda de 4000 a 400 cm^{-1} .

2.4.2 Simulação gastrointestinal

Os experimentos de simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* foram baseados na metodologia proposta por Brodkorb et al. (2019). De modo que, durante a simulação, amostras de 200 µL foram coletadas das fases gástrica (30, 60, 90 e 120 min) e intestinal (150, 180, 210 e 240 min).

Para simular a digestão oral, 0,6 mL de fluido de saliva simulada em pH 7,0; 3 µL de cloreto de cálcio (CaCl₂, 0,3 M) e 0,06 mL da solução salivar de amilase serão adicionados a 0,6 g de amostra. As amostras foram agitadas a 100 rpm no shaker (Tecnal, TE-424, Brasil) por 2 min, e terão as temperaturas controladas a 37 °C. Depois da digestão oral, 1,2 mL de fluido gástrico simulado foi misturado com 1,2 mL da fase oral. Após ajustar o pH para 3,0 com o pHmetro de bancada usando uma solução de ácido clorídrico (HCl, 6 M), foi adicionado 0,6 µL de cloreto de cálcio (CaCl₂, 0,3 M) e 0,12 mL de solução de pepsina suína e, imediatamente, incubado por 2 h no shaker a 100 rpm e 37 °C. Com o término da digestão gástrica, 2,4 mL de fluido intestinal simulado foi misturado à fase gástrica, e o pH será ajustado para 7,0 com hidróxido de sódio (NaOH, 6 M). Em seguida, foram adicionados 4,8 µL de cloreto de cálcio (CaCl₂, 0,3 M), 0,3 mL de bile e 0,6 mL de solução de pancreatina. A bile foi dissolvida em fluido intestinal simulado por 30 min a 37 °C a uma concentração final de 10 mM. A pancreatina solubilizada em fluido intestinal simulado na concentração de 100 U / mL. A fase simulada foi incubada por 2 h no Shaker a 100 rpm e 37 ° C.

2.4.3 Bioacessibilidade do βC encapsulado

A bioacessibilidade de βC foi determinada de acordo com os métodos previamente descritos por Santos; de Carvalho; Garcia-Rojas (2021b) e Zhang; Zhang; McClements (2016). Após a fase da simulação gastrointestinal, amostras da digestão foram coletadas e centrifugadas a 16000 rpm por 30 min a 4 ° C. O sobrenadante obtido após a centrifugação consiste na fração micelar. A bioacessibilidade (B) do βC, dada pela Equação 5:

$$B = \frac{C_{Micelar}}{C_{Digesta}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

onde $C_{Digesta}$ é a concentração de βC na digestão total e $C_{Micelar}$ é a concentração de βC na fração micelar.

2.4.4 Estabilidade do β C encapsulado

A estabilidade do β C, segundo a adaptação da abordagem proposta por Zhang; Zhang; McClements (2016) e por Bastos et al. (2020b), sendo a estabilidade (E) calculada de acordo com a Equação 6.

$$E = \frac{C_{Digesta}}{C_{Inicial}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

onde $C_{Inicial}$ é a concentração de β C presente nas amostras antes do processo de digestão e o $C_{Digesta}$ é a concentração de β C coletado na digesta total após a fase do intestino delgado.

2.4.5 Biodisponibilidade efetiva do β C encapsulado

A biodisponibilidade efetiva do β C, segundo a adaptação da abordagem proposta por Zhang; Zhang; McClements (2016) e por Bastos et al. (2020b) sendo a biodisponibilidade efetiva (BD) calculada de acordo com a Equação 7.

$$BD = \frac{C_{Micelar}}{C_{Inicial}} \times 100 = B * E \quad (\text{Eq. 7})$$

onde $C_{Micelar}$ é a concentração de β C na fração micelar após a fase do intestino delgado.

2.4.6 Cinética de Liberação do β C encapsulado

A cinética de liberação foi medida seguindo a metodologia adotada por Barbosa; Bastos; Garcia-Rojas (2021), de modo que 200 mg das amostras de β C encapsulado foram pesadas em balança analítica e misturado com 10 mL de simulador alimentar (óleo de soja) por meio de um agitador magnético a 95 rpm a 25 °C. Alíquotas de 200 μ L foram coletadas e analisadas por espectrofotômetro a 450 nm. Com o intuito de explicar o perfil de liberação do β C encapsulado, a cinética de liberação foi ajustada para os modelos empíricos de Higuchi (Equação 11), Ritger-Peppas (Equação 12) e de primeira ordem (Equação 13).

$$Q(t) = K_h t^{0.5} + A \quad (\text{Eq. 11})$$

onde K_h representa a constante de dissolução de Higuchi, $Q(t)$ é a quantidade de núcleo liberada no decorrer do tempo t e A é a quantidade inicial de βC em solução, sendo geralmente iguais a zero.

$$Q(t) = K_r t^n \quad (\text{Eq. 12})$$

onde k_r é a constante da taxa de liberação e n é o expoente de liberação.

$$Q(t) = Q_{m\acute{a}x} * (1 - e^{-kt}) \quad (\text{Eq. 13})$$

onde $Q_{m\acute{a}x}$ é a quantidade máxima de C liberada e k é a de velocidade de liberação de primeira ordem.

2.5. Enriquecimento dos biscoitos com microcápsulas contendo βC

Massa de biscoito composto majoritariamente por farinha de trigo, gordura, açúcar e água, como proposto por Almeida et al. (2018) e Venturini et al. (2019), foi utilizado como matriz alimentar para a incorporação das microcápsulas de βC . Três formulações dos biscoitos (Tabela 2) foram testadas, uma amostra controle, sem adição de microcápsulas, uma com adição de βC puro e outra com adição de microcápsulas de βC (MP- βC). Para a preparação, de forma resumida, teremos a margarina, açúcar, sal e bicarbonato de sódio e misturados por 3 min. Posteriormente, as microcápsulas foram adicionadas seguidas da farinha de trigo. Em seguida, adiciona-se a água e realiza-se a homogeneização por 2 min. A massa foi então modelada no formato de discos padronizados com 5 mm de espessura e 50 mm de diâmetro. No cozimento, os biscoitos foram submetidos a 170 °C no forno elétrico (Mondial, FR-20, Brasil) por 8 min, e posteriormente, resfriados à temperatura ambiente e analisados.

2.5.1 Atividade Antioxidante (ABTS e FRAP)

A determinação da atividade antioxidante total utilizou os métodos do sequestrante de radicais ABTS \cdot^+ adotada por Rufino et al. (2007) e do potencial antioxidante redutor de ferro (FRAP) adotada por Rufino et al. (2006). Para ambas metodologias, 5 g das amostras de biscoitos foram misturadas com 40 mL de metanol 50 % e homogeneizadas em agitador magnético a 300 rpm por 60 min à 25 °C no escuro e centrifugadas a 15000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e reservado no escuro.

Os resíduos obtidos foram acrescidos com 40 mL de acetona 70 % e submetidos a agitação magnética a 300 rpm por 60 min à 25 °C no escuro e centrifugados a 15000 rpm por 15 min. O sobrenadante obtido foi transferido para o balão volumétrico contendo o primeiro sobrenadante e o volume foi completado para 100 mL com água ultrapura. Com a curva padrão obtida, o resultado final encontrado foi expresso em termos de Trolox Equivalente ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) de microencapsulado de βC nos biscoitos.

2.6 Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos realizando os testes em triplicata e os resultados sendo apresentados com \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas a partir da variância (ANOVA) para verificar diferenças significativas entre os resultados obtidos, e o teste de Tukey foi usado para estabelecer qual foi estatisticamente diferente, sendo as diferenças entre os valores médios ao nível de significância de $\alpha = 0,05$ no Origin[®] Pro 9.0 (OriginLab, Northampton, USA).

3. Resultados e discussão

3.1 Formação do complexo coacervados a partir de OVA/ NaAlg

3.1.1 Influencia do pH na formação do complexo coacervado

A Fig. 10 mostra o ζ -potencial e o SEI dos biopolímeros em função do pH. Observa-se nesta Figura que o complexo OVA/ NaAlg pode ser formado entre o ponto isoelétrico (pI) da OVA (5,0) e o pKa do NaAlg (3,38 – 3,68). Sendo o maior valor de SEI em pH 3,5, no entanto um valor de pH próximo ao pKa pode contribuir para que os grupos carboxílicos nas moléculas de NaAlg sofram protonação ($-\text{CO}_2^- \rightarrow -\text{CO}_2\text{H}^+$), favorecendo a autoagregação desses grupos (PHILLIPS; WILLIAMS, 2009). Desta forma foi escolhido o pH 4,0 para formação dos complexos coacervados entre OVA e NaAlg. Valores similares de pH foram encontrados para a formação de complexo coacervado com OVA e polissacarídeos: alginato de propileno glicol (ZOU et al., 2020), pectina (SOARES; CARVALHO; GARCIA-ROJAS,

2021), goma xantana e pectina (VICENTE et al., 2017), e goma arábica (SPONTON; PEREZ; SANTIAGO, 2017).

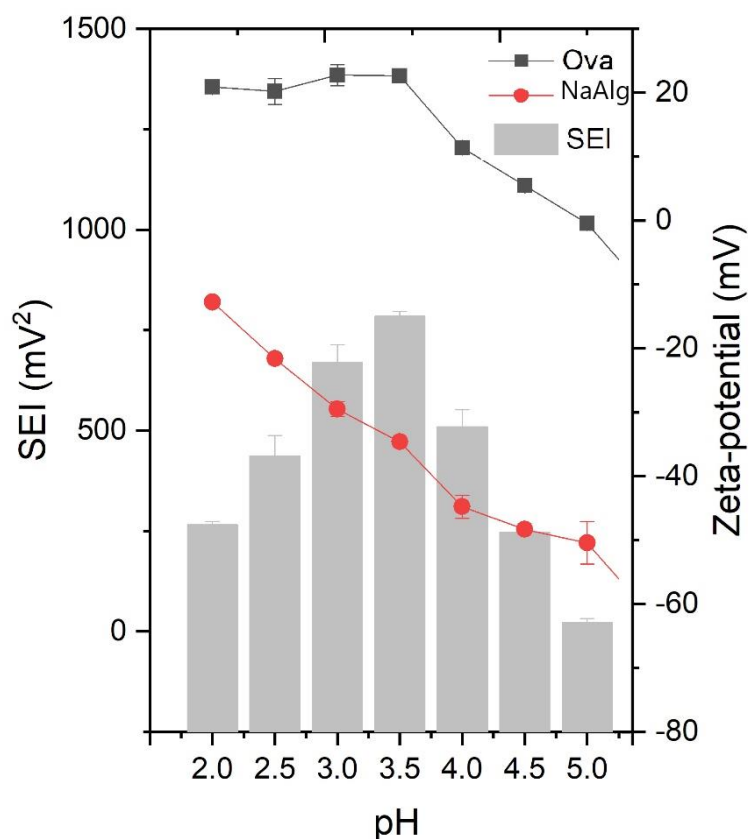


Figura 10. ζ -potencial e SEI da OVA, NaAlg e do complexo OVA/NaAlg.

3.1.2 Titulação turbidimétrica da mistura dos biopolímeros (OVA e NaAlg)

Na Fig. 11 é apresentada a influência da razão de OVA: NaAlg na turbidez da solução empregando uma concentração de biopolímeros totais de 0,1 % (m/m) em pH 4. Observa-se nesta Figura que a partir da razão 7:1 obtêm-se os maiores resultados, com 94,93 até 98,13 % de turbidez. A partir da razão 8:1 (OVA: NaAlg) não houve diferenças visuais em relação ao precipitado e o sobrenadante resultante. Nesse sentido, essa razão foi escolhida, por apresentar maior concentração de precipitados em relação as razões menores, além de não constatar diferenças em relação as razões 9:1 e 10:1.

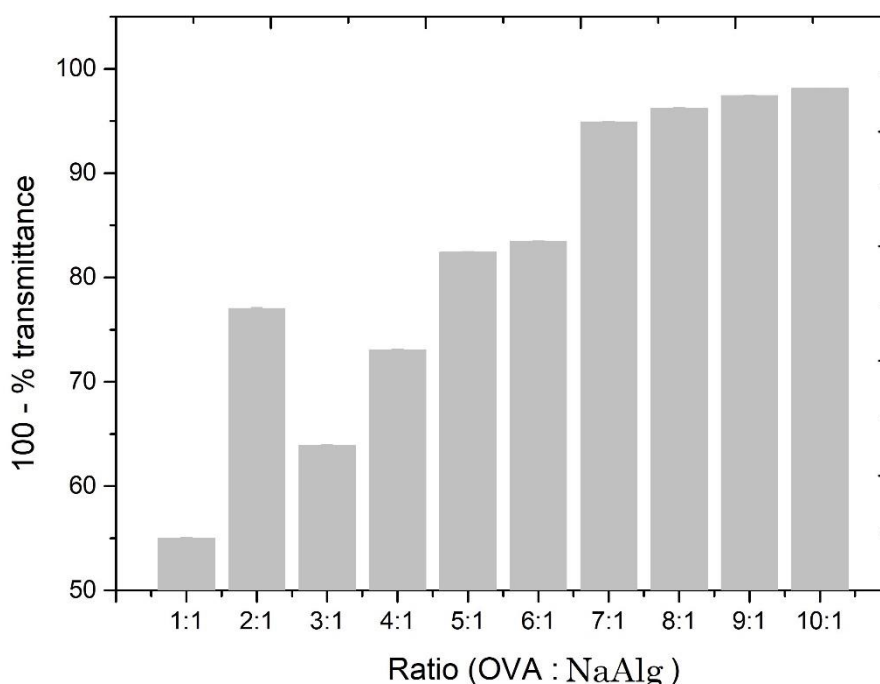


Figura 11. Turbidez (100 - %T) em função das diferentes razões de OVA:NaAlg em pH 4,0.

Na Fig. 12 são apresentados os dados de turbidez em função do pH da OVA NaAlg e o complexo formado pela OVA: NaAlg na razão 8:1. Nesta Figura observa-se que o complexo OVA: NaAlg entre o pH 8,0 e 5,0 ($\text{pH} > \text{pI}$) resultou em leves alterações na turbidez em comparação a solução de OVA pura, demonstrando diferença maior de 10 % na turbidez em pH 5,0 ($\text{pH} = \text{pI}$), devido a fraca associação entre os biopolímeros (BASTOS; DE CARVALHO; GARCIA-ROJAS, 2018). Entre o pH 5,0 e 4,5 há um aumento considerável na turbidez, devido a melhor interação entre os biopolímeros, pois é uma faixa abaixo do ponto isoelétrico da proteína, deixando-a carregada positivamente (SPONTON; PEREZ; SANTIAGO, 2017). Posteriormente, na faixa de pH entre 4,5 e 4,0 há um aumento abrupto na turbidez, chegando a aproximadamente 98,5 %, demonstrando uma maior interação entre os biopolímeros devido à formação de complexos coacervados. Nessa faixa de pH, a alta turbidez observada, se justifica pela interação entre as cargas positivas da OVA formadas pelo $\text{pH} < \text{pI}$, com as cargas negativas do NaAlg geradas pelo $\text{pH} > \text{pKa}$, resultando em atração eletrostática entre os biopolímeros (BASTOS; DE CARVALHO; GARCIA-ROJAS, 2018). Abaixo do pH 3,5, a elevada turbidez pode ser observada devido a dissolução completa dos complexos, ocasionando a autoagregação das moléculas de NaAlg, ocasionada pelo $\text{pH} < \text{pKa}$, resultando também em complexos solúveis (BASTOS; DE CARVALHO; GARCIA-

ROJAS, 2018; SOARES et al., 2019). Contudo, com estes dados ficou confirmado que o pH adequado para a formação dos complexos foi o pH 4,0.

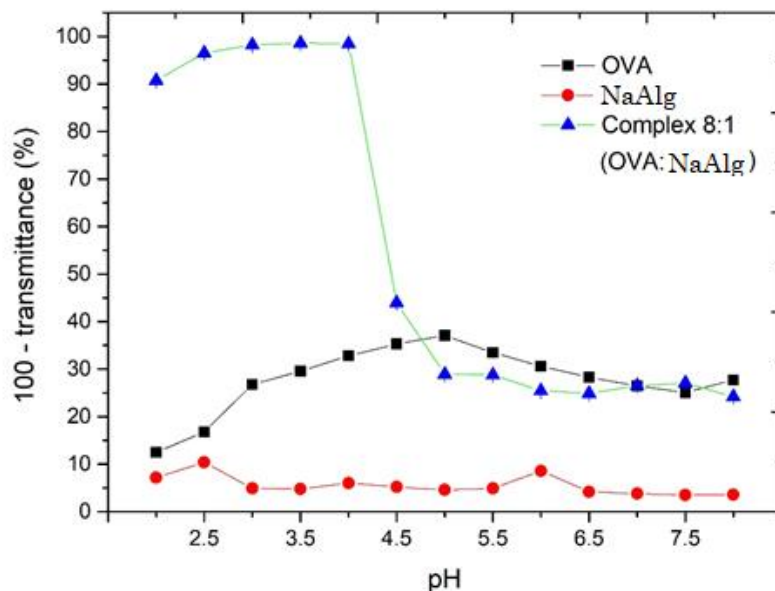


Figura 12. Turbidez (100 - %T) em função do pH dos sistemas contendo OVA e NaAlg individualmente e na razão 8:1.

3.1.3 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

O termograma do fluxo de calor ao longo do tempo obtido da titulação da OVA em NaAlg no pH 4,0 a 25 °C é mostrado na Fig. 11. A Fig. 13A mostra que na titulação obteve um perfil exotérmico ao longo do tempo das etapas de formação do complexo OVA: NaAlg, liberando energia nas injeções (XIONG et al., 2017). O perfil exotérmico está associado principalmente a neutralização eletrostática inespecífica das cargas opostas transportadas pelos biopolímeros (CONSTANTINO; GARCIA-ROJAS, 2022a).

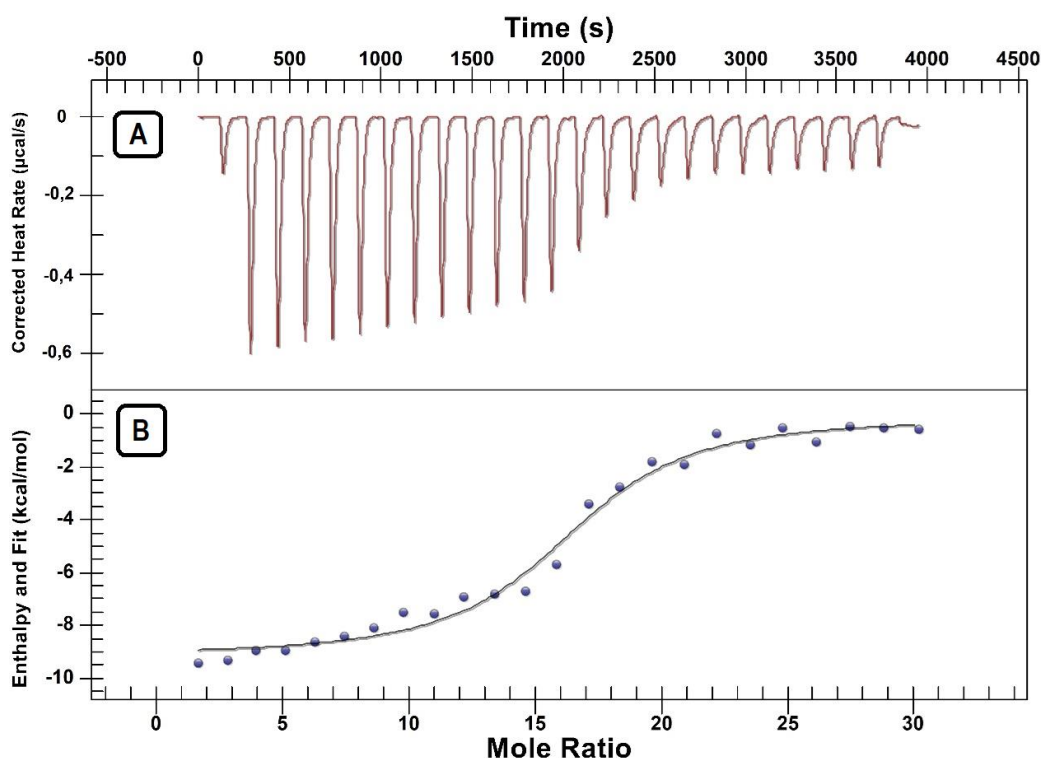


Figura 13. (A) Termograma de fluxo de calor ($\mu\text{cal/s}$) em função do tempo (s), obtido durante a titulação de 250 μl de 0,175 mM de OVA em 1200 μl de $1,29 \times 10^{-3}$ mM de NaAlg em tampão de citrato a 10 mM, ambos em pH 4,0 a 25 °C e (B) Representação gráfica da integral das áreas em cada pico (kcal/mol) em função da razão molar da OVA/NaAlg em pH 4 ($p < 0,05$).

A isoterma de ligação (Fig. 13B) foi ajustada a partir do termograma usando o "sítio de ligação independente". Os parâmetros termodinâmicos obtidos incluem reação estequiométrica (N), constante de ligação (K), mudança de entalpia (ΔH), mudança de entropia ($T\Delta S$), e mudança na energia livre de Gibbs (ΔG), calculados a partir da equação $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, onde T é a temperatura em kelvin (298,15 K). No presente estudo, os parâmetros encontrados foram: $K (\text{M}^{-1}) = 5,278 \times 10^7$, $N (\text{mol OVA/mol NaAlg}) = 16,71$, $\Delta H (\text{kcal/mol}) = - 8,737$, $\Delta S (\text{cal}\cdot\text{K/mol}) = - 0,578$, $\Delta G (\text{kcal/mol}) = - 8,564$. Assim o $\Delta G < 0$, indica que o processo de formação dos complexos OVA e NaAlg ocorreram de forma espontânea, ou seja, a coacervação complexa é termodinamicamente favorável (ZHENG et al., 2020). Com $\Delta H < 0$, há contribuição entálpica na formação dos complexos, e $\Delta S < 0$ indica que a interação polimérica foi entropicamente desfavorável (BARBOSA et al., 2022). A constante de ligação na ordem de 10^7 M^{-1} , demonstra a forte afinidade de ligação existente entre a OVA e o NaAlg. Assim como observado em estudos com proteína e polissacarídeo

formando complexos, como OVA e carragena (SOUZA et al., 2018), OVA e Lisozima (SANTOS; COSTA; GARCIA-ROJAS, 2018) e β -lactoferrina e NaAlg (BASTOS et al., 2020a).

3.1.4 Diagrama de fases dos complexos

O diagrama de fases dos complexos coacervados em diferentes concentrações de biopolímeros totais e função de diferentes razões de OVA:NaAlg são apresentadas nas Fig. 14. Nesta Figura, observa-se que o diagrama de fases das misturas dos biopolímeros a partir da razão 8:1 (OVA:NaAlg) com concentrações totais variando de 0,1 % até 1,5 % (m/m), apresentaram solução límpida com precipitados, mesmo em concentrações elevadas, ponto este que seria indetectável em análises baseadas no valor da turbidez (LAN et al., 2020; LAN; CHEN; RAO, 2018). Há estudos sobre o uso do diagrama de fases na determinação da razão polimérica em concentrações totais elevadas na formação de complexos e microcápsulas, conforme trabalhos realizados com proteína isolada de ervilha e pectina de beterraba (LAN; CHEN; RAO, 2018) na formação de complexos e na microencapsulação de composto lipofílico (LAN et al., 2021).

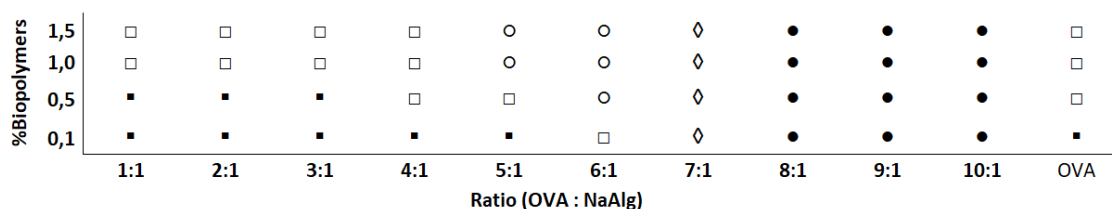


Figura 14. Diagrama de fase das misturas de OVA e NaAlg em diferentes razões em pH 4. Os símbolos representam (*) solução translúcida, (□) solução turbida / leitosa, (○) solução nebulosa com precipitados, (●) solução límpida com precipitados e (◇) solução translúcida com precipitados, respectivamente.

Observa-se ainda que na concentração de 1,5 % (m/m), todas as razões 8:1, 9:1 e 10:1 (OVA:NaAlg) se apresentam com solução límpida e com precipitados, ao contrário das razões abaixo de 8:1, que apresentam soluções translúcidas e nebulosas, ou seja, com complexos solúveis (LAN et al., 2020). As soluções translúcidas resultam em complexos solúveis, que derivam da proteína ou do polissacarídeo que estão em excesso na solução, resultando em uma mistura com cargas não neutralizadas (XIONG et al., 2016), as soluções nebulosas são caracterizadas pelas soluções com biopolímeros solúveis, de modo que as soluções límpidas

com precipitados oriundas de complexos insolúveis, deixam o sobrenadante totalmente límpido (ZOU et al., 2020).

A razão 8:1 (OVA:NaAlg) observada no diagrama de fase foi a escolhida, pois sugere que sua mistura tem características mais estáveis que as razões maiores, pelo fato do aumento da concentração polimérica ser um fator de interferência na eficiência da formação de complexos (BASTOS et al., 2020a; RUTZ et al., 2016).

3.2 Microencapsulação do β C

A sequência esquemática parcial da metodologia utilizada para a obtenção de microcápsulas do β C por coacervação complexa está representada na Figura 15.

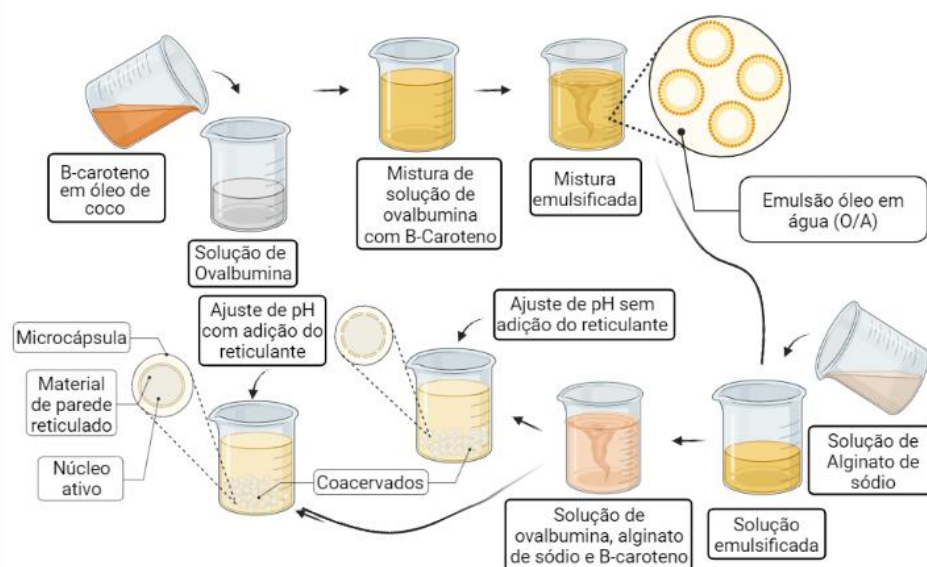


Figura 15. Esquema parcial do processamento de microcápsulas de β -caroteno obtidas por coacervação complexa utilizando os biopolímeros ovalbumina (OVA) e alginato de sódio (NaAlg) como material de parede. Elaboração própria.

3.2.1 Eficiência de encapsulação

Na Tabela 6 são apresentados os nove tratamentos que foram realizados para encapsulamento do β C, em concentrações totais de biopolímeros (0,5, 1,0 e 1,5 %, m/m) e nas razões 1:1, 1:2 e 1:4 (C:WM). Nesta Tabela pode-se observar que os tratamentos apresentaram valores altos de EE%, variando de 69 a 97 %. Diversos trabalhos reportados na literatura empregando a coacervação complexa aprestaram resultados similares, obtendo EE%

acima de 60 %, ao encapsular óleo de sacha inchi (BARBOSA; BASTOS; GARCIA-ROJAS, 2021; SOARES et al., 2019; SOARES; CARVALHO; GARCIA-ROJAS, 2021), óleo da semente de cânhamo (LAN et al., 2021) e óleo essencial de pimenta-do-reino (BASTOS et al., 2020a, 2020b). Neste estudo, os maiores valores encontrados foram as razões C:WM de 1:2 (92,45 % ± 6,54 % e 93,23% ± 5,70 %) e 1:4 (91,18% ± 7,06 %, 95,95 % ± 3,46 e 97,85 % ± 0,86 %) sem diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Desta forma, dos 5 tratamentos estudados, o que apresentou o maior resultado de referência entre eles foi a amostra S9, com 97,85 % ± 0,86 % de eficiência na encapsulação e a uma razão de 1:4 (C/WM), sendo a escolhida. Em contraste com Barbosa; Bastos; Garcia-Rojas (2021), que em seus estudos ao encapsular óleo de sacha inchi, encontraram o valor máximo de EE% de 96,21 % ± 3,39 % através da coacervação complexa entre proteína isolada de soro de leite e carboximetilcelulose, ambos a concentração total de 2 % e a uma razão de 1:1 (C/WM).

Pode-se observar também que nos tratamentos A1, A4 e A7, cuja razão C/WM são de 1:1, apresentaram valores de EE (%) menores que 80 %, sugerindo que a quantidade de biopolímeros presentes nas misturas não foram suficientes para envolver o C na etapa de emulsificação, resultando na encapsulação parcial do material ativo presente na solução.

3.2.2 Diagrama de fases dos sistemas contendo microcápsulas do β C

O diagrama de fase de todos os sistemas estudados no encapsulamento do β C são apresentados nas Fig. 16 e Fig. 17. Nestas Figuras observa-se que todos os sistemas estudados apresentaram sobrenadantes translúcidos e precipitados contendo as MP- β C. Tais resultados evidenciam a capacidade do material de parede (OVA:NaAlg) de formar complexos eficientemente estáveis e insolúveis nas condições estudadas. Isto pode ser explicado pela aplicação do ultrassom na pré-emulsão (óleo/água, O/A) formada entre o C e a solução de OVA. Pois segundo Pingret, Fabiano-Tixier, Chemat (2013) e Silva et al. (2015), sugere-se que a energia fornecida pelo ultrassom devido ao cisalhamento mecânico durante a homogeneização e a implosão de bolhas de cavitação, produzidas pelo contato da sonda com a solução, reduziram as gotículas do C na solução de proteína, aumentando sua área de contato e possibilitando a emulsificação eficiente da solução. Tal eficiência depende de fatores determinantes como frequência e intensidade utilizadas, aliadas a duração das ondas ultrassônicas empregas na solução (MCCLEMENTS, 2015). Esses resultados são consistente

com os relatos apresentados no estudo com óleo de cânhamo encapsulado a partir de proteína isolada de ervilha e pectina de beterraba (LAN et al., 2021).

Tabela 6. Eficiência de encapsulamento (% EE) do β C em coacervados complexos formados por proteína ovalbumina (OVA) e polissacarídeo alginato de sódio (NaAlg).

AMOSTRA	MATERIAL DE PAREDE (g)			NÚCLEO (g)	NÚCLEO / MATERIAL DE PAREDE (m/m)	SOL. DE CLORETO DE CÁLCIO (g)	EE (%)
	OVA (g)	NaAlg (g)	TOTAL (g)				
S1	0,1333	0,0167	0,1500	0,1500	1:1	5	69,49 ^d ± 0,84
S2	0,1333	0,0167	0,1500	0,07500	1:2	5	84,61 ^{b,c} ± 1,48
S3	0,1333	0,0167	0,1500	0,0375	1:4	5	91,18 ^{a,b,c} ± 7,06
S4	0,2667	0,0333	0,3000	0,3000	1:1	5	69,97 ^d ± 4,84
S5	0,2667	0,0333	0,3000	0,1500	1:2	5	93,23 ^{a,b,c} ± 5,70
S6	0,2667	0,0333	0,3000	0,07500	1:4	5	95,95 ^{a,b,c} ± 3,46
S7	0,4000	0,0500	0,4500	0,4500	1:1	5	76,24 ^{c,d} ± 4,78
S8	0,4000	0,0500	0,4500	0,2250	1:2	5	92,45 ^{a,b,c} ± 6,54
S9	0,4000	0,0500	0,4500	0,1125	1:4	5	97,85 ^a ± 0,86

Os resultados do EE (%) apresentados são as médias ± desvio padrão. As letras sobrescritas nas médias são resultados estatísticos de Tukey e suas diferenças significativas que as amostras se diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

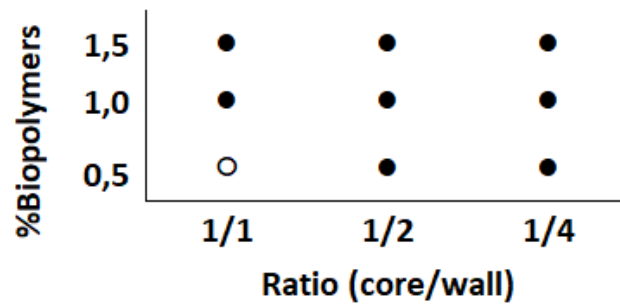


Figura 16. Diagrama de fase das misturas de OVA e NaAlg com bioativo (β C dissolvido em óleo de coco) em diferentes razões em pH 4. Os símbolos representam (○) solução nebulosa com precipitados e (●) solução límpida com precipitados, respectivamente.

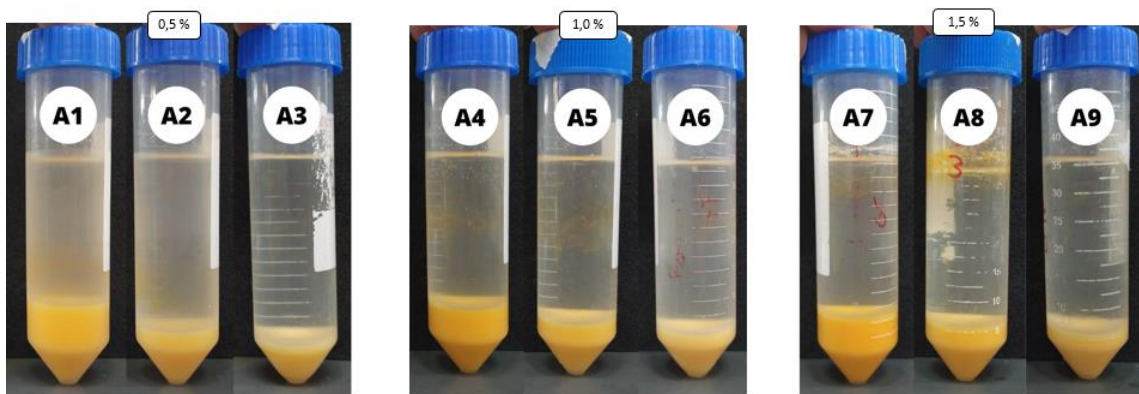


Figura 17. Interação entre as diferentes misturas de OVA e NaAlg em pH 4 nas concentrações totais de biopolímeros de 0,5 %, 1,0 % e 1,5 % (m/m), com razões de misturas de 1:1 (S1, S4 e S7), 2:1 (S2, S5 e S8) e 4:1 (S3, S6 e S9) (WM:C), sendo a aparência observada, após armazenamento a 4 °C por 48 h, em pé.

3.2.3 Microscopia óptica das microcápsulas

A Fig. 18 mostra a morfologia das partículas formadas, denominadas microcápsulas devido aos tamanhos observados se enquadrarem na escala microscópica de 1 μ m a 100 μ m. Tal morfologia das partículas produzidas evidencia ainda a microencapsulação do β C na razão C/WM 1:4 (Amostra 9, S9). Verifica-se a presença do material amarelado em seu interior, que pela coloração indica ser do β C encapsulado. Ao redor observa-se uma interface densa, em forma de círculo, que provavelmente seja formada pelos materiais de parede empregados (OVA e NaAlg). De acordo com os estudos de outros autores, que encapsularam compostos lipofílicos usando emulsões O/A, observaram imagens semelhantes (BARBOSA; BASTOS; GARCIA-ROJAS, 2021). Entretanto, a Fig. 18 evidencia também aglomerados de partículas, com materiais depositados ao redor, umas das outras. Tal situação pode ser explicada pelas ligações

sólidas entre as microcápsulas, provenientes da formação dos coacervados complexos (TIMILSENA et al., 2016).

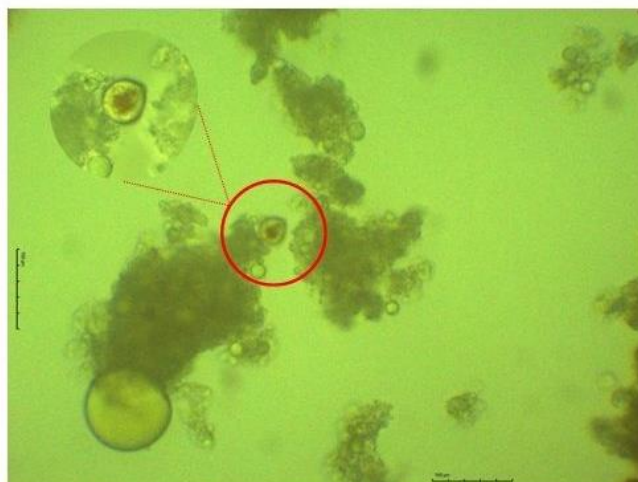


Figura 18. Microscopia óptica de microcápsulas 48 h após a precipitação. A fotografia foi tirada com aumento de 10 x. As barras de escala são de 100 μm .

3.2.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Fig. 19 mostra espectros de FT-IR de OVA, NaAlg, CN, βC , Núcleo - mistura entre CO e βC (C), Complexo (OVA-NaAlg) e microcápsulas na razão C/WM de 4:1 (MC). O espectro de OVA apresentou bandas de amida I (1633 cm^{-1} , atribuída ao alongamento $\text{C} = \text{O}$ / ligação de hidrogênio), amida II (1517 cm^{-1} , atribuída ao alongamento da ligação NH_2) e amida III (1392 cm^{-1} , atribuída a ligação de estiramento de $\text{C} - \text{N}$ e $-\text{NH}$), que correspondem as bandas características das proteínas. Resultados semelhantes em estudos com proteínas e polissacarídeos formando complexos foram observados por Bastos, Carvalho, Garcia-Rojas (2018), Santos, Carvalho, Garcia-Rojas (2018), Soares et al. (2019) e Soares, Carvalho, Garcia-Rojas (2021). O espectro da OVA demonstrou a presença dos grupos funcionais característicos como $-\text{OH}$ de aminoácidos livres, e um alongamento do grupo amino NH_2 em 3280 cm^{-1} .

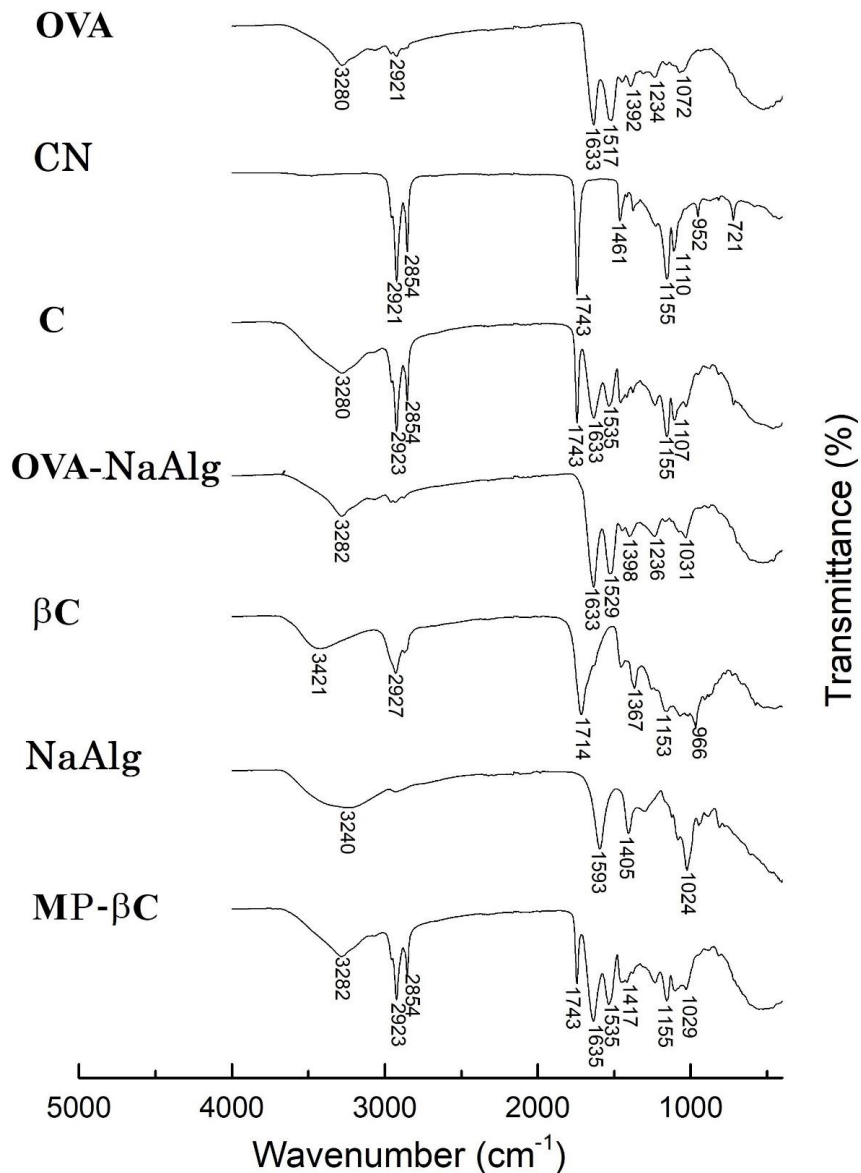


Figura 19. Espectros FT-IR de Ovalbumina (OVA), alginato de sódio (NaAlg), óleo de coco (CN), núcleo (C), complexo (OVA – NaAlg), β-Caroteno (βC) e microcápsulas carregadas de βC (MP-βC).

Com o NaAlg, as bandas principais em seu espectro correspondem ao CO_2^- presente nos sais de ácido carboxílico ($-\text{COO}^-$), sendo representado pela banda em 1593 cm^{-1} , atribuída ao alongamento assimétrico na região entre 1650 e 1550 cm^{-1} , juntamente com a ligação $-\text{CO}$ pertencente ao grupo ácido (RCOOH), representado pela banda em 1405 cm^{-1} , atribuída ao alongamento simétrico na região correspondente a 1440 e 1395 cm^{-1} . Conforme resultados semelhantes apontados por Soares et al. (2019). A banda 1024 cm^{-1} corresponde ao alongamento vibracional entre $\text{C}-\text{O}$ e $\text{C}-\text{C}$ do anel piranose, conforme descrito por Bokkhim et al. (2015) e Soares et al. (2019).

O espectro referente ao complexo OVA-NaAlg demonstrou a interação entre ambas, sendo observadas bandas na região característica do grupo amina (NH_2) na OVA (1633 cm^{-1}) e a banda na região característica do íon do grupo carboxila ($-\text{COO}^-$) no NaAlg (1024 cm^{-1}). A presença desses grupos no espectro OVA-NaAlg, demonstrado na Fig. 18, são indícios da interação entre ambos e, conseqüentemente, formação de coacervados complexos. Resultados semelhantes na formação dos materiais de parede dos coacervados complexos foram relatados em estudos com ovalbumina e alginato de sódio (SOARES et al., 2019), ovalbumina, ácido tânico e pectina (SOARES; CARVALHO; GARCIA-ROJAS, 2021), proteína de ervilha e pectina de beterraba (LAN et al., 2020). Os deslocamentos dos picos constatados no espectro da microcápsula em comparação individual dos espectros de cada componente sugerem interações entre grupos positivos da OVA e negativos do NaAlg. A banda 1029 cm^{-1} consiste no indício de interação eletrostática entre os grupos carboxílicos ($-\text{COO}^-$) presentes no NaAlg e os grupos amina ($-\text{NH}_3^+$) presente na OVA, como proposto por Bastos, Carvalho, Garcia-Rojas (2018).

A microcápsula carregada com βC na razão 4:1 (WM:C) e o complexo coacervado formado na razão 8:1 (OVA:NaAlg), apresentou bandas sobrepostas, sendo possível identificar as bandas características para o óleo de coco nos comprimentos de ondas 2923 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} , 1743 cm^{-1} e 1155 cm^{-1} e para o βC em 2923 cm^{-1} , 1743 cm^{-1} e 1153 cm^{-1} . A OVA apresentou bandas características em 3282 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , 1535 cm^{-1} e 1635 cm^{-1} e o NaAlg apresentou bandas características em 1535 cm^{-1} , 1417 cm^{-1} e 1029 cm^{-1} .

As bandas características do βC (2923 cm^{-1}) e do CN (2854 cm^{-1}) indicam alongamento $-\text{CH}$. As vibrações $=\text{CO}$ referente aos ácidos graxos poliinsaturados pode ser observada em 1743 cm^{-1} e o alongamento $\text{C}-\text{O}$ pode ser observado em 1153 e 1155 cm^{-1} . A banda em 1635 cm^{-1} refere-se ao alongamento $=\text{CN}$. Com a observação das bandas características do βC no espectro da microcápsula, sugere-se que houve o encapsulamento do βC . Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com ovalbumina em interação com ácido tânico e pectina (SOARES; CARVALHO; GARCIA-ROJAS, 2021) e com alginato de sódio (SOARES et al., 2019). Além de espectros semelhantes com diferentes proteínas e polissacarídeos como a carboximetilcelulose em interação com lacfoterrina (BARBOSA et al., 2022) e com proteína isolada de amaranto (CONSTANTINO; GARCIA-ROJAS, 2022b).

3.2.5 Simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* das microcápsulas de β C

A Fig. 20 apresenta o estudo da liberação do β C encapsulado via simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*, sendo realizado nas fases oral (2 min), gástrica (2 h) e intestinal (2 h).

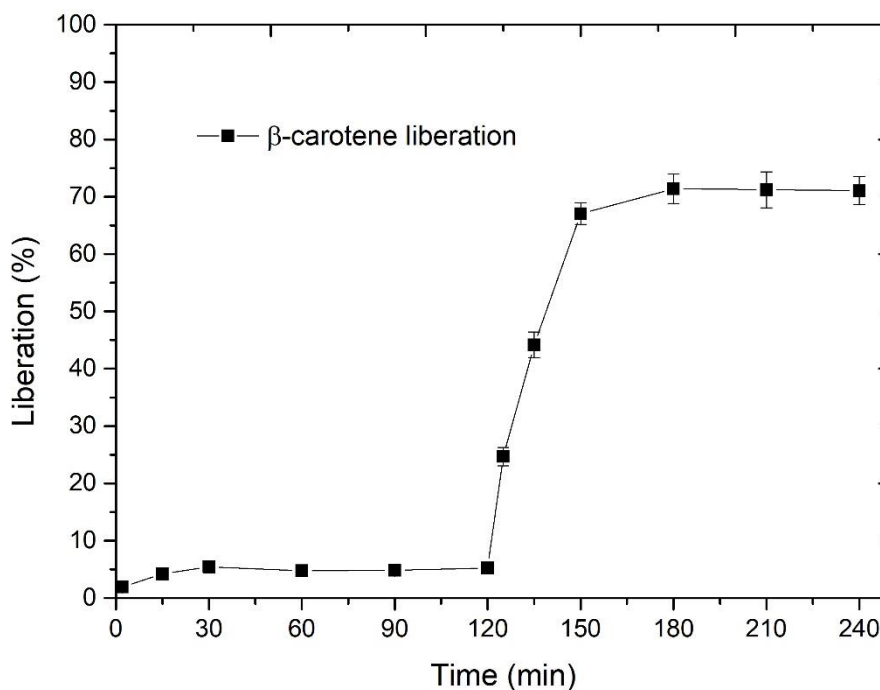


Figura 20. Liberação do β C encapsulado em microcápsulas com material de parede OVA/NaAlg durante a digestão *in vitro*.

Nas condições orais, durante 2 min, a amostra foi misturada ao simulador oral em pH 7,0, sendo que nessa etapa as microcápsulas apresentam uma liberação muito pequena, em torno de 2 %, demonstrando a estabilidade das microcápsulas.

Após as condições da fase oral, as microcápsulas foram submetidas as condições da digestão gástrica, na qual ficaram por 2 h, em pH 3,0. Nessa fase, conforme observado na Fig. 20, apenas 5,46 % do β C encapsulado foi liberado para o meio, mantendo preservado mais de 94 % do bioativo encapsulado. Tal observação demonstra a resistência das microcápsulas ao rompimento e liberação do bioativo em pH abaixo do pKa do polissacarídeo que compõe o revestimento das microcápsulas. O pH nesta fase pode ser desfavorável as interações eletrostáticas, devido as cargas dos polissacarídeos ficarem negativas, ocasionando a autoagregação, derivada dos grupos carboxílicos aniônicos que os compõem (ZHANG; ZHANG; MCCLEMENTS, 2016). Entretanto, essa baixa liberação pode ter sido ocasionada pela presença da pepsina, derivada do

estômago, que degrada proteínas, sugerindo que houve um rompimento parcial das microcápsulas e liberação do bioativo para o meio, conforme descrito por Bastos et al. (2020b) em estudos com óleo de pimenta do reino. Para tanto, os resultados apresentados acima evidenciam a resistência da OVA a digestão, provavelmente devido a sua estrutura peptídica, em sinergismo com a proteção ocasionada pelo NaAlg ao complexo OVA/NaAlg (MCCLEMENTS, 2015). Há relatos em estudos que o NaAlg auxilia na inibição da atividade da pepsina sobre as proteínas que compõem o material de parede em testes *in vitro*, porém tal inibição ainda não é bem compreendida (BASTOS et al., 2020b; CHATER et al., 2015; STRUGALA et al., 2005).

Com o término das condições gástricas, inicia-se a fase intestinal por mais 2 h, elevando o pH para 7,0 e tendo a participação de mais enzimas no processo. Nessa fase, consta-se que a partir do 20 min iniciais, há um aumento abrupto da liberação de bioativo para o meio simulado, superior a 60 %, sendo a liberação máxima alcançada no 30 min iniciais em torno de 71,4 %. Tal liberação pode ser atribuída a baixa resistência do NaAlg as reações degradativas provenientes da tripsina (CHATER et al., 2015), associado a fase neutra proveniente do pH 7,0, ocorre facilmente o rompimento das microcápsulas na fase intestinal, juntamente com o pH que não é adequado para a formação do complexo coacervado, promovendo a liberação do β C nos fluidos intestinais simulados. Estudos similares obtiveram resultados parecidos, ao empregarem a simulação gastrointestinal microcápsulas de β -lactoglobulina/NaAlg e lactoferrina/NaAlg encapsulando óleo essencial de pimenta do reino (BASTOS et al., 2020a, 2020b), com liberação de 90,5 % e 84,87 %, respectivamente.

3.2.6 Liberação controlada

Na Fig. 21 são apresentados os dados da cinética de liberação do β C contido nas microcápsulas em função do tempo. Aos 7 min, foi constatada uma liberação de β C significativa de $56,66 \pm 8,97$ %, e manteve uma taxa linear de crescimento até os 25 min, alcançando uma liberação cinética de $75,85 \pm 2,35$ %, e se manteve com pequenas variações de crescimento e queda, entre 74,5 % e 77,8 %, no decorrer do tempo de 25 a 50 min. A partir dos 50 min, houve um aumento na liberação até 60 min para $81,61 \pm 2,35$ %, sendo seu pico máximo de liberação em 90 min de experimento com liberação em torno dos $86,41 \pm 3,77$ %. O ajuste do mecanismo de liberação cinética do β C nas

microcápsulas utilizando o óleo de soja como modelo alimentar foi determinado a partir das equações 11, 12 e 13 (Fig. 22).

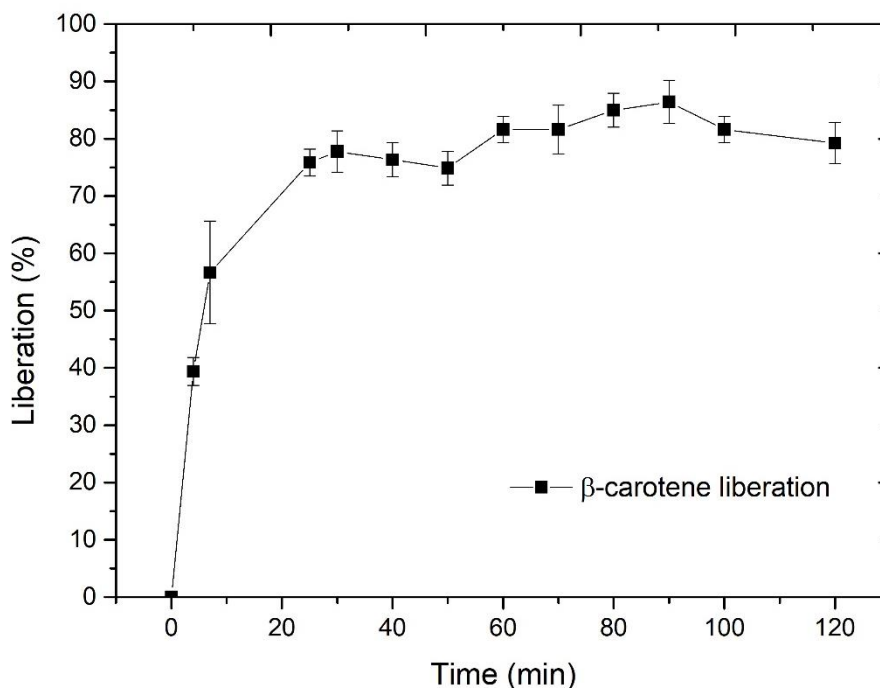


Figura 21. Perfil da cinética de liberação do β C em microcápsulas submetidas a uma simulação alimentar em óleo de soja.

Os modelos matemáticos utilizados foram Higuchi, Ritger-Peppas e primeira ordem. Os coeficientes de determinação (R^2) e as constantes obtidas dos modelos matemáticos foram 0,43 e $9,79 \pm 0,70$ para Higuchi, 0,94 e $40,56 \pm 4,37$ para Ritger-Peppas e, 0,98 e $0,17 \pm 0,01$ para primeira ordem. Conforme apresentado, o modelo de primeira ordem se ajustou melhor aos dados experimentais sugerindo que as moléculas do β C encapsulado foram liberadas por difusão (GAONKAR et al., 2014). Tal fenômeno ocorre quando os coacervados complexos formam matrizes porosas solúveis que apresentam poros, e esses são preenchidos pelo solvente presente no ambiente circundante das MP- β C (BARBOSA; BASTOS; GARCIA-ROJAS, 2021; CONSTANTINO; GARCIA-ROJAS, 2022a). O mecanismo do processo de difusão do β C encapsulado ocorrem pelos poros, migrando do meio mais concentrado para o menos concentrado. De forma que, segundo Gaonkar et al. (2014), a medida que o gradiente de concentração no interior das microcápsulas diminui, a força motriz associada a liberação por difusão do bioativo também diminui.

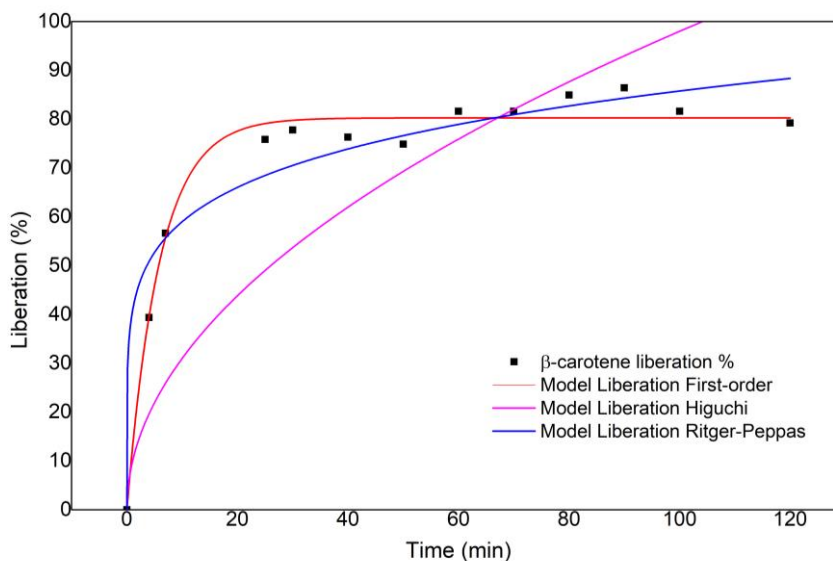


Figura 22. Modelos de ajuste de liberação de β -caroteno de biscoitos em simulações *in vitro* de digestão intestinal. As barras de erro representam \pm desvio padrão, $n = 2$.

3.2.7 Bioacessibilidade, biodisponibilidade efetiva e estabilidade do β C

Após a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* das microcápsulas, foi constatado β C encapsulado apresentou estabilidade de $73,33 \pm 2,84$ %, $32,78 \pm 1,44$ % de bioacessível, e $24,02 \pm 0,32$ % de biodisponibilidade efetiva. Estando esses resultados próximos aos relatados na literatura como Zhang, Zhang, McClements (2016) com nanoemulsões de β C usando alginato a 0,5 % apresentaram bioacessibilidade em 40 %, biodisponibilidade efetiva a 38 % e estabilidade de 94 %, e usando alginato a 1 % a bioacessibilidade foi de 38 % e biodisponibilidade efetiva em 34 % e estabilidade em 92 %. Os autores Salvia-Trujillo et al. (2013), relataram em seu estudo que β C solubilizados em óleos que são compostos de triglicédeos de cadeia média e longa em proporções iguais apresentam susceptibilidade de reduzir em até 50 % a bioacessibilidade do β C ao ser encapsulado. Assim com a estabilidade alcançada pela MP- β C de 73,33 % durante a processo digestivo *in vitro*, verifica-se que o β C foi disponibilizado nas misturas lipídicas, denominadas micelas, que podem contribuir *in vivo* para sua absorção pelo intestino delgado (ZHANG; ZHANG; MCCLEMENTS, 2016).

3.3 Enriquecimentos dos biscoitos com microcápsulas de β C

3.3.1 Biscoitos incorporados com microcápsulas de β C

Na Fig. 23 são apresentados os biscoitos formulados a partir das formulações apresentadas na Tabela 7. Os biscoitos escolhidos como modelo alimentar resultaram nas amostras sem traços do β C puro, com β C puro e com MP- β C. A amostra controle (Fig. 23A) apresentou coloração esbranquiçada e uma aparência volumosa em relação as outras amostras, uma textura firme e uma leve crocância. A amostra contendo β C puro (Fig. 23B) apresentou uma aparência menos volumosa que o controle e uma textura ressecada e crocância pronunciada. Sua coloração apresentou um leve avermelhado e com algumas pintas vermelhas distribuídas pelos biscoitos, devido a presença do β C em sua formulação que apresenta características hidrofóbicas (DROSOU; KROKIDA; BILIADERIS, 2022). A amostra contendo MP- β C (Fig. 23C) apresentou uma aparência menos volumosa que a amostra controle, assim como a amostra com β C puro, porém sua coloração demonstrou uma tonalidade amarelada suave, sua textura ficou levemente macia, e sua crocância não ficou tão pronunciada como nas amostras controle e com β C puro.

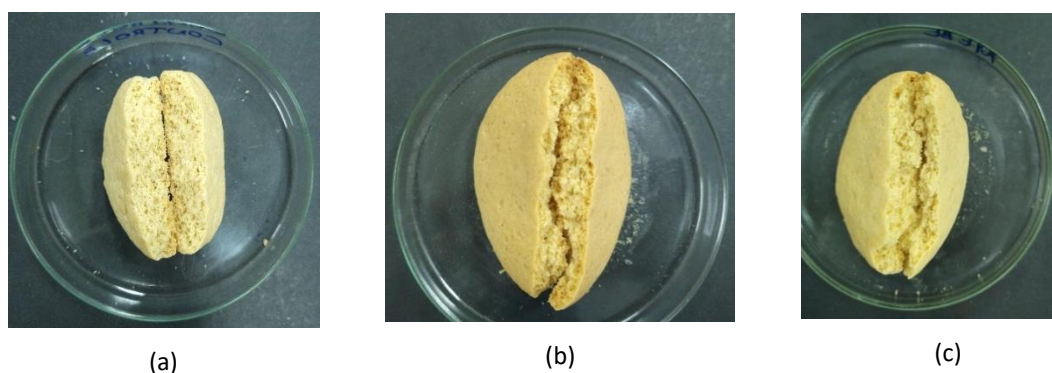


Figura 23. Biscoitos (a) sem β C livre ou encapsulado, e incorporados com (b) β C puro e (c) com MP- β C.

Tabela 7. Formulações dos biscoitos contendo/não contendo microcápsulas de β C.

Ingredientes	Controle (g)	MP- β C (g)	β C (g)
Farinha de trigo	22,322 \pm 0,003	22,098 \pm 0,002	22,320 \pm 0,003
Açúcar	10,000 \pm 0,002	10,000 \pm 0,003	10,000 \pm 0,002
Margarina	6,750 \pm 0,004	6,750 \pm 0,005	6,750 \pm 0,004
Bicarbonato de sódio	0,500 \pm 0,002	0,500 \pm 0,001	0,500 \pm 0,001
Sal	0,210 \pm 0,001	0,210 \pm 0,001	0,210 \pm 0,002

Tabela 7. Continuação

Água	3,560 ± 0,004	3,560 ± 0,004	3,560 ± 0,005
Microencapsulado de βC	---	0,224 ± 0,002	---
βC	---	---	0,0024 ± 0,004

Os resultados apresentados na coluna βC (g) são as médias ± desvio padrão.

3.3.2 Propriedades da atividade antioxidante de biscoitos incorporados com microcápsulas de βC

Os resultados do FRAP para o controle, βC puro e MP-βC foram $1,21 \pm 0,20$, $2,34 \pm 0,15$ e $2,71 \pm 0,21$ TE ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$), respectivamente. Para o ABTS^{•+} os resultados para o controle, βC puro e MP-βC foram $8,37 \pm 0,21$, $13,78 \pm 0,69$ e $23,15 \pm 0,94$ TE ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$), respectivamente. Com os resultados do FRAP e do ABTS^{•+}, podemos observar que a adição de MP-βC aos biscoitos promoveram aumento na atividade antioxidante, resultando em concentrações percentuais maiores ao comparar os resultados das amostras sem microcápsulas com as amostras contendo microcápsulas. Resultados semelhantes foram obtidos por Constantino, Garcia-Rojas (2022), ao aplicar microcápsulas de betanina em filmes de gelatina comestível.

Como visto anteriormente, o βC se apresenta uma elevada atividade antioxidante do grupo dos carotenoides, devido ao seu número elevado de insaturações conjugadas na estrutura molecular, em comparação com os demais compostos do mesmo grupo (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). Nesse sentido, os resultados sugerem que o βC microencapsulado manteve sua atividade antioxidante durante o processo de produção dos biscoitos.

4. CONCLUSÃO

No presente estudo, o βC foi microencapsulado através do processo de coacervação complexa usando OVA e NaAlg como materiais de parede. O uso do ultrassom na preparação das emulsões resultou em uma maior eficiência na formação dos complexos coacervados, podendo possibilitar também em menores gastos energéticos e custos operacionais. Foi constatada a alta afinidade entre OVA e NaAlg, em soluções com altas concentrações desses biopolímeros, pelo diagrama de fases dos complexos e a razão C/WM foi determinada pelo diagrama de fases dos sistemas

contendo microcápsulas. Na simulação gastrointestinal *in vitro*, a maior porcentagem da liberação de β C ocorreu na fase intestinal, atendendo ao objetivo proposto para o emprego deste bioativo que apresenta grande potencial antioxidante. Com a cinética de liberação do β C encapsulado, foi demonstrado que o modelo de primeira ordem é o mais adequado, demonstrando que o mecanismo de liberação do β C ocorre por difusão, demonstrando um estudo diferenciado em relação a outros trabalhos que estudaram a cinética de liberação do β C encapsulado com outras matrizes alimentares e por meio de outros métodos. Na aplicação das microcápsulas em biscoitos, foi constatado por análises das atividades antioxidantes, que o β C encapsulado presente nos biscoitos assados, demonstraram resistência à degradação térmica, mantendo as funcionalidades do β C, viabilizando a possibilidade de investimento em estudos no desenvolvimento de biscoitos fortificados com MP- β C.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. M. C. DE et al. Textural, Color, Hygroscopic, Lipid Oxidation, and Sensory Properties of Cookies Containing Free and Microencapsulated Chia Oil. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 5, p. 926–939, 2018.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 3. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006.

ARENAS-JAL, M.; SUÑÉ-NEGRE, J. M.; GARCÍA-MONTOYA, E. An overview of microencapsulation in the food industry: opportunities, challenges, and innovations. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 7, p. 1371–1382, 2020.

AZEREDO, H. M. C. DE. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alim. Nutr. Araraquara**, v. 16, n. 1, p. 89–97, 2005.

BAGHERI, L. et al. Spray-dried alginate microparticles carrying caffeine-loaded and potentially bioactive nanoparticles. **Food Research International**, v. 62, p. 1113–1119, 2014.

BARBOSA, A. E. G. et al. Encapsulation of sacha inchi oil in complex coacervates formed by carboxymethylcellulose and lactoferrin for controlled release of β -carotene. **Food Hydrocolloids for Health**, v. 2, n. November 2021, p. 100047, 2022.

BARBOSA, A. E. G.; BASTOS, L. P. H.; GARCIA-ROJAS, E. E. Complex Coacervates Formed between Whey Protein Isolate and Carboxymethylcellulose for Encapsulation of β -Carotene from Sacha Inchi Oil: Stability, In Vitro Digestion and Release Kinetics. **Food Biophysics**, 2021.

BARBOSA, C. M. DA S. et al. Microencapsulamento de hidrolisados de caseína em

liposferas para mascarar o sabor amargo: avaliação físico-química e sensorial. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 3, p. 361–374, 2002.

BASTOS, L. P. H. et al. Complex coacervates of β -lactoglobulin/sodium alginate for the microencapsulation of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil: Simulated gastrointestinal conditions and modeling release kinetics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 861–870, 2020a.

BASTOS, L. P. H. et al. Encapsulation of the black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil by lactoferrin-sodium alginate complex coacervates: Structural characterization and simulated gastrointestinal conditions. **Food Chemistry**, v. 316, n. January, p. 126345, 2020b.

BASTOS, L. P. H.; DE CARVALHO, C. W. P.; GARCIA-ROJAS, E. E. Formation and characterization of the complex coacervates obtained between lactoferrin and sodium alginate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 332–338, 2018.

BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. 4. ed. [s.l.] Springer, 2009.

BOKKHIM, H. et al. Interactions between different forms of bovine lactoferrin and sodium alginate affect the properties of their mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 38–46, 2015.

BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular basis of Ca^{2+} -induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1089–1096, 2001.

BRODKORB, A. et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.

CARMO, E. L. DO; FERNANDES, R. V. DE B.; BORGES, S. V. Microencapsulação por spray drying, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. **Journal of Chemical Engineering and Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 30–44, 2015.

CHATER, P. I. et al. Alginate as a protease inhibitor in vitro and in a model gut system; Selective inhibition of pepsin but not trypsin. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 142–151, 2015.

CONSTANTINO, A. B. T.; GARCIA-ROJAS, E. E. Vitamin D3 microcapsules formed by heteroprotein complexes obtained from amaranth protein isolates and lactoferrin: Formation, characterization, and bread fortification. **Food Hydrocolloids**, v. 129, n. October 2021, 2022a.

CONSTANTINO, A. B. T.; GARCIA-ROJAS, E. E. Food Hydrocolloids Microencapsulation of betanin by complex coacervation of carboxymethylcellulose and amaranth protein isolate for application in edible gelatin films. v. 133, n. May, 2022b.

CORREÂ-FILHO, L. C. et al. Microencapsulation of β -Carotene by Spray Drying: Effect of Wall Material Concentration and Drying Inlet Temperature. **International**

Journal of Food Science, v. 2019, 2019.

DIARRASSOUBA, F. et al. Self-assembly of β -lactoglobulin and egg white lysozyme as a potential carrier for nutraceuticals. **Food Chemistry**, v. 173, p. 203–209, 2015.

DIMA, C. et al. Bioavailability and bioaccessibility of food bioactive compounds; overview and assessment by in vitro methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 2862–2884, 2020.

DROSOU, C.; KROKIDA, M.; BILIADERIS, C. G. Food Hydrocolloids Encapsulation of β -carotene into food-grade nanofibers via coaxial electrospinning of hydrocolloids: Enhancement of oxidative stability and photoprotection. **Food Hydrocolloids**, v. 133, n. June, p. 107949, 2022.

ETCHEPARE, M. DE A. et al. Microencapsulação de probióticos utilizando alginato de sódio. **Ciencia Rural**, v. 45, n. 7, p. 1319–1326, 2015.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. The effect of the immobilisation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Milchwissenschaft**, v. 55, n. 9, p. 496–499, 2000.

FEDDAOUI, W. et al. Study of the complex coacervation mechanism between ovalbumin and the strong polyanion PSSNa: influence of temperature and pH. **European Biophysics Journal**, v. 48, n. 8, p. 803–811, 2019.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. A tecnologia da microencapsulação de ingredientes. **Food Ingredientes Brasil**, v. 19, n. 42, p. 18–24, 2017.

GAONKAR, A. et al. **Microencapsulation in the food industry: A practical implementation guide**. v. 53, 1. ed. [s.l.] Elsevier, 2014.

GARTI, N. **Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals**. Abington: Woodhead Publishing, 2008.

GARTI, N.; MCCLEMENTS, D. J. **Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals**. 239. ed. Philadelphia: Woodhead Publishing, 2012.

HABIBI, A. et al. Preparation of Fish Oil Microcapsules by Complex Coacervation of Gelatin–Gum Arabic and their Utilization for Fortification of Pomegranate Juice. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 2, p. 1–11, 2017.

HU, Q. et al. **In vitro digestion and cellular antioxidant activity of β -carotene-loaded emulsion stabilized by soy protein isolate-Pleurotus eryngii polysaccharide conjugates** **Food Hydrocolloids**, 2021.

HU, Y. T. et al. Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 1, p. 16–26, 2017.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**. Gold Book ed. [s.l.] IUPAC, 2014.

JAIN, A. et al. Microencapsulation by Complex Coacervation Using Whey Protein

Isolates and Gum Acacia: An Approach to Preserve the Functionality and Controlled Release of β -Carotene. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 8, p. 1635–1644, 2015.

JAIN, A. et al. Characterization of microcapsulated β -carotene formed by complex coacervation using casein and gum tragacanth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 101–113, 2016.

JANNASARI, N. et al. Microencapsulation of vitamin D using gelatin and cress seed mucilage: Production, characterization and in vivo study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 972–979, 2019.

JATO, JOSÉ LUIS VILA. **Tecnología Farmacéutica**. 1. ed. Madri, Espanha: Sintesis Editorial, 2001.

LAN, Y. et al. Phase behavior and complex coacervation of concentrated pea protein isolate-beet pectin solution. **Food Chemistry**, v. 307, n. June 2019, p. 125536, 2020.

LAN, Y. et al. Microencapsulation of hemp seed oil by pea protein isolate–sugar beet pectin complex coacervation: Influence of coacervation pH and wall/core ratio. **Food Hydrocolloids**, v. 113, n. October 2020, p. 106423, 2021.

LAN, Y.; CHEN, B.; RAO, J. Pea protein isolate–high methoxyl pectin soluble complexes for improving pea protein functionality: Effect of pH, biopolymer ratio and concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 80, p. 245–253, 2018.

LEITE, B. S. F. et al. Revestimento comestível à base de goma xantana, compostos lipofílicos e/ou cloreto de cálcio na conservação de morangos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 4, p. 1027–1036, 2015.

LIU, W. et al. Encapsulation of β -carotene-loaded oil droplets in caseinate/alginate microparticles: Enhancement of carotenoid stability and bioaccessibility. **Journal of Functional Foods**, v. 40, n. November 2017, p. 527–535, 2018.

LIU, Y. et al. Investigation into the bioaccessibility and microstructure changes of β -carotene emulsions during in vitro digestion. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 15, p. 86–95, 2012.

MATALANIS, A.; MCCLEMENTS, D. J. Hydrogel microspheres for encapsulation of lipophilic components: Optimization of fabrication & performance. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 1, p. 15–25, 2013.

MCCLEMENTS, D. J. **Nanoparticle- and microparticle-based delivery systems: Encapsulation, protection and release of active compounds**. 1. ed. New York: CRC Press, 2015.

MEHRAN, M.; MASOUM, S.; MEMARZADEH, M. Microencapsulation of *Mentha spicata* essential oil by spray drying: Optimization, characterization, release kinetics of essential oil from microcapsules in food models. **Industrial Crops and Products**, v. 154, n. June, p. 112694, 2020.

MENEZES, C. R. DE et al. Microencapsulação de probióticos : avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1309–1316, 2013.

MIHALCEA, L. et al. Encapsulation of carotenoids from sea buckthorn extracted by CO₂ supercritical fluids method within whey proteins isolates matrices. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 42, n. April, p. 120–129, 2017.

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

NASCIMENTO, L. D. DO et al. MICROENCAPSULAMENTO DE ÓLEOS ESSENCIAIS: CONCEITOS E APLICAÇÕES. In: **A Produção do Conhecimento na Engenharia Química**. [s.l.] Atena Editora, 2019. p. 22–35.

NIU, F. et al. **Ovalbumin-gum arabic interactions: Effect of pH, temperature, salt, biopolymers ratio and total concentration** **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2014.

NO, J.; SHIN, M.; MUN, S. Preparation of functional rice cake by using β -carotene-loaded emulsion powder. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 12, p. 4514–4523, 2020.

OLIVEIRA, A. P. H. DE et al. Combined adjustment of pH and ultrasound treatments modify techno-functionalities of pea protein concentrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 603, n. June, 2020.

OZKAN, G. et al. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. **Food Chemistry**, v. 272, n. July 2018, p. 494–506, 2019.

PAMIES, R. et al. The influence of mono and divalent cations on dilute and non-dilute aqueous solutions of sodium alginates. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 1, p. 248–253, 2010.

PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of Hydrocolloids: Second Edition**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2009.

PILLAI, P. K. S.; GULDIKEN, B.; NICKERSON, M. T. Complex coacervation of pea albumin-pectin and ovalbumin-pectin assessed by isothermal titration calorimeter and turbidimetry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 3, p. 1209–1217, 2021.

PINGRET, D.; FABIANO-TIXIER, A. S.; CHEMAT, F. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 593–606, 2013.

RABELLO, F. DE F. P. Microencapsulação de ingredientes alimentícios - Revisão. **Revista Agrogeoambiental**, p. 134–144, 2009.

RABELO, R. S. et al. Complexation of chitosan with gum Arabic, sodium alginate and κ -carrageenan: Effects of pH, polymer ratio and salt concentration. **Carbohydrate**

Polymers, v. 223, n. March, 2019.

RAO, S. et al. Characterization of ovalbumin-carvacrol inclusion complexes as delivery systems with antibacterial application. **Food Hydrocolloids**, v. 105, n. January, p. 1–7, 2020.

REBELLO, F. D. F. P. Novas tecnologias aplicadas às embalagens de alimentos. **Revista Agrogeoambiental**, v. 1, n. 3, 2009.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids-A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 7, p. 726–740, 2010.

RUFINO, M. DO S. et al. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado Técnico, 128 Embrapa**, p. 0–3, 2007.

RUFINO, M. DO S. M. et al. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado Técnico, 125 Embrapa**, p. 3–6, 2006.

RUTZ, J. K. et al. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. **Food Chemistry**, v. 202, p. 324–333, 2016.

RUTZ, J. K. et al. Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. **Food Chemistry**, v. 220, p. 59–66, 2017.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Modulating β -carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 878–884, 2013.

SANTOS, M. B.; CARVALHO, C. W. P. DE; GARCIA-ROJAS, E. E. Microencapsulation of vitamin D3 by complex coacervation using carboxymethyl tara gum (*Caesalpinia spinosa*) and gelatin A. **Food Chemistry**, v. 343, 2021a.

SANTOS, M. B.; CARVALHO, M. G. DE; GARCIA-ROJAS, E. E. Carboxymethyl tara gum-lactoferrin complex coacervates as carriers for vitamin D3: Encapsulation and controlled release. **Food Hydrocolloids**, v. 112, n. September 2020, 2021b.

SANTOS, M. B.; COSTA, A. R. DA; GARCIA-ROJAS, E. E. Heteroprotein complex coacervates of ovalbumin and lysozyme: Formation and thermodynamic characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1323–1329, 2018.

SANTOS, M. B.; DE CARVALHO, C. W. P.; GARCIA-ROJAS, E. E. Heteroprotein complex formation of bovine serum albumin and lysozyme: Structure and thermal stability. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 267–274, 2018.

SERVAT, L. et al. Microencapsulação: uma Alternativa Promissora para a Preservação de Produtos Naturais. **Revista Fitos**, v. 5, n. 2, p. 52–57, 2010.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64,

n. SUPPL., p. 163–174, 2012.

SILVA, P. T. DA et al. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1304–1311, 2014.

SILVA, P. T. DA et al. Microencapsulação de probióticos por spray drying: Avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. **Ciencia Rural**, v. 45, n. 7, p. 1342–1347, 2015a.

SILVA, T. M. DA et al. Coacervação complexa : uma técnica para a encapsulação de probióticos Complex coacervation : a technique for encapsulation of probiotics. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 49–55, 2015b.

SILVA, T. M. DA et al. Development, characterization and viability study of probiotic microcapsules produced by complex coacervation followed by freeze-drying. **Ciencia Rural**, v. 49, n. 7, 2019.

SILVA, E. K. et al. Ultrasound-assisted formation of annatto seed oil emulsions stabilized by biopolymers. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 1–13, 2015c.

SINGH, J.; VENNAPUSA, J. R.; CHATTOPADHYAY, S. Protein-polysaccharide based microencapsulated phase change material composites for thermal energy storage. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, n. November 2019, p. 1–11, 2020.

SOARES, B. DA S. et al. Microencapsulation of sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.) using complex coacervation: Formation and structural characterization. **Food Chemistry**, v. 298, 2019.

SOARES, B. DA S.; CARVALHO, C. W. P. DE; GARCIA-ROJAS, E. E. Microencapsulation of Sacha Inchi Oil by Complex Coacervates using Ovalbumin-Tannic Acid and Pectin as Wall Materials. **Food and Bioprocess Technology**, p. 817–830, 2021.

SOUZA, A. L. R. et al. Microencapsulação de Sucos e Polpas de Frutas por Spray Drying: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 3, p. 327–338, 2015.

SOUZA, C. J. F. et al. Interpolymer complexation of egg white proteins and carrageenan: Phase behavior, thermodynamics and rheological properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 467–475, 2018.

SOUZA, C. J. F.; GARCIA-ROJAS, E. E. Effects of salt and protein concentrations on the association and dissociation of ovalbumin-pectin complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 124–129, 2015.

SPONTON, O. E.; PEREZ, A. A.; SANTIAGO, L. G. Protein-polysaccharide associative phase separation applied to obtain a linoleic acid dried ingredient. **Food Hydrocolloids**, v. 71, p. 158–167, 2017.

SRIVASTAVA, S.; MISHRA, H. N. Development of microencapsulated vegetable oil

powder based cookies and study of its physicochemical properties and storage stability. **Lwt**, v. 152, n. April, p. 112364, 2021.

STRUGALA, V. et al. Inhibition of pepsin activity by alginates in vitro and the effect of epimerization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 304, n. 1–2, p. 40–50, 2005.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v. 7, n. July, p. 12–20, 2006.

TAN, Y. et al. Factors impacting lipid digestion and β -carotene bioaccessibility assessed by standardized gastrointestinal model (INFOGEST): Oil droplet concentration. **Food and Function**, v. 11, n. 8, p. 7126–7137, 2020.

TANG, Y.; SCHER, H. B.; JEOH, T. Industrially scalable complex coacervation process to microencapsulate food ingredients. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 59, n. June 2019, 2020.

THAKUR, D. et al. Microencapsulation of β -Carotene Based on Casein/Guar Gum Blend Using Zeta Potential-Yield Stress Phenomenon: an Approach to Enhance Photo-stability and Retention of Functionality. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 5, p. 1447–1459, 2017.

TIAN, Y. et al. Preparation and characterization of gelatin-sodium alginate/paraffin phase change microcapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 586, n. September 2019, 2020.

TIMILSENA, Y. P. et al. Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 347–357, 2016.

VENTURINI, L. H. et al. Partial Substitution of Margarine by Microencapsulated Chia Seeds Oil in the Formulation of Cookies. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 1, p. 77–87, 2019.

VICENTE, J. et al. Microencapsulation of sacha inchi oil using emulsion-based delivery systems. **Food Research International**, v. 99, n. June, p. 612–622, 2017.

XIE, H. et al. Fabrication of PGFE/CN-stabilized β -carotene-loaded peppermint oil nanoemulsions: Storage stability, rheological behavior and intelligent sensory analyses. **Lwt**, v. 138, n. December 2020, 2021.

XIONG, W. et al. Ovalbumin-chitosan complex coacervation: Phase behavior, thermodynamic and rheological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 895–902, 2016.

XIONG, W. et al. Complex coacervation of ovalbumin-carboxymethylcellulose assessed by isothermal titration calorimeter and rheology: Effect of ionic strength and charge density of polysaccharide. **Food Hydrocolloids**, v. 73, p. 41–50, 2017.

YAMASAKI, M.; TAKAHASHI, N.; HIROSE, M. Crystal structure of S-ovalbumin as

- a non-loop-inserted thermostabilized serpin form. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 37, p. 35524–35530, 2003.
- YEUNG, T. W. et al. Microencapsulation in alginate and chitosan microgels to enhance viability of *Bifidobacterium longum* for oral delivery. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 1–11, 2016.
- ZAPATA, A. M. O.; ARANGO, F. O. D.; RODRÍGUEZ-BARONA, S. Evaluation of probiotic microencapsulation in a prebiotic mixture with coffee extract. **Coffee Science**, v. 14, n. 3, p. 394–406, 2019.
- ZHANG, H. et al. Development of double layer microcapsules for enhancing the viability of *Lactobacillus casei* LC2W in simulated gastrointestinal fluids. **Lwt**, v. 145, n. March, 2021a.
- ZHANG, H. H. et al. Interaction between ovalbumin and pectin and coacervate characterization. **Colloid and Polymer Science**, 2021b.
- ZHANG, K. et al. **Synthesis and release studies of microalgal oil-containing microcapsules prepared by complex coacervation** **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2012.
- ZHANG, L. et al. Impact of trehalose on physicochemical stability of β -carotene high loaded microcapsules fabricated by wet-milling coupled with spray drying. **Food Hydrocolloids**, v. 121, n. 17, 2021c.
- ZHANG, R. et al. Encapsulation of β -carotene in Nanoemulsion-Based Delivery Systems Formed by Spontaneous Emulsification: Influence of Lipid Composition on Stability and Bioaccessibility. **Food Biophysics**, v. 11, n. 2, p. 154–164, 2016.
- ZHANG, R. et al. Microencapsulation of anthocyanins extracted from grape skin by emulsification/internal gelation followed by spray/freeze-drying techniques: Characterization, stability and bioaccessibility. **Lwt**, v. 123, n. September 2019, p. 109097, 2020.
- ZHANG, Z. et al. Encapsulation of *Bifidobacterium* in alginate microgels improves viability and targeted gut release. **Food Hydrocolloids**, v. 116, n. December 2020, p. 106634, 2021d.
- ZHANG, Z.; ZHANG, R.; MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation of β -carotene in alginate-based hydrogel beads: Impact on physicochemical stability and bioaccessibility. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 1–10, 2016.
- ZHENG, J. et al. Heteroprotein complex formation of soy protein isolate and lactoferrin: Thermodynamic formation mechanism and morphologic structure. **Food Hydrocolloids**, v. 100, n. October 2019, 2020.
- ZOU, W. et al. Phase separation behavior and characterization of ovalbumin and propylene glycol alginate complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 108, n. May, p. 105978, 2020.