

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

DISSERTAÇÃO

**PROCESSO DE COACERVAÇÃO COMPLEXA EMPREGANDO
BIOPOLÍMEROS COMO SISTEMA DE CARREAMENTO DO ÁCIDO
TÂNICO**

Clyselen Stefane Fernandes de Souza

2022



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

**PROCESSO DE COACERVAÇÃO COMPLEXA EMPREGANDO
BIOPOLÍMEROS COMO SISTEMA DE CARREAMENTO DO ÁCIDO
TÂNICO**

CLYSELEN STEFAN FERNANDES DE SOUZA

Sob a Orientação do Professor
Prof. Dr. Edwin Elard Garcia Rojas

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

Seropédica, RJ

Fevereiro, 2022

S729p

Souza, Clyselen Stefane Fernandes de, 1994-
PROCESSO DE COACERVAÇÃO COMPLEXA EMPREGANDO
BIOPOLÍMEROS COMO SISTEMA DE CARREAMENTO DO ÁCIDO
TÂNICO / Clyselen Stefane Fernandes de Souza. - Volta
Redonda, 2022.
50 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. Microencapsuação. 2. Composto fenólico. 3. Ácido
tânico. 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 apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior-Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.



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

TERMO Nº 146/2022 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.010773/2022-41

Seropédica-RJ, 18 de fevereiro de 2022.

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

CLYSELEN STEFANE FERNANDES DE SOUZA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, no Programa de Pós Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 03 /02/2022

Dr. EDWIN ELARD GARCIA ROJAS, UFF
(orientador)

Dra. MONIQUE BARRETO SANTOS, EMBRAPA

Dra. RENATA VALERIANO TONON,
EMBRAPA

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG.

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 18/02/2022 11:10)

RENATA VALERIANO TONON
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 303.957.418-31

(Assinado digitalmente em 18/02/2022 15:39)

MONIQUE BARRETO SANTOS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 124.432.767-08

(Assinado digitalmente em 08/03/2022 09:12)

EDWIN ELARD GARCIA ROJAS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 014.548.996-54

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **146**, ano: **2022**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **18/02/2022** e o código de verificação: **1666ad6ca0**

RESUMO

De SOUZA, Clyselene Stefane Fernandes. **Processo de coacervação complexa empregando biopolímeros como sistema de carregamento do ácido tânico**. 2021, 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

O ácido tânico (AT) pertence a um grupo de taninos hidrolisáveis e possui funcionalidades biológicas importantes como a capacidade antioxidante, eliminação de radicais e propriedades antimutagênicas. Estudos demonstram que ácido tânico pode ser utilizado como um inibidor natural das enzimas β -secretase e α -amilase, reduzindo a magnitude das respostas pós-prandiais de glicose e insulina aos carboidratos da dieta, ajudando a prevenir ou mitigar diabetes tipo 2 e obesidade. Nesse sentido, a microencapsulação entra como uma alternativa para a liberação controlada do ácido tânico no organismo, fazendo com que tenha AT disponível para agir no meio. Este trabalho teve como objetivo propor uma alternativa viável e promissora de microencapsular o AT, protegendo e controlando a sua liberação, mediante a formação emulsões duplas do tipo água/óleo/água contendo como material de parede a Lactoferrina (Lf) e Pectina (Pec) complexada. Para tal, as microcápsulas foram caracterizadas físico-quimicamente e a sua estabilidade foi avaliada sob alta temperatura (80°C), diferentes pH, assim como no sistema digestivo simulado. Os resultados mostraram que as condições ideais para a formação dos complexos foram encontrados no pH 5,5 e na razão 10:1 de proteína:polissacarídeo. A eficiência de encapsulamento (EE) foi determinada em função da concentração total de biopolímeros e da razão núcleo-parede, sendo a maior EE (~ 91,71%) alcançada com 0,5% de concentração de biopolímeros em uma razão de 1:0,15. As microcápsulas foram estáveis à floculação quando aquecidas a 80 °C por 2 h e a simulação *in vitro* demonstrou que o AT foi protegido no sistema gástrico e sua bioacessibilidade foi controlada e mais acentuada no intestino delgado (38%). Logo, as microcápsulas formadas são um sistema eficaz de encapsulação e entrega controlada de polifenóis hidrofílicos.

Palavras chave: Lactoferrina; composto fenólico; pectina; simulação gastrointestinal

ABSTRACT

De SOUZA, Clyselene Stefane Fernandes. **Complex coacervation process using biopolymers as delivery system of tannic acid**. 2021, 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Tannic acid belongs to a group of hydrolyzable tannins and has important biological functionalities such as antioxidant capacity, radical scavenging and antimutagenic properties. Studies show that tannic acid can be used as a natural inhibitor of β -secretase and α -amylase enzymes, reducing the magnitude of postprandial glucose and insulin responses to dietary carbohydrates and decreasing the absorption of carbohydrate intake, helping to prevent or mitigate type 2 diabetes and obesity. In this sense, microencapsulation is an alternative for the controlled release of tannic acid. This work aimed to propose a viable and promising alternative to microencapsulate TA, protecting and controlling its release, through the formation of emulsions of the type water/oil/water containing Lactoferrin (Lf) and Pectin (Pec) complexed. For that, the microcapsules were physicochemically characterized and their stability was evaluated under high temperature (80°C), different pH, as well as in the simulated digestive system. The results showed that the ideal conditions for the formation of complexes were found at pH 5.5 and 10:1 ratio. The encapsulation efficiency (EE) was determined as a function of the total biopolymer concentration and the core-wall ratio, and the highest EE (~ 91.71%) was achieved with 0.5% biopolymer concentration at a ratio of 1 :0.15. The microcapsules were stable to flocculation when heated at 80 °C for 2 h and the in vitro simulation showed that AT was protected in the gastric system and its bioaccessibility was controlled and more pronounced in the small intestine (38%). Therefore, the microparticles formed are an effective encapsulation and controlled delivery system of hydrophilic polyphenols in nutraceuticals, supplements or pharmaceutical formulations.

Keywords: Lactoferrin; phenolic compound; pectin; gastrointestinal simulation

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do ácido tânico.....	5
Figura 2: Estrutura tridimensional da lactoferrina	9
Figura 3: Estrutura química da pectina	11
Figura 4: (A) Os potenciais $-\zeta$ e o SEI para o sistema de Lf/Pec, (B) O potencial ζ das diferentes razões entre Lf/Pec no pH fixado em 5,5 e (C) Turbidez (100 - %T) em pH fixo (5,50) dos biopolímeros Lf, Pec e dos sistemas Lf:Pec em diferentes razões.....	19
Figura 5: Microscopia óptica das emulsões para a formação da microcápsula (amostra S5). (A) é a emulsão primária (A_1/O), (B) Emulsão dupla ($A_1/O/A_2$) após coacervação complexa no pH 5,5 e sem adição de TGase, (C) Emulsão dupla com adição de TGase.....	20
Figura 6: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) de Pec, Lf, óleo de soja, AT e microcápsula (amostra S5).....	22
Figura 7: Estabilidade das microcápsulas (S5), (A) sob diferentes pH's e (B) a 80 °C em diferentes tempos (min).....	24
Figura 8: Atividade antioxidante do AT contido nas microcápsulas (S5) onde (A) eliminação de radicais referente ao ABTS e (B) ao DPPH, ambos com ácido tânico livre em diferentes concentrações; (C) atividade de eliminação de radicais (ABTS e DPPH) com ácido tânico microencapsulado em diferentes concentrações.....	25
Figura 9: Liberação do AT contido nas microcápsulas (amostra S5) durante a digestão in vitro.....	26

INDICE DE TABELAS

Tabela 1	Principais métodos utilizados no encapsulamento de diferentes ingredientes ativos.	6
Tabela 2	Microencapsulação de diferentes ingredientes ativos pelo processo de coacervação complexa.	10
Tabela 3	Composição de material de parede e núcleo das diferentes condições estudadas para o cálculo da eficiência de encapsulamento na fabricação das microcápsulas.	21
Tabela 4	Estudo da estabilidade das microcápsulas (S5) em diferentes condições de pH, tempo e temperatura.	22

SÍMBOLOS

ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ABTS ^{•+}	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico na forma de radical)
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DPPH [•]	2,2-difenil-1-picril-hidrazila na forma de radical
HCl	Ácido clorídrico
AT	Ácido tânico
EE (%)	Eficiência de Encapsulação
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
SEI	Força da interação eletrostática
NaOH	Hidróxido de sódio
kDa	Kilodaltons
Lf	Lactoferrina
Pec	Pectina
PGPR	Poliricineolato de poliglicerol
pI	Ponto isoelétrico
Potencial- ζ	Potencial zeta
A ₁ /O	Sistema água em óleo
A ₁ /O/A ₂	Sistema água, óleo, água
SIF	Sistemas simulados de fluido intestinal
SSF	Sistemas simulados de saliva
SGF	Sistemas simulados de suco gástrico
TGase	Transglutaminase
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Objetivo Geral.....	3
1.2	Objetivos Específicos.....	3
2.1	Compostos Bioativos	4
2.1.1	Ácido tânico	4
2.2	Microencapsulação.....	5
2.2.1	Métodos para microencapsulação	6
2.2.2	Materiais de parede	8
2.3	Simulação Gastrointestinal e Bioacessibilidade.....	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1	Materiais.....	13
3.2	Formação do Complexo Lf:Pec Empregado como Material de Parede	13
3.2.1	Preparo das soluções	13
3.2.2	Potencial Zeta.....	13
3.2.3	Análise turbidimétrica.....	13
3.3	Fabricação das Microcápsulas Contendo Ácido Tânico	14
3.3.1	Eficiência de encapsulação	14
3.3.2	Determinação da concentração de fenólicos totais	14
3.4	Caracterização das Microcapsulas Carreadoras do AT.....	15
3.4.1	Avaliação da capacidade antioxidante das microcápsulas.....	15
3.4.2	Estabilidade ambiental as microcápsulas contendo AT.....	15
3.4.3	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	15
3.4.4	Microscopia Óptica	16
3.5	Simulação da Digestão Gastrointestinal <i>in vitro</i>	16
3.5.1	Simulação da digestão – Fase oral	16
3.5.2	Simulação da digestão – Fase gástrica.....	16
3.5.3	Simulação da digestão – Fase intestinal.....	16
3.6	Bioacessibilidade.....	16
3.7	Análises Estatística.....	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1	Efeito do pH e da Razão Entre Proteína:Polissacarídeo para a Formação do Complexo	18

4.2 Eficiência de Encapsulação nas Microcápsulas de AT	19
4.3 Caracterização das Microcápsulas	20
4.3.1 Espectrometria FT-IR microcápsulas.....	20
4.3.2 Análise de estabilidade das microcápsulas carreadoras de AT.....	22
4.3.3 Análise de atividade antioxidante (ABTS e DPPH) microcápsulas carreadoras de AT	24
4.4 Simulação da Digestão Gastrointestinal das Microcápsulas de AT e Biodisponibilidade.....	25
5 CONCLUSÃO	27
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1 INTRODUÇÃO

O ácido tânico (AT) é um polifenol, hidrofílico, que está naturalmente presente em muitas plantas. Geralmente é considerado uma glicose decagaloíla, mas pode ter diferentes números de grupos galoíla ligados à unidade central de glicose, dependendo da natureza da planta em que foi isolada (LOPES, SCHULMAN e HERMES-LIMA, 1999) podendo ser encontrado junto com outros taninos condensados em vários alimentos como chá preto, chá verde, uvas, peras, bananas, sorgo, feijão-fradinho (CHUNG et al., 1998, KING e YOUNG, 1999). O grande número de grupos hidroxila no AT é a base de muitas de suas propriedades físico-químicas e biológicas (MUELLER-HARVEY, 2001) como atividade antioxidante (BRAIDY et al., 2017), inibição da agregação de peptídeos amilóides (SOYOCAR et al., 2019), atividade anti-inflamatória (LENGERT et al., 2021) e propriedades anticarcinogênicas (KIM et al., 2019). Outra propriedade funcional muito interessante, do ponto de vista da aplicação em alimentos, é a sua capacidade de inibir enzimas digestivas (como a α -amilase), reduzindo a magnitude das respostas pós-prandiais de glicose e insulina aos carboidratos da dieta, diminuindo a absorção da ingestão de carboidratos, dessa forma, suas aplicações podem contribuir no tratamento do diabetes e da obesidade (ZHAO et al., 2013).

Por muitos anos, as indústrias farmacêutica e alimentícia têm usado o processo de microencapsulação com diferentes intuitos, seja para proteger ingredientes sensíveis de condições ambientais, como para obter a liberação controlada e direcionada de ingredientes ativos (GAONKAR et al., 2014). Existem alguns métodos que são empregados na sua produção, como por exemplo, a emulsificação (SHAH, XU e MRÁZ, 2021), spray drying (NKURUNZIZA et al., 2021) e coacervação complexa (LI, WANG e MEI, 2021). A coacervação complexa ocorre quando interações eletrostáticas são estabelecidas entre cargas opostas de hidrocolóides em meio aquoso e há um equilíbrio eletrostático na fase concentrada resultando na separação da fase líquido-líquido. Este processo já foi utilizado para encapsular diversos ingredientes ativos e devido a sua flexibilidade na formulação de alimentos sob medida, principalmente, no encapsulamento de bioativos, este pode ser utilizado nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (TIMILSENA HAQUE e ADHIKARI, 2020).

Os materiais de parede usualmente utilizados para a coacervação são biopolímeros como proteínas e/ou polissacarídeos. A lactoferrina é uma glicoproteína da família das transferrinas (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012) e é utilizada em diversos estudos relacionados a coacervação complexa com outros polímeros, bem como na formação de microcápsulas (KILIC et al., 2017; ZHAO et al., 2020). A pectina, por sua vez, é um polissacarídeo composto por uma cadeia linear de unidades de ácido galacturônico unidas por ligações α -1,4 em que os grupos carboxílicos do ácido galacturônico podem estar esterificados por grupamentos metil (YAPO, 2011). Devido as suas características de gelificação, bioadesividade, biocompatibilidade, não toxicidade e proteção contra a ação de algumas enzimas digestivas a pectina é um polímero promissor para uso na indústria nutracêutica e farmacêutica (ESPINAL-RUIZ et al., 2016; PETKOWICZ, VRIESMANN e WILLIAMS, 2017).

No processo de microencapsulação, a coacervação, apesar de ser um método conhecido por sua simplicidade, baixo custo e reprodutibilidade, possui também algumas limitações, pois há a dificuldade em encapsular compostos hidrofílicos, sendo uma técnica mais adequada para os hidrofóbicos. Para encapsular compostos hidrofílicos, surge-se então a necessidade de fazer ajustes na metodologia, como por exemplo, incluir o processo de emulsificação dupla (FRAJ et al., 2021).

Emulsões duplas são sistemas de dispersão de líquidos complexos, que consistem em pequenas gotículas de água contidas em gotículas de óleo maiores que são dispersas em uma fase contínua de água produzindo emulsões do tipo água/óleo/água ($A_1/O/A_2$) (DIMA e DIMA, 2020; BUYUKKESTELLI e El, 2019; MATOS et al., 2018). Nessas emulsões, a fase aquosa interna (A_1) pode atuar como um transportador de uma variedade de compostos bioativos hidrofílicos como, por exemplo, os corantes, vitaminas, enzimas, polifenóis e outros (COSTA et al., 2020; KANHA et al., 2020; FRAJ et al., 2021; VELDERRAIN-RODRÍGUEZ et al., 2019).

Desta forma, este trabalho busca adicionar um valor agregado ao ácido tânico através da técnica de microencapsulamento, para futuras aplicações na indústria de alimentos ou farmacêutica.

1.1 Objetivo Geral

Estudar o processo de coacervação complexa para encapsulamento do ácido tânico através da técnica de emulsão dupla, utilizando como material de parede os biopolímeros, lactoferrina e pectina.

1.2 Objetivos Específicos

- Estudar a formação e caracterizar os complexos coacervados formados entre lactoferrina e pectina;
- Encapsular o ácido tânico por coacervação complexa empregando os biopolímeros lactoferrina:pectina como materiais de parede, caracterizar as cápsulas obtidas;
- Estudar a simulação gastrointestinal do encapsulado de ácido tânico por coacervação complexa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Compostos Bioativos

Os compostos bioativos (óleos essenciais, vitaminas, minerais, polifenóis, carotenoides e outros compostos) são as substâncias obtidas de frutas, vegetais, óleos, legumes, nozes e fontes animais que apresentam benefícios a saúde através de atividades celulares e atividades fisiológicas (WEI e HUANG, 2019). Alguns desses compostos bioativos podem auxiliar na prevenção de doenças e/ou cura de doenças metabólicas, infecções do trato urinário, úlceras estomacais e doenças dentárias, bem como várias formas de câncer (SHISHIR et al., 2018).

Os compostos fenólicos são compostos bioativos que tem sido amplamente estudado (BERMÚDEZ-SOTO, TOMÁS-BARBERÁN e GARCÍA-CONESA, 2007; JARA-PALACIOS et al., 2018), pois constituem um dos grupos mais numerosos e onipresentes de metabólitos vegetais. São parte integrante da dieta humana e animais que possuem um alto espectro de atividades biológicas, incluindo funções antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, antivirais e imunomoduladoras (LI, BAO e CHEN, 2018). Para a incorporação bem-sucedida nos vários sistemas alimentares, a estabilidade dos compostos bioativos é um parâmetro importante, com isso a técnica de encapsulamento surge como uma tecnologia promissora para atingir esse objetivo (CANIZALES et al., 2018).

Há pesquisadores que apontam a microencapsulação como uma técnica para melhorar a biodisponibilidade e a estabilidade dos compostos fenólicos (YINBIN et al., 2018). Este mesmo grupo de pesquisa microencapsulou fenólico de ameixa (*Prunus salicina lindl.*) usando como material de parede maltodextrina com diferentes polissacarídeos (goma arábica e quitosana) e obteve bons resultados quanto a estabilidade e biodisponibilidade.

2.1.1 Ácido tânico

O ácido tânico (AT) é um composto fenólico, hidrofílico, que pertence a um grupo de taninos hidrolisáveis e contém grupos éster ligados a um núcleo de glicose (KIM et al., 2010). A Figura 1 apresenta a estrutura química do ácido tânico. O AT possui uma massa molecular de 1701,206 (g/mol) contendo galotanino, ácido trigálico, ácido mdigálico e ácido gálico. É encontrado em vegetais, frutas e bebidas, como folhas de chá, folhas de goiaba, uvas, vinho tinto e banana. AT exibe vários potenciais terapêuticos por meio de várias propriedades biológicas como antioxidantes (BRAIDY et al., 2017), anti-inflamatórios (LUDUVICO et al., 2020), inibidores da agregação de peptídeos amiloides (SOYOCÁK et al., 2019) e anticâncer (KIM et al., 2019, NIE et al., 2016, SP et al., 2020) Além disso, verificou-se que o AT tem o potencial de se ligar ao ferro não ligado a transferrina (NTBI), levando à prevenção de efeitos adversos induzidos por NTBI (PHIWCHAI et al., 2018, SAHINER, 2021). Com base em estudos epidemiológicos e ensaios *in vitro*, o AT possui funcionalidade biológica, incluindo capacidade antioxidante, eliminação de radicais e propriedades antimutagênicas (LI et al., 2012). Um estudo mostrou que o ácido tânico poderia ser usado como um inibidor natural da β -

secretase para impedir o comprometimento cognitivo e mitigar a patologia semelhante à doença de Alzheimer em camundongos transgênicos, o que tem implicações empolgantes para a comunidade médica (MORI et al., 2012).

As propriedades do AT quando ligados a proteínas e enzimas digestivas apontam que há redução da digestibilidade e o valor nutricional de alguns alimentos (TUCCI, BOYLAND e HALFORD, 2010). Assim, o AT poderia ser empregado para inibir enzimas digestivas (como α -amilase) para reduzir a magnitude das respostas pós-prandiais de glicose e insulina aos carboidratos da dieta e diminuir a absorção de carboidratos. Poderiam assim, ajudar prevenir ou mitigar diabetes tipo 2 e obesidade (ZHAO et al., 2013).

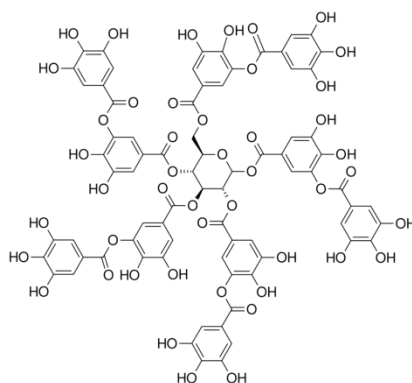


Figura 1: Estrutura química do ácido tânico.

Fonte: HUANG et al., 2019.

2.2 Microencapsulação

A microencapsulação consiste no processo de aprisionamento de um ingrediente ativo definido como núcleo (material encapsulado) que preenche a fase interna da microcápsula (BAKRY et al., 2016). Ela permite proteger substâncias sensíveis do ambiente externo, possibilita um sistema de carregamento (GHOSH, 2006; KAUR, 2014), tem a capacidade de modificar e melhorar a aparência de um composto, pode evitar a reação do agente encapsulado com o ambiente externo, promover a liberação controlada do material ativo, diminuir a velocidade de difusão do agente ativo do interior da célula para o meio, mascarar odores e sabores desagradáveis (SHAHIDI e HAN, 1993). No que se refere a construção de um sistema de carregamento, é feito um planejamento para liberar o núcleo, pois pode ter diferentes mecanismos físico-químicos para a liberação do mesmo no local desejado. Essa liberação direcionada busca a entrega do ingrediente alimentar em um estágio específico de processamento ou armazenamento, no estágio específico de consumo ou em um local específico dentro do corpo, seja na boca, estômago, intestino delgado ou cólon, por exemplo. Esses mecanismos de liberação podem ocorrer por difusão, fragmentação, dissolução e inchamento (FATHI, MARTÍN e McCLEMENTS, 2014; GAONKAR et al., 2014). Existem diversos estudos empregando diferentes técnicas de microencapsulação a fim de proteger diferentes ingredientes ativos, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Principais métodos utilizados no encapsulamento de diferentes ingredientes ativos.

Método de microencapsulação	Ingrediente ativo	Referência
Coacervação complexa	Vitamina D ₃	SANTOS, DE CARVALHO e GARCIA-ROJAS, 2021
Coacervação complexa	Licopeno	NEAGU et al., 2020
Emulsão A/O	<i>Lactobacillus plantarum</i>	QUINTANA et al., 2021
Coacervação complexa	Óleo essencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	HERNÁNDEZ-NAVA et al., 2020
Emulsão dupla A/O/A	Ácido ascórbico	KHEYNOOR et al., 2018
Spray drying	Ômega 3	CASTEJÓN, LUNA e SEÑORÁNS, 2021
Spray drying	Zinco	POLEKKAD et al., 2021

2.2.1 Métodos para microencapsulação

Existem diferentes técnicas de microencapsulação, pois vai depender da aplicação, do material encapsulado e também do mecanismo de liberação desejado (JYOTHI et al., 2010). Segundo GAONKAR et al., (2014) baseado no tipo de material de parede e do material encapsulado existem quatro categorias gerais para as diferentes técnicas de microencapsulação, que são: processos de atomização, revestimento por atomização, coextrusão e emulsão. Cada tecnologia geralmente oferece um método exclusivo de formar um produto encapsulado, com uma variedade de vantagens e desvantagens. A existência de cada técnica é necessária para produzir a variedade de tamanhos de partículas e morfologias disponíveis comercialmente. Os três primeiros processos gerais dependem de mudanças físicas para formar partículas, principalmente através da secagem ou congelamento de um material de casca. A quarta categoria que é processos baseados em emulsão, utiliza produtos químicos como o principal método de solidificação de casca. E nessa quarta categoria, pode-se citar o processo de coacervação (GAONKAR et al., 2014). Dos processos frequentemente encontrados na indústria de alimentos, tem-se o *spray drying*, revestimento em leito fluidizado e coacervação complexa (McCLEMENTS, 2011).

2.2.1.1 Processo de coacervação complexa

Coacervação é a separação de um sistema coloidal em duas fases líquidas, conforme definido pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, 1997). O processo de coacervação pode ser categorizado em dois tipos: coacervação simples ou complexa, dependendo do número de polímeros envolvidos (GAONKAR et al., 2014). O processo compreende três etapas básicas: emulsificação, coacervação e reticulação (ZHANG et al., 2012). A Tabela 2 apresenta diferentes estudos reportados na literatura

que encapsularam através do processo de coacervação complexa, diferentes biopolímeros foram utilizados como materiais de parede.

a) Primeira etapa: Emulsão

Emulsões são sistemas coloidais largamente utilizados pela indústria de alimentos, e consistem de mistura, dispersão ou suspensão de dois ou mais líquidos imiscíveis, geralmente, óleo e água. Esses sistemas apresentam uma fase dispersa, em forma de gotas esféricas e pequenas (McCLEMENTS, 2011). As emulsões são componentes essenciais de alimentos, cosméticos e medicamentos, aumentando a biodisponibilidade de compostos ativos pouco solúveis em água. Além disso, métodos de emulsão simples e emulsão dupla são aplicados na fabricação de micropartículas e nanopartículas funcionais usadas para encapsulamento e liberação controlada (KAKRAN e ANTIPINA, 2014).

As emulsões duplas são designadas “emulsões de emulsões”. Nestes sistemas, as gotículas da fase dispersa contêm gotículas ainda menores dispersas dentro delas (GARTI, 1997). Estas emulsões podem ser: (i) Emulsões água em óleo em água (A/O/A), onde a fase dispersa (óleo) possui gotículas de água dispersas em seu interior, ou (ii) Emulsões óleo em água em óleo (O/A/O), onde a fase dispersa (aquosa), possui em seu interior gotículas de óleo dispersas (NISISAKO; OKUSHIMA; TORII, 2005). Nessa nomenclatura, “água” significa qualquer fase aquosa ou polar (por exemplo, um líquido iônico) enquanto o óleo representa qualquer fase hidrofóbica, isto é, insolúvel em água (LI, 2012). Essa sequência de fases não apenas implica a necessidade de estabilização seletiva de gotículas das diferentes fases, mas também na necessidade de encontrar um método adequado para “emulsificar emulsões”, ou seja, produzir pequenas gotículas dentro das maiores. O método tradicional e bem conhecido para formar emulsões duplas é o método de duas etapas (PAL, 2011). Neste método, uma emulsão primária A/O é produzida primeiro usando um tensoativo lipofílico. Em seguida, esta emulsão é vertida em uma fase aquosa contendo um emulsificante hidrofílico que ajuda a emulsificar a emulsão inicial, de modo a obter uma emulsão dupla A/O/A. Alternativamente, uma emulsão O/A/O pode ser produzida começando com uma emulsão O/A estabilizada com um surfactante hidrofílico que é posteriormente emulsionado em uma fase oleosa contendo um surfactante hidrofóbico (PAL, 2011).

Um tensoativo lipofílico bastante utilizado para a microencapsulação de compostos hidrofílicos por coacervação complexa é o poliricinelato de poliglicerol (PGPR) (HATTREM et al., 2014). É um emulsificante poderoso, que pode ser usado para a obtenção de emulsões estáveis de água em óleo (A/O). Suas altas propriedades emulsificantes são atribuídas à excelente capacidade de ligação à água atribuída a longa cadeia de poliglicerol hidrofílico. Embora não seja um produto de origem natural, é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (MÁRQUEZ et al., 2010).

b) Segunda etapa: Coacervação complexa

Coacervação complexa ocorre pela interação de dois coloides com carga oposta (DE KRUIF, WEINBRECK e DE VRIES, 2004). Essa interação de cargas opostas ou interação eletrostática pode ocorrer entre proteína e um polissacarídeo (NESTERENKO et al., 2014). Nesse caso a coacervação ocorre quando uma proteína a um pH abaixo do seu ponto isoelétrico (carga positiva) é misturado com um polissacarídeo aniônico (DE KRUIF, WEINBRECK e DE VRIES, 2004). Com base nessa interação entre os polímeros

envolvidos na reação, pode ocorrer a separação de fases, numa há separação entre a fase que contém o coacervado, ou seja, a fase rica em material de parede, e princípio ativo (as microcápsulas já formadas) e na outra fase a aquosa que poderá conter o material que não foi encapsulado (JAIN, 2015; ZHANG et al., 2012). E esta técnica é altamente sensível a muitos parâmetros, como a natureza de proteínas, polissacarídeos e ingredientes ativos (peso molecular, densidade de carga e conformação), proporção, conteúdo sólidos totais e condições aquosas, como pressão, cisalhamento, temperatura, pH e força iônica (SCHMITT e TURGEON, 2011).

c) Terceira etapa: Reticulação

A parede da microcápsula formada por coacervados são geralmente instáveis e com baixa resistência mecânica, devido à natureza iônica da interação entre as camadas do biopolímeros, sendo, portanto, necessário a reticulação para estabilizá-la e reforçá-la (ZHANG et al., 2012). A reticulação química era usada para estabilizar e modificar a estrutura e propriedades dos complexos coacervados para utilizações específicas, como refrear ou promover a liberação de ingredientes ativos (GAONKAR et al., 2014). Porém na última década, foi demonstrado que a força do complexo polissacarídeo/proteína pode ser melhorada através da reticulação, pois enrijece as paredes das cápsulas. Esse pode ocorrer através de tratamento térmico ou utilização de diferentes enzimas, como lactase (MOKOONLALL et al., 2016) e transglutaminase (HU et al., 2019). A Transglutaminase, é uma enzima natural, solúvel em água capaz de conferir modificação as proteínas em termos de solubilidade, capacidade de formação de espuma e atividade emulsificante resultando em mudanças nas propriedades funcionais dos alimentos (HUANG et al., 2014; GROSSMANN et al., 2017). Ela tem a capacidade de promover a reticulação entre proteínas pela catálise de reações de acil-transferência entre grupos carboxiamídicos de resíduos de glutamina da cadeia polipeptídica com aminas primárias, incluindo os grupos ϵ -amino de resíduos de lisina, resultando na formação de ligações ϵ -(γ -glutamil) lisina intra e intermoleculares (LORAND; GRAHAM, 2003). Vários estudos utilizaram a transglutaminase como reticulante em capsulas produzidas por coacervação complexa (ZHANG et al., 2012; LV et al., 2014; YUAN et al., 2017; TIMILSENA et al., 2017).

2.2.2 Materiais de parede

Os materiais de parede (agentes encapsulantes) devem ser escolhidos mediante sua capacidade de manter e estabilizar o composto encapsulado. As características físicas e químicas do mesmo devem ser investigadas (SUAVE et al., 2006). Segundo Santos, Ferreira e Grosso (2001), o encapsulante ideal deve apresentar baixa viscosidade em concentrações elevadas e ser de fácil manipulação durante o processo; possuir baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração das partículas; não ser reativo com o material a ser encapsulado; ter habilidade de selar e segurar o material ativo dentro da estrutura da cápsula; liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação; proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas, tais como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos; ser solúvel em solventes comumente usados; possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo. (GAONKAR et al., 2014).

Proteínas e polissacarídeos são os materiais de parede mais amplamente utilizados na indústria de alimentos, porque são produtos naturais, de fácil aprovação regulatória de alimentos. Além disso, os complexos coacervados formados demonstram excelentes

propriedades funcionais, combinando vantagens de proteínas e polissacarídeos (SOUZA et al., 2013). Hoje ainda se tem muitos estudos sobre a interação entre proteínas e polissacarídeos, como pode ser observado na Tabela 2.

2.2.1.2 Lactoferrina

A lactoferrina é uma glicoproteína da família das transferrinas (proteínas com a capacidade de se ligar a átomos de ferro). É uma proteína secretada pelas células epiteliais das glândulas mamárias, contudo, presente em diversos fluidos corporais além do leite, como saliva, lágrima, suor e sêmen (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012). Em relação a sua estrutura, a lactoferrina tem 80 kDa e cerca de 700 resíduos de aminoácidos e ponto isoelétrico próximo a 8.0 (SERRANO, 2007). A Figura 2 apresenta sua estrutura tridimensional, que consiste em uma cadeia única de polipeptídeo, dobrado em dois lóbulos globulares simétricos (lóbulos N e C) que podem ser homólogos entre si (33% – 41% de homologia) e cada lóbulo é subdividido em dois, onde se aloja um íon metálico (GIANSAANTI et al., 2016). Esse íon metálico pode ser átomos de Fe^{+2} ou Fe^{+3} , mas também pode ser Cu^{+2} , Zn^{+2} e Mn^{+2} (RODRÍGUEZ-FRANCO et al., 2005).

É uma proteína de alto interesse devido ao fato de possuir capacidade antimicrobiana, anti-inflamatório; antitumor, imunomodulador e atividade enzimática (SERRANO, 2007, GARCÍA-MONTOYA et al., 2012). Mediante a essa incrível capacidade, estudos recentes propuseram a possibilidade da lactoferrina como um potencial tratamento preventivo e adjunto para COVID-19 (CHANG et al., 2020, ZIMECKI et al., 2021).

A lactoferrina já foi usada em diversos estudos relacionados a coacervação complexa com outros polímeros. Wang et al., (2017) estudou apenas a interação entre lactoferrina com alginato de sódio onde pode comprovar que o pH ideal para essa interação é de 4,5 e a razão ideal entre os polímeros foi de 8:1 (proteína:polissacarídeo). Já Chapeau et al., (2016) usou lactoferrina com β -lactoglobulina como material de parede para microencapsular vitamina B9 onde a razão ideal entre as proteínas foi de 1:1 e o pH de coacervação foi de 5,5.

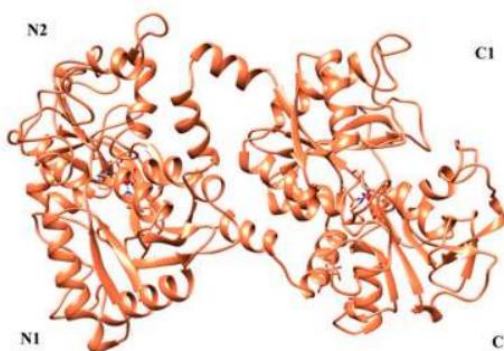


Figura 2: Estrutura tridimensional da lactoferrina.
Fonte: GIANSAANTI et al, 2016.

Tabela 2: Microencapsulação de diferentes ingredientes ativos pelo processo de coacervação complexa.

Proteína	Polissacarídeo	Ingrediente ativo (natureza)	Tipo de emulsão	Agente reticulante	Referência
Gelatina	Caseinato de sódio	Vitamina C (Lipossolúvel)	A/O/A	Genipina	FRAJ et al., 2021
Gelatina	Goma acácia	Antocianina (hidrossolúvel)	A/O/A	SR	KANHA T AL., 2020
Gelatina	Goma arábica	Lactase (hidrossolúvel)	A/O/A	SR	SOUZA et al., 2019
Proteína isolada de soja	Pectina	Cloridrato de Metformina (hidrossolúvel)	A/O/A	SR	MANCER; ALLEMANN; DAOUD, 2018
Gelatina	Alginato de sódio	Óleo essencial de Citronela (lipossolúvel)	O/A	Glutaraldeído	DE MATOS; SCOPEL; DETTMER, 2018.
Gelatina	Goma Arábica	Antocianinas de framboesa preta (hidrossolúvel)	A/O/A	SR	SHADDEL et al., 2018
Proteína isolada da semente de chia	Goma isolada de chia	Óleo da semente de chia (lipossolúvel)	O/A	Transglutaminase	TIMILSENA et al., 2017
Isolado proteico de soro de leite	Goma acacia	β -caroteno (lipossolúvel)	O/A	Glutaraldeído	JAIN et al., 2015

A/O/A = água/óleo/água; O/A = óleo/água; SR = sem reticulante.

2.2.1.3 Pectina

A pectina está universalmente presente em todos os órgãos de plantas terrestres no tecido meristemático e no parênquima. Na célula vegetal, a pectina está presente na parede celular e na lamela média, enquanto a qualidade e quantidade de pectina podem variar entre diferentes espécies vegetais (YABE, 2018). A Figura 3 apresenta a estrutura da pectina. É um polissacarídeo composto por uma cadeia linear de unidades de ácido galacturônico unidas por ligações α -1,4 em que os grupos carboxílicos do ácido galacturônico podem estar esterificados por grupamentos metil (YAPO, 2011). Resíduos de açúcares neutros como ramnose, D-arabinose e D-galactose estão presentes ao longo da cadeia da pectina. A fonte de extração da pectina vai determinar a quantidade e o tipo desses açúcares o que influencia suas características físico-químicas (THAKUR et al., 1997; RALET et al., 2001). Em relação à carga da pectina reporta-se o valor de pKa de 3,6 (SOUZA et al., 2013).

A massa molar das pectinas pode ser variável de acordo com a fonte vegetal, matéria-prima e condições de extração, os valores citados na literatura variam entre 20.000 a 360.000 g/mol e as amostras comerciais entre 35.000 a 120.000 g/mol (SAKAI et al., 1993).

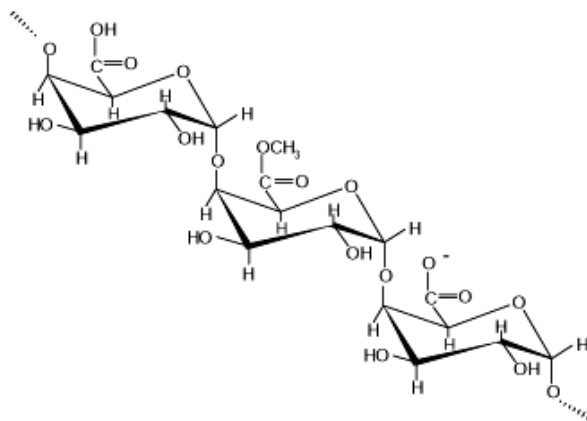


Figura 3: Estrutura química da pectina.

Fonte: DE SOUSA et al., 2017.

O grau de metoxilação (GM) é um fator importante que influencia várias propriedades da pectina vegetal e pode ser definido como a porcentagem do grupo carboxila esterificada com metanol (HOSSEINI, KHODAIYAN e YARMAND, 2016). Com base no GM, existem duas classes diferentes de pectina, isto é, pectina de alto teor de metoxilação (mais de 50% GM) e pectina de baixa metoxilação (menos de 50% GM). Além disso, a GM varia de acordo com a fonte de pectina (MARIĆ et al., 2018). Comercialmente, o bagaço de maçã e as cascas de citrus (laranja e limão, por exemplo) são as principais fontes para a produção de pectina (ROY et al., 2018). Além disso, as grandes quantidades de resíduos gerados no processamento de frutas cítricas são particularmente a principal fonte de produção de pectina cítrica. Estima-se que 25 a 30% do peso seco de casca de citrus seja composto de pectina (DRANCA e OROIAN, 2018). Além disso, novas fontes de extração de pectina, como cascas de cacau (MOLLEA, CHIAMPO e CONTI, 2008), casca de toranja (XU et al., 2014), casca de romã (MOORTHY et al., 2015), casca de maracujá (KULKARNI e VIJAYANAND, 2010) foram relatadas. A pectina de baixa metoxilação já foi usada como material de parede junto com proteína isolada de soja para microencapsular cloridrato de metformina, onde a coacervação se deu no pH 4,4 com uma razão entre os polímeros de 1:1 (MANCER, ALLEMANN e DAOUD 2018).

2.3 Simulação Gastrointestinal e Bioacessibilidade

No sistema gastrointestinal humano, os processos químicos digestivos são catalisados por enzimas digestivas que são secretadas no estômago e intestino, degradando assim os alimentos a uma escala molecular (ABRAHAMSSON et al., 2005). Tais fluidos e enzimas reduzem o potencial biológico dos compostos fenólicos, sendo a microencapsulação uma boa alternativa para protegê-los (ZHAO et al., 2013). Estudos demonstraram que digestão gastrointestinal *in vitro* têm sido amplamente utilizado para determinar a liberação controlada e bioacessibilidade de compostos fenólicos, obtendo resultados bem correlacionados com os obtidos *in vivo* (BERMÚDEZ-SOTO, TOMÁS-BARBERÁN e GARCÍA-CONESA, 2007; TAGLIAZUCCHI et al., 2010).

A bioacessibilidade dos compostos fenólicos refere-se à quantidade desses compostos que atravessam a parede intestinal que se tornam disponível para absorção na corrente sanguínea. Este conhecimento é importante pois é uma indicação preditiva sobre a quantidade de compostos fenólicos serão absorvidos na parede intestinal (WOOTTON-BEARD e RYAN, 2011). Existem alguns fatores que influenciam a bioacessibilidade, como por exemplo a transição do ambiente gástrico ácido para o alcalino do intestino, fazendo com que haja uma diminuição na quantidade de compostos fenólicos bioacessíveis. Liang et al., (2021) fez um estudo com ácido tânico livre e nanoencapsulado e observado que a maior parte do tânico livre foi rapidamente liberada nos fluidos gástricos, com 93,5% presentes após 30 min. Por outro lado, a liberação de ácido tânico ocorreu mais lentamente a partir das nanopartículas, cerca de 31%, afirmando que pode ser útil para proteger os compostos fenólicos da degradação no estômago, mantendo sua bioacessibilidade para o intestino.

Com isso bioacessibilidade tem como objetivo quantificar o ingrediente ativo após a simulação gastrointestinal podendo comprovar se a microencapsulação foi eficaz na proteção do mesmo. Outros estudos já mostraram sua eficácia como a encapsulação de cúrcuma (PARK, RHO e KIM, 2019) e resveratrol (HUANG et al., 2019).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Pectina de alta metoxilação (Ácido galacturônico $\geq 74\%$ em base seca), ácido tânico (Pureza $> 99,9\%$, obtido a partir de semente de uva), 1,1-Difenil-2- radical livre picril-hidrazil (DPPH[•]), 2,2'-azino-bis (ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico) sal de diamônio (ABTS, $> 98\%$), pepsina suína (P6887), pancreatina do pâncreas suíno (P7545), extrato de bile suína (B3883) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). O Polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) foi adquirido no mercado local (São Paulo, Brasil) e a lactoferrina 95% (Vivinal® Lactoferrina) desidratada foi adquirida da empresa FrieslandCampinas (Amersfoort, Netherlands); O óleo de soja foi adquirido em um supermercado local e a água utilizada era ultrapura com condutividade de $0,05 \mu\text{S/cm}$ (Master System P&D, Gehaka, Brasil). Todos os outros reagentes empregados foram de grau analítico.

3.2 Formação do Complexo Lf:Pec Empregado como Material de Parede

3.2.1 Preparo das soluções

A pectina (Pec) e a proteína (Lf) foram pesados em balança analítica (Shimadzu, AY220, Filipinas) para a preparação de uma solução contendo concentração fixa de $0,1\%$ (m/m). A Pec foi homogeneizada por 24 h em agitador magnético (NT101, Novatecnica, Brasil), e a Lf foi homogeneizada por 30 minutos, conforme metodologia proposta por BASTOS et al., (2020).

3.2.2 Potencial Zeta

Um Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK) foi usado para determinar o potencial zeta (ζ). As soluções estoque Lf, Pec e as razões de complexos foram transferidas para um autotitulado MPT-2 (Malvern Instruments, Reino Unido). O pH foi ajustado de 2,0 a 9,0 em incrementos de 0,5 unidades com um intervalo de confiança de $\pm 0,1$ unidades. As leituras das amostras foram feitas em triplicata a 25°C . A força da interação eletrostática (SEI) entre polieletrólitos com carga oposta foram estimados de acordo a Equação (1) (Yuan et al., 2017):

$$SEI (mV^2) = |ZP_1| \times |ZP_2| \quad (1)$$

onde ZP_1 e ZP_2 é o potencial- ζ medido de ambos os polímeros em cada pH.

A determinação do pH ideal para formação do complexo foi feita através do SEI após sua determinação uma nova medição de potencial- ζ foi realizada, com pH fixo e variando as razões. Foram testadas as proporções de Lf:Pec (1:1, 1:2, 1:4, 1:9, 2:1, 4:1, 9:1, 10:1).

3.2.3 Análise turbidimétrica

A turbidez de diferentes razões entre Lf:Pec (0:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:9, 2:1, 4:1, 9:1, 10:1, 1:0) foi determinada com pH fixo (5,5) e as amostras foram medidas com comprimento de onda de 400 nm usando um espectrofotômetro (Biomate 3S, Thermo Fisher Scientific, EUA) calibrado com água ultrapura para 100% de transmitância (%T), sendo a turbidez definida como $100 - \%T$. Com auxílio de agitador magnético e pHmetro (Tecnopon, mPA210, Brasil), os valores de pH das soluções foram ajustados com HCl 0,5 M. As leituras das amostras foram realizadas em triplicata a 25°C , conforme adaptado de Souza e Garcia-Rojas (2017).

3.3 Fabricação das Microcápsulas Contendo Ácido Tânico

O encapsulamento foi adaptado da metodologia proposta por Comunian et al. (2013). O procedimento de microencapsulação foi iniciado preparando a emulsão primária (A₁/O) usando uma solução de AT (30% m/m) e óleo de soja em uma proporção de 1: 2 (m/m), sendo que 1% (m/m) do emulsificante lipofílico PGPR foi dissolvido no óleo. A primeira mistura foi homogeneizada a 12.500 rpm por 4 min no Ultraturrax (T25D, IKA, Germany). Na segunda etapa, para obtenção das microcápsulas, foram preparadas as emulsões duplas (A₁/O/A₂), contendo a solução de Lf (pH 5,5). As emulsões duplas (A₁/O/A₂) foram preparadas a 10.000 rpm por 3 min, em Ultraturrax.

As microcápsulas coacervadas foram obtidas pela adição lenta e contínua de solução de Pec (pH 5,5) com o auxílio de agitador magnético para promover a coacervação. A emulsão final foi resfriada num banho de gelo a 10 °C por 30 min. Para a adição da solução de transglutaminase (TGase) foi utilizada a metodologia Bastos et al, (2020) com adaptações, onde a solução de TGase (30U) foi adicionada a microcápsula coacervada sob agitação de 60 rpm à temperatura 25 °C por 4 h em um shaker (TE-424, Tecnal, Brazil) para induzir o cross-linking. As amostras foram mantidas a 10 °C por 24 horas e, em seguida, o sobrenadante foi removido. Finalmente, as amostras precipitadas foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas (Enterprise I, Terroni, Brasil) por 48 horas.

Dez formulações de microcápsulas foram avaliadas em função da concentração de material de parede (Lf e Pec) e diferentes proporções de núcleo (emulsão primária preparada com AT) 0,75, 0,60, 0,45, 0,30 e 0,15 (% m/m), em função do conteúdo total de agentes encapsulantes. As formulações foram denotadas como S1 a S10, como apresentado na Tabela 3.

3.3.1 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada através da metodologia proposta por Cilek et al., (2012). O teor de AT nas microcápsulas foi determinado através da análise de compostos fenólicos totais, e a EE foi calculada através da razão entre o conteúdo fenólico encapsulado (CFE) e o conteúdo fenólico total (CFT) de acordo com a Equação (2).

$$EE(\%) = \frac{CFE}{CFT} \times 100 \quad (2)$$

3.3.2 Determinação da concentração de fenólicos totais

A concentração de compostos fenólicos das microcápsulas (dos sistemas S1 ao S10), bem como do AT foi determinada de acordo com o método proposto por Bouyahya et al. (2021) com algumas modificações. 500 µL de amostra (amostra liofilizada dissolvida 10 mg/mL) foram adicionadas em 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído 10 vezes em água destilada) e 4 mL de solvente (água/etanol). Em seguida, a solução foi vigorosamente misturada com vórtice e neutralizada com 500 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 25%. Após 2 h de incubação sob abrigo de luz, a absorvância foi registrada a 760 nm. A amostra utilizada como branco para a quantificação do AT continha a microcápsula sem AT. O conteúdo fenólico foi determinado como miligrama de AT equivalente por grama de microcápsula. Realizou-se uma curva de calibração utilizando o AT (R²=0,996).

3.4 Caracterização das Microcapsulas Carreadoras do AT

3.4.1 Avaliação da capacidade antioxidante das microcápsulas

Os efeitos de eliminação do radical DPPH[•] da microcápsula aberta e do AT livre foram determinados de acordo com método proposto por Thakur et al., 2020. O DPPH[•] é geralmente usado para a estimativa da capacidade de eliminação de radicais. Para este fim, uma alíquota (5,85 mL, 2 mM) de DPPH[•] foi adicionada à solução da amostra (10 mg/ml) dissolvida em água/etanol (150 µL) e incubada por 30 min no escuro, sob agitação a 60 rpm à temperatura ambiente. Finalmente, a absorvância das amostras foi lida a 515 nm em um espectrofotômetro (Biomate 3S, Thermo Fisher Scientific, USA), sendo etanol utilizado como o branco. A porcentagem de AA das amostras foi calculada usando a Equação (3):

$$AA(\%) = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

onde, A_0 é a absorvância do DPPH e A_s é a absorvância das amostras.

3.4.1.1 Capacidade de eliminação de radicais ABTS

O método de eliminação ABTS^{•+} é realizado de acordo com o método descrito por RE et al., 1999. A solução ABTS (2 mM) misturada com solução de persulfato de potássio (K₂S₂O₈; 70 mM), foi deixada em temperatura ambiente no escuro por 12-16 h, resultando em radicais catiônicos ABTS (ABTS^{•+}) com absorvância inicial (0,70±0,02). As amostras com diferentes concentrações de AT (20-100 mg/mL) reagiram com 4 mL de ABTS^{•+} solução a 30 °C no escuro por 6 minutos. E finalmente a absorvância foi lida a 734 nm em um espectrofotômetro (Biomate 3S, Thermo Fisher Scientific, USA). A amostra em branco era etanol. A porcentagem de AA das amostras foi calculada usando a Equação (4).

$$AA(\%) = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100 \quad (4)$$

onde, A_0 é a absorvância do ABTS e A_s é a absorvância das amostras.

3.4.2 Estabilidade ambiental as microcápsulas contendo AT

A resistência das microcápsulas (0,1% m/m) a mudanças nas condições ambientais foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Liang et al., (2021), com modificações:

Estabilidade de pH: Dispersões de microcápsulas foram preparadas em pH 5,5 então ajustadas para valores de pH variando de 2,0 a 9,0 pela adição de diferentes quantidades de solução de NaOH ou solução de ácido acético 10%.

Estabilidade térmica: As dispersões de microcápsulas (0,1% m/m) foram preparadas e, em seguida, aquecidas a 80 °C, submergindo os tubos de ensaio em banho-maria por tempos diferentes (0-120 min). Após o aquecimento, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente.

Após cada tratamento, o diâmetro médio das microcápsulas e o índice de polidispersidade (PDI) foram registrados utilizando o espalhamento de luz dinâmico através do equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK).

3.4.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de FT-IR das amostras secas (Lf, Pec, AT, cápsula, óleo de soja) foram obtidos. As análises foram realizadas com um espectrômetro FT-IR (Vertex 70, Bruker, Alemanha) com leitura na faixa de 4000–400 cm⁻¹.

3.4.4 Microscopia Óptica

Uma alíquota da microcápsula (amostra-S5) foi colocada entre a lâmina e a lamínula e levada ao microscópio óptico (K220, Kasvi, Brasil) acoplado a uma câmera Moticam (5MP, Kasvi, Brasil) que foi visualizada a ampliação de 100 × com óleo de imersão.

3.5 Simulação da Digestão Gastrointestinal *in vitro*

A digestão *in vitro* foi simulada em três etapas: oral, gástrica e intestinal. As digestões oral, gástrica e intestinal simuladas foram preparadas de acordo com INFOGEST 2.0 (Brodkorb et al., 2019).

3.5.1 Simulação da digestão – Fase oral

Resumidamente, 0,3 g da microcápsula liofilizada e dissolvida em 0,4 g de água ultrapura foi pesada em balança analítica (B-TEC-210, Tecnal, Brasil), e então misturada com 0,56 mL pré-aquecido de fluido salivar simulado (SSF) e 70 µL de α-amilase salivar (75 U/mL na solução oral final), a mistura foi adicionada seguida por 3,5 µL de CaCl₂ 0,3 M e 67 µL de água. A mistura foi agitada no shaker (TE-424, Tecnal, Brasil) a 100 rpm por 2 minutos a 37 °C.

3.5.2 Simulação da digestão – Fase gástrica

Após a digestão oral, 1,12 mL de fluido gástrico simulado (SGF) pré-aquecido foi adicionado à mistura oral digerida com 0,14 mL da pepsina (2.000 U/mL na solução gástrica final), foi adicionada a mistura 0,7 µL de 0,3 M CaCl₂, 20 µL de HCl 6M e 119 µL de água. O pH da mistura foi ajustado para 3,0 com pHmetro e agitado no shaker (TE-424, Tecnal, Brasil) a 100 rpm por 2 h à 37 °C.

3.5.3 Simulação da digestão – Fase intestinal

Após a conclusão da digestão gástrica, 1,19 mL de fluido intestinal simulado (SIF) pré-aquecido foi adicionado à mistura com 0,7 mL de pancreatina (100 U/mL no volume intestinal final) e 0,35 mL da solução de extrato biliar (10 mM). A mistura foi adicionada seguida por 5,6 µL de CaCl₂ 0,3 M, 25 µL de NaOH 6 M e 529 µL de água. O pH da mistura foi ajustado para 7,0 com pHmetro (mPA210, TecnoPON, Brasil) e agitado a 95 rpm por 2 h a 37 °C por meio de agitação (TE-424, Tecnal, Brasil).

Alíquotas (120 µL) de suco gástrico e intestinal foram retiradas aos 0, 5, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Após a retirada de cada alíquota, 120 µL de suco gástrico ou intestinal foram adicionados para dar continuidade ao processo de digestão. A quantidade de AT liberada foi calculada a partir da absorbância de acordo com as seções (2.3.1 e 2.3.7).

3.6 Bioacessibilidade

A bioacessibilidade do AT foi calculada após a passagem da amostra pelo trato gastrointestinal simulado, com base no método descrito por Liang et al., (2021). 5,6 mL de digesta bruta de cada amostra foram centrifugados a 16.000 rpm por 30 min e o sobrenadante foi coletado e assumido como a fração "micela" na qual o AT estava solubilizado. As concentrações de AT nas fases digesta e micela foram então determinadas e a bioacessibilidade foi calculada com base na Equação (5).

$$\text{Bioacessibilidade} = \frac{C_{\text{micela}}}{C_{\text{digesta}}} \times 100 \quad (5)$$

3.7 Análises Estatística

Todas as medições experimentais foram realizadas em triplicata e os dados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas com o Origin[®] Pro 9.0. Diferenças significativas em um nível de significância $\alpha = 0,05$ foram identificadas pelo teste de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do pH e da Razão Entre Proteína:Polissacarídeo para a Formação do Complexo

O efeito do pH e das diferentes razões na formação dos complexos Lf:Pec estudados é apresentada na Figura 4. Na Figura 4A observa-se que a dispersão de Lf apresenta mudança na densidade carga elétrica das moléculas, indo da carga positiva (+30 mV) a 0 mV do pH 2,0 à 8,5 respectivamente, indicando sua desprotonação próximo ao seu ponto isoelétrico (pI), como relatado na literatura (SERRANO, 2007). Em contrapartida, na solução contendo somente pectina é possível observar que os valores de potencial - ζ decrescem consideravelmente de -5 pra -45 mV entre os pH's de 2 à 5. Segundo Xiong et al., (2021), esse comportamento ocorre quando o valor de pH da solução é inferior a constante de dissociação do radical ácido (pKa) da Pec, assim o grupo carregado ($-\text{CO}_2^-$) protona-se, apresentando uma diminuição acentuada na força potencial absoluta, fazendo com que a carga da Pec vá a um nível mais alto (cerca de -50 mV) com o valor de pH do sistema muito mais alto do que pKa (a constante de dissociação do ácido carboxílico). Por fim, ao estudar a força da interação eletrostática (SEI) entre o complexo Lf:Pec (Figura 4A) foi possível notar que os maiores valores de SEI encontra-se numa faixa de pH entre 5,0 e 6,0, indicando que esta é a faixa de pH ideal para interação deste hidrolóides. Com base neste achado, o pH de 5,5 foi empregado para estudar a interação entre as diferentes razões de Lf:Pec.

A razão ideal entre dois biopolímeros com cargas opostas faz com que haja uma interação forte entre ambos o que pode induzir a neutralização da carga de sua mistura, resultando assim, na diminuição da força repulsiva eletrostática. Como pode ser visto na Figura 4B a maior interação entre Lf/Pec com valor de potencial zeta (≈ 0) foi obtido na razão 10:1 de Lf:Pec e segundo Lan et al., (2020) este comportamento é um indicativo de que a interação entre os grupamentos carboxila do polissacarídeo e os grupamentos amina da proteína alcançaram a região de eletro equivalência de suas cargas. Em contrapartida, nas razões que continham maiores concentrações de pectina (1:4 e 1:9) os valores de potencial zeta foram muito próximos aos valores encontrados na solução contendo apenas Pec, indicando que uma grande quantidade de moléculas de Pec não haviam sido neutralizadas pelo grupamento amina da Lf.

A fim de confirmar o efeito do pH e das razões na formação dos complexos aferiu-se também a transmitância dos biopolímeros isolados, bem como das razões no pH fixo de 5,5. Como pode ser observado na Figura 4C, o menor valor de turbidez foi observado para a solução contendo lactoferrina. Isso ocorre porque neste pH, devido a protonação das moléculas de proteína, há uma maior repulsão entre estas moléculas o que resulta na ausência de agregação e, conseqüentemente, soluções translúcidas (ZHENG, TANG E SUN, 2020). Ao observamos os resultados apresentados na solução contendo somente Pec, bem como, nas razões onde a Pec foi aumentada no sistema (1:9, 1:4 e 1:2) é possível notar que os valores de turbidez são muito parecidos o que corrobora com os resultados discutidos a respeito da pouca interação e formação dos complexos quando há excesso de moléculas de Pec (LI *et al.*, 2012). Contudo, à medida que a quantidade de Lf foi aumentada (2:1 até 10:1), um comportamento oposto foi observado, pois os valores de turbidez foram proporcionalmente aumentando, alcançando o máximo de turbidez na razão 10:1, dentre as concentrações testadas. Este comportamento também corrobora com os resultados encontrados nas análises de potencial zeta, pois segundo Bengoechea, et al., (2011) o aumento da turbidez indica a formação de uma suspensão coloidal suficientemente estável

de biopolímeros capaz de promover a dispersão de luz, indicando que a máxima interação (região de eletro equivalência) dos hidrocolóides foi alcançada nestas razões.

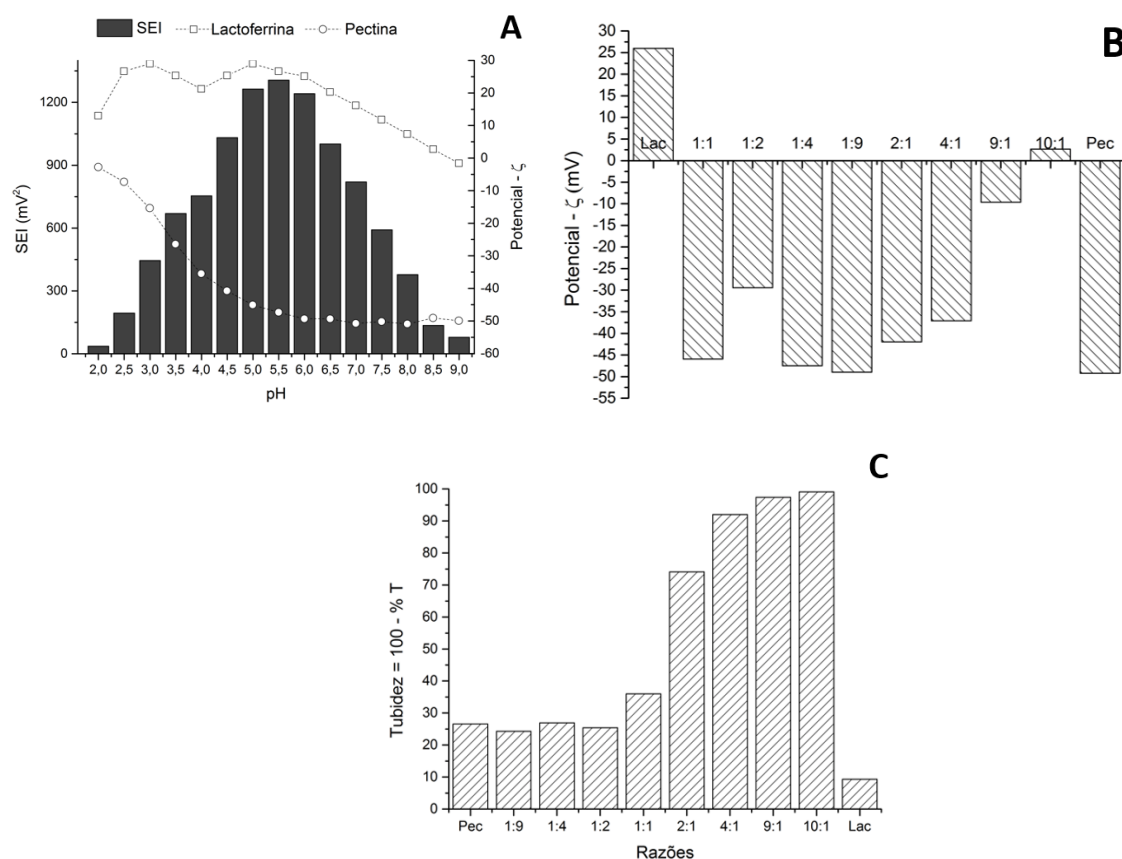


Figura 4: (A) Os potenciais $-\zeta$ e o SEI para o sistema de Lf/Pec, (B) O potenciais $-\zeta$ das diferentes razões entre Lf/Pec no pH fixado em 5,5 e (C) Turbidez (100 - %T) em pH fixo (5,50) dos biopolímeros Lf, Pec e dos sistemas Lf:Pec em diferentes razões.

4.2 Eficiência de Encapsulação nas Microcápsulas de AT

A composição do material de parede das diversas razões estudadas, assim como EE (%) das diversas microcápsulas foram estudadas e podem ser vistos na Tabela 3. A EE (%) das razões que continham 0,5 % de biopolímeros variou entre $22,67 \pm 1,24$ (S1) a $91,07 \pm 2,48$ (S5), enquanto que nos sistemas que continham 1%, a EE variou de $8,76 \pm 0,07$ a $29,75 \pm 1,47$ (sistemas de S6 a S10). Esses resultados permitem inferir que o aumento da concentração de biopolímeros e do núcleo para a formação da microcápsula interferiu negativamente na eficiência de encapsulação. Desta forma, o sistema que apresentou maior EE foi o sistema S5, com uma relação de 1:0,15 entre material de parede/núcleo. Resultado semelhante de eficiência de encapsulamento (~ 85% em sistema WPC:Pec na razão 1:1) foi obtido por Huang et al., (2019) ao microencapsularem arbutin e ácido cumárico (compostos fenólicos hidrofílicos), em emulsão dupla seguida de coacervação.

As características morfológicas das emulsões obtidas para a formação do S5 foram analisadas por microscopia óptica e as imagens podem ser vistas na Figura 5. As imagens microscópicas das emulsões (Figura 5A) confirmaram a formação de gotículas que seriam a emulsão primária (A_1/O), já na Figura 5B é possível observar a formação das emulsões duplas ($A_1/O/A_2$). Muitas gotículas menores e apenas algumas gotículas de emulsão maiores puderam ser observadas. Após a reticulação (Figura 5C), observou-se um espessamento na camada mais externa das microcápsulas. De Almeida Paula et al., (2019) e Kanha et al.,

(2020) obtiveram imagens semelhantes ao mostrar as emulsões primárias e emulsões duplas através da microscopia.

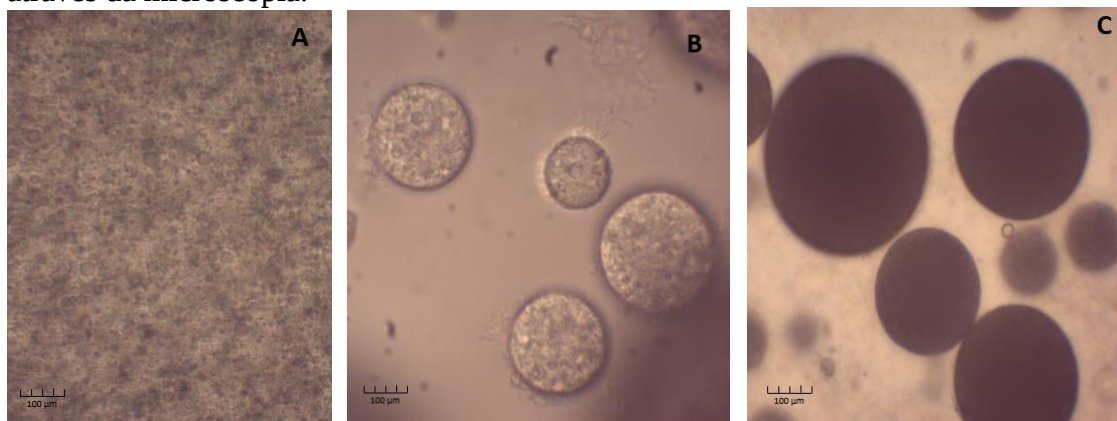


Figura 5: Microscopia óptica das emulsões para a formação da microcápsula (amostra S5). (A) é a emulsão primária (A1/O), (B) Emulsão dupla (A1/O/A2) após coacervação complexa no pH 5,5 e sem adição de TGase, (C) Emulsão dupla com adição de TGase.

4.3 Caracterização das Microcápsulas

4.3.1 Espectrometria FT-IR microcápsulas

A Figura 6 mostra os espectros de FT-IR das amostras de Pec, Lf, óleo de soja, AT e da microcápsula contendo AT. No espectro da Pec, os grupos O-H apresentaram-se em 3354 cm^{-1} , os picos em 1733 e 1606 cm^{-1} são compreendidos como o alongamento C=O do ácido carboxílico I e ácido carboxílico II, respectivamente, enquanto a ligação em 1013 cm^{-1} representava o C-O-C do grupo éter (estrutura de sacarídeo) e espectros semelhantes já foram descritos por Huang et al., 2019. Para Lf, as bandas de amida I ($1625\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$) em 1635 cm^{-1} , amida II ($1475\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$) em 1517 cm^{-1} e amida III ($1225\text{-}1425\text{ cm}^{-1}$) em 1390 cm^{-1} refere-se ao alongamento do grupo C=O, alongamento do grupo NH e alongamento dos grupos CN e NH, respectivamente. Resultados semelhantes também já foram descritos por Bokkhim et al., (2015). Os grupos de aminoácidos livres O-H podem ser identificados entre as posições das bandas em 3300 e 3170 cm^{-1} (BARTH, 2007), no espectro da Lf pode ser identificado em 3282 cm^{-1} . Já os espectros do óleo de soja em 2923 e 2854 cm^{-1} estão relacionados aos sinais simétricos e assimétricos das vibrações de alongamento C-H de CH_2 respectivamente. Em 1743 cm^{-1} , verificou-se um pico representando o alongamento C=O de ésteres alifáticos. Zhai et al., (2021) usando óleo de soja também encontrou os mesmos espectros.

Para AT, há uma banda larga de 3600 a 3000 cm^{-1} ligada ao alongamento O-H; uma banda em 1701 cm^{-1} ligada a grupos carboxil carbonila; bandas em 1607 e 1536 cm^{-1} ligadas a grupos C=C no anel aromático, bandas em 1444 cm^{-1} ligadas à deformação de C-C no grupo fenólico, uma banda em 1310 cm^{-1} ligada ao grupo fenólico, uma banda em 1181 cm^{-1} ligado a C-H e bandas entre 1083 e 1018 cm^{-1} que estão ligadas à deformação C-O e C-H. Resultados semelhante já foram encontrados por Ulu et al., (2021) e Liang et al., (2021). Para a microcápsula o espectro é uma combinação dos espectros dos biopolímeros (Lf e Pec) e óleo de soja. Apesar da sobreposição de algumas bandas, podemos identificar a presença de Lf e Pec através das bandas em 3282 cm^{-1} , 1745 cm^{-1} e 1013 cm^{-1} . O óleo pode ser identificado pela banda em 2923 cm^{-1} . A princípio, o aparecimento de novos picos e também o deslocamento de alguns dos existentes no espectro do encapsulado pode ser uma evidência da ocorrência e interação entre Lf e

Tabela 3: Composição de material de parede e núcleo das diferentes condições estudadas para o cálculo da eficiência de encapsulamento na fabricação das microcápsulas.

Amostra	Núcleo	Material de Parede			MP (%)	MP:N	Solução de TGase (g)	EE (%)
	AT (g)	Pec (g)	Lf (g)	Total de MP (g)				
S1	0,1125	0,014	0,136	0,15	0,5	1:0,75	5	22,67 ^b ± 1,24
S2	0,090	0,014	0,136	0,15	0,5	1:0,60	5	29,73 ^c ± 1,89
S3	0,0675	0,014	0,136	0,15	0,5	1:0,45	5	33,56 ^c ± 0,95
S4	0,045	0,014	0,136	0,15	0,5	1:0,30	5	57,76 ^d ± 1,15
S5	0,0225	0,014	0,136	0,15	0,5	1:0,15	5	91,71 ^e ± 2,48
S6	0,225	0,027	0,273	0,3	1,0	1:0,75	5	8,76 ^a ± 0,07
S7	0,180	0,027	0,273	0,3	1,0	1:0,60	5	11,68 ^a ± 0,21
S8	0,135	0,027	0,273	0,3	1,0	1:0,45	5	18,72 ^b ± 0,73
S9	0,090	0,027	0,273	0,3	1,0	1:0,30	5	29,75 ^c ± 0,90
S10	0,045	0,027	0,273	0,3	1,0	1:0,15	5	19,25 ^b ± 1,47

Legenda: AT= ácido tânico; Pec= pectina; Lf= lactoferrina; MP= material de parede; N= núcleo; TGase= transglutaminase; EE (%) = eficiência de encapsulação.

Pec, bem como a presença dos materiais encapsulados.

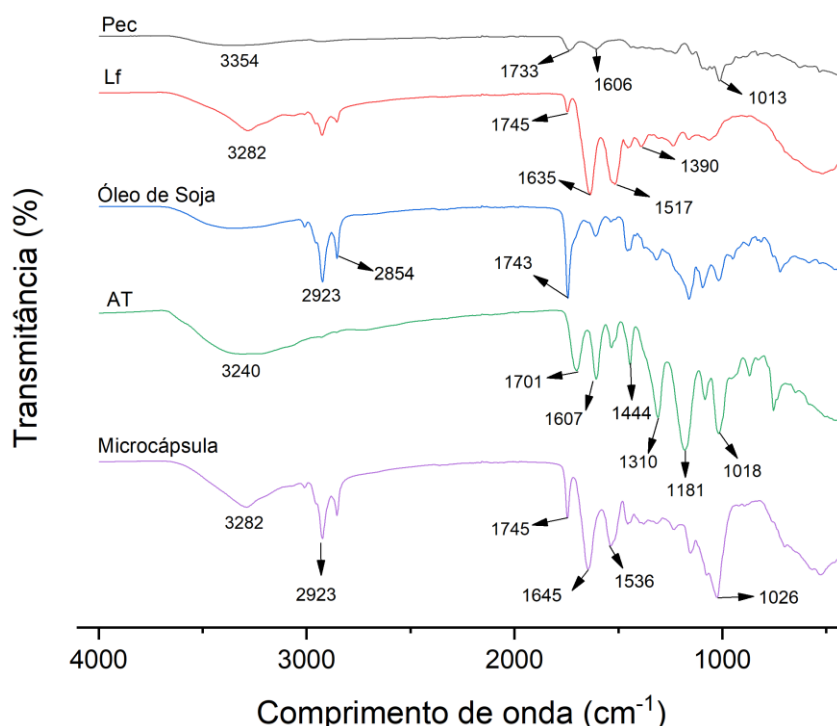


Figura 6: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) de Pec, Lf, óleo de soja, AT e microcápsula (amostra S5).

4.3.2 Análise de estabilidade das microcápsulas carreadoras de AT

A Tabela 4 apresenta os resultados para os tamanhos de partícula e PDI do sistema S5 submetido a diferentes pH's, bem como os diferentes tempos de aquecimento (80 °C), enquanto a Figura 7 mostra a diferença visual para cada tipo de tratamento feito para as microcápsulas.

Tabela 4: Estudo da estabilidade das microcápsulas (S5) em diferentes condições de pH e tempo à temperatura constante.

T (25 °C)	pH	Tamanho (µm)	PDI
	2,00	2,74 ^g ±0,23	0,24 ^e ±0,05
	3,00	1,36 ^d ±0,17	0,31 ^g ±0,01
	4,00	1,05 ^b ±0,08	0,19 ^c ±0,05
	5,00	1,11 ^c ±0,03	0,32 ^g ±0,1
	5,50	0,75 ^a ±0,19	0,20 ^d ±0,04
	6,00	2,04 ^e ±0,36	0,31 ^g ±0,01
	7,00	3,68 ^h ±0,79	0,16 ^b ±0,04
	8,00	2,52 ^f ±0,61	0,28 ^f ±0,06
	9,00	3,28 ^h ±0,74	0,15 ^b ±0,01
T (80 °C)	Tempo (min)	Tamanho (µm)	PDI
	10	0,25 ^b ±0,05	0,22 ^c ±0,09
	20	0,17 ^a ±0,03	0,15 ^b ±0,06
	30	0,20 ^a ±0,04	0,08 ^a ±0,06
	60	0,23 ^{ab} ±0,02	0,19 ^{bc} ±0,05
	90	0,24 ^b ±0,03	0,20 ^c ±0,04
	120	0,23 ^b ±0,03	0,15 ^b ±0,05

Legenda: PDI= índice de polidispersão.

Ao variar o pH pode-se observar que o diâmetro médio das cápsulas variou em 0,75 a 3,68 μm e o PDI permaneceu abaixo de 0,32 de pH 2 a 9 (Tabela 4), o que permite inferir que, embora a interação entre Lf e Pec possa ser reforçada utilizando TGase, a redução da interação entre estes hidrocolóides pode estar associada a desestabilização da emulsão secundária (material de parede externo), o que promoveu algumas mudanças nas propriedades das cápsulas, levando a agregação e/ou formação de microcápsulas maiores (Figura 7; pH 2, 6 e 9), ou até mesmo a separação das fases (floculação) nos pH 3,0 e 8,0. Por exemplo, o diâmetro médio das cápsulas tendeu a aumentar à medida que o sistema se tornava mais básico, aumentando de 2,04 μm para 3,68 μm . Esta redução na estabilidade pode ter ocorrido pelo pH estar próximo ao pKa da Pec, e da mesma forma como observado para os pHs mais básicos, estando mais próximos do pI da proteína, isso pode ter tido um efeito negativo, fazendo com que houvesse a redução da repulsão eletrostática entre as partículas; ou redução da atração eletrostática entre as moléculas de Lf e Pec (DAVIDOV-PARDO, JOYE e MCCLEMENTS, 2015). Essa redução na estabilidade também ocorreu no estudo de Liang et al., (2021), onde em pH's mais ácidos e próximos ao pI da proteína (zeína) houve aumento no tamanho médio das nanocápsulas estudadas.

O tamanho médio das microcápsulas contendo AT no pH 5,5 foi de $0,75 \pm 0,19 \mu\text{m}$ valor menor do que os reportados na literatura, o que pode viabilizar a sua aplicação em uma gama maior de produtos, haja visto que partículas acima de 100 μm podem limitar sua aplicação devido a uma tendência de transmitir a sensação de textura “arenosa” ou “granulada” em alguns produtos alimentícios (LEE, LEE e DONOVAN, 2014). Por exemplo, Mendanha et al. (2009) obtiveram valores entre 16 e 24 μm para microcápsulas de hidrolisado de caseína produzidas por dupla emulsificação seguida de coacervação complexa usando pectina e isolados de proteína de soja como materiais de parede em pH 4,4. Já Almeida Paula et al., (2019) obtiveram tamanho médio das microcápsulas contendo células probióticas (*L. plantarum*) também produzidas por dupla emulsão de 66,07 a 105,66 μm .

Quanto a influência da temperatura (80 °C) na estabilidade das microcápsulas pode-se constatar que não houve alteração no diâmetro médio de partícula ou turbidez das dispersões das microcápsulas mesmo após terem sido aquecidas por 120 min, o resalta a estabilidade térmica das microcápsulas produzidas, permitindo sugerir a sua viabilidade de aplicação em matrizes alimentícias ou farmacêuticas que são produzidas nesta faixa de temperatura.

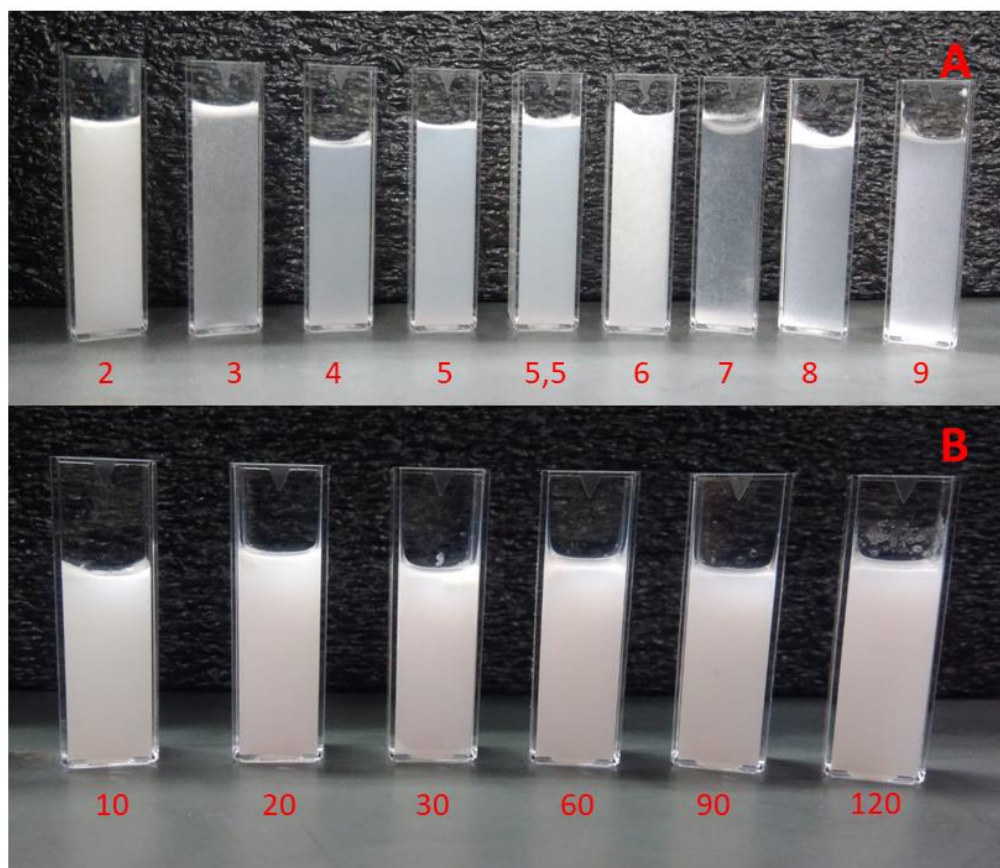


Figura 7: Estabilidade das microcápsulas (S5), (A) sob diferentes pH's e (B) a 80 °C em diferentes tempos (min).

4.3.3 Análise de atividade antioxidante (ABTS e DPPH) microcápsulas carreadoras de AT

A atividade antioxidante do AT livre ou encapsulado através dos métodos ABTS e DPPH são apresentados na Figura 8. Nas figuras 8A e 8B pode-se observar que AT exibiu atividade sequestrante de DPPH[•] de até 72% de eficácia em concentrações de 10 µg/mL, com valor calculado de IC₅₀ de 5,6 µg/mL. Já para a atividade de ABTS^{•+}, o AT exibiu 78% de eficácia em concentrações de 100 µg/mL, com valor calculado de IC₅₀ de 58,8 µg/mL. Diversos estudos na literatura reportaram a capacidade antioxidante do AT livre. Lou et al. (2018) ao analisar a capacidade antioxidante com DPPH[•], encontraram IC₅₀ de 4,87 µg/mL e Liang et al. (2021) encontraram 61,4 µg/mL usando ABTS^{•+}. Gülçin et al. (2010) ao investigar as propriedades antioxidantes e eliminadoras de radicais do AT com diferentes metodologias analíticas mostraram os efeitos antioxidantes *in vitro* do AT em comparação com antioxidantes comerciais e padrão, como BHA, BHT, α -tocoferol e trolox comumente usados pela indústria alimentícia e farmacêutica. Seus resultados apontaram que o AT usado em menor quantidade tem uma boa eficácia de eliminação de radicais, quando comparado aos outros antioxidantes comumente usados na indústria.

Para o AT microencapsulado (Figura 8C), a atividade sequestrante de DPPH[•] foi de 86,69% de eficácia a 10 µg/mL e para a atividade de ABTS^{•+} foi de 73,77% a 100 µg/mL. Essa diminuição na atividade de eliminação dos radicais do AT microencapsulado comparado ao AT livre pode ser explicada pela perda ou oxidação, ainda que pontual, de algumas das moléculas de AT durante o processo de microencapsulamento, e esta perda não foi expressiva a ponto de inviabilizar a metodologia adotada.

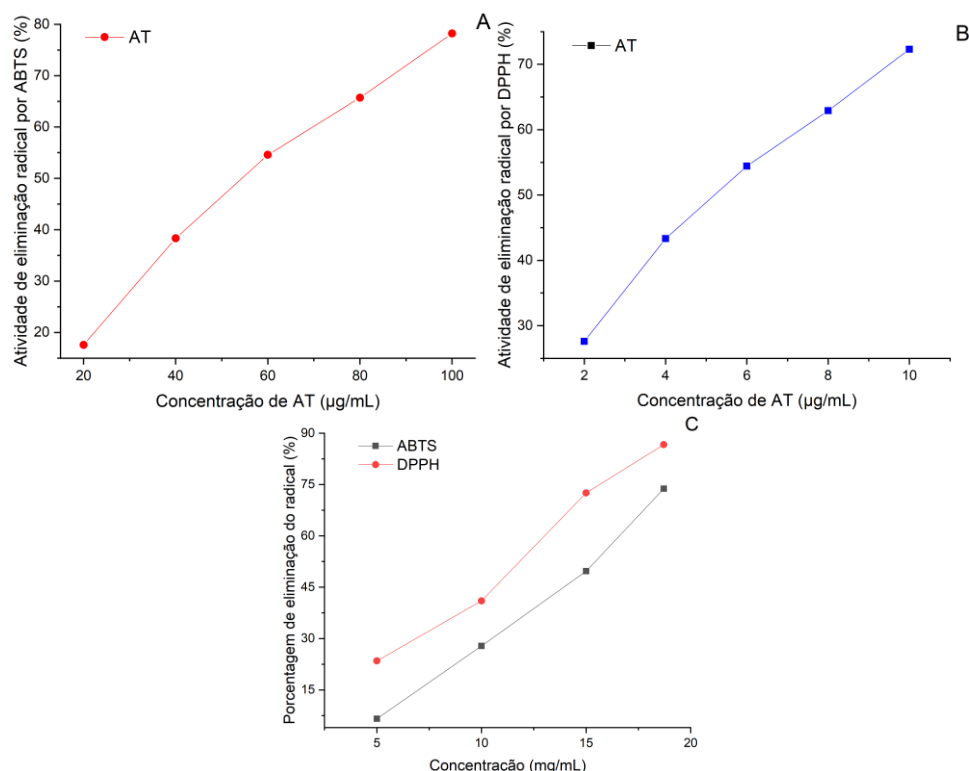


Figura 8: Atividade antioxidante do AT livre e contido nas microcápsulas (S5) onde (A) eliminação de radicais referente ao ABTS e (B) ao DPPH, ambos com ácido tânico livre, em diferentes concentrações; (C) atividade de eliminação de radicais (ABTS e DPPH) com ácido tânico microencapsulado em diferentes concentrações.

4.4 Simulação da Digestão Gastrointestinal das Microcápsulas de AT e Biodisponibilidade

Examinou-se a liberação de AT das microcápsulas sob condições simuladas de boca, estômago e intestino delgado e os resultados são apresentados através da Figura 9. Foi possível observar que a liberação de AT ocorreu de forma lenta durante o trato digestivo simulado. Na boca houve apenas 18% de liberação, alcançado cerca de 37% de liberação nos fluidos gástricos simulados após 120 minutos de digestão. A liberação mais lenta do AT encapsulado pode ter ocorrido por uma associação de fatores, como a presença de pH favorável a interação dos hidrocolóides, bem como a ação reticulante da TGase associada a hidrólise parcial da Lf pela ação da pepsina, favoreceu a manutenção da estrutura das microcápsulas e consequentemente o encapsulamento do AT. A ação dos reticulantes têm sido associada a formação de uma rede de interação mais coesa e forte, o que poderia interferir na hidrólise (ação das enzimas) da camada de revestimento interfacial das microcápsulas e da emulsão por efeito de impedimento estérico durante as etapas de digestão, resultando em um controle na liberação de compostos encapsulados na fase gástrica (CHEN, BOLOGNESI e VLADISAVLJEVIĆ, (2021); EISINAITE *et al.*, 2018; LAU *et al.*, 2017).

Já na fase do intestino delgado, houve uma rápida liberação do restante do AT (cerca de 69%) nos primeiros 30 minutos de digestão. Isso ocorreu devido a ação simultânea do pH, concentração fisiológica de sal (> 150 mM) no sistema digestivo, ação das enzimas pancreáticas e da bile, que promovem concomitantemente a dissociação e a quebra da emulsão das microcápsulas. Esses resultados demonstram que a técnica de formação das microcápsulas, bem como o material de parede utilizado foram capazes de controlar a liberação do AT na fase gástrica, evitando boa parte de sua inativação até o local alvo de

liberação, o intestino grosso. Assim a capacidade de controlar a retenção e liberação de polifenóis no intestino humano é um fator preponderante no sucesso da técnica de encapsulamento, assim como na sua aplicação, pois estes fatores influenciam sua bioacessibilidade e metabolismo dos mesmos (Annunziata et al., 2020). Um estudo recente mostrou que a maior parte do AT livre era rapidamente liberado para os fluidos gástricos, com 93,5% estando presente após 30 minutos e 100% após 60 minutos durante a digestão (LIANG et al., 2021). Esta liberação rápida na fase gástrica tem sérias consequências na capacidade de inibição da enzima α -amilase. Zhao et al., (2013) demonstram que quando AT está livre durante o processo de digestão gástrica há uma ligeira inibição da sua atividade contra α -amilase no intestino delgado devido a presença de proteínas e pepsina, onde o AT primeiro interage e liga-se as proteínas e pepsina e/ou aminoácidos hidrolisados pela pepsina antes de entrar no intestino delgado. Como consequência desta interação prematura, ocorre então a inativação do AT o que inviabiliza sua interação com α -amilase no intestino delgado (ZHAO et al., 2013).

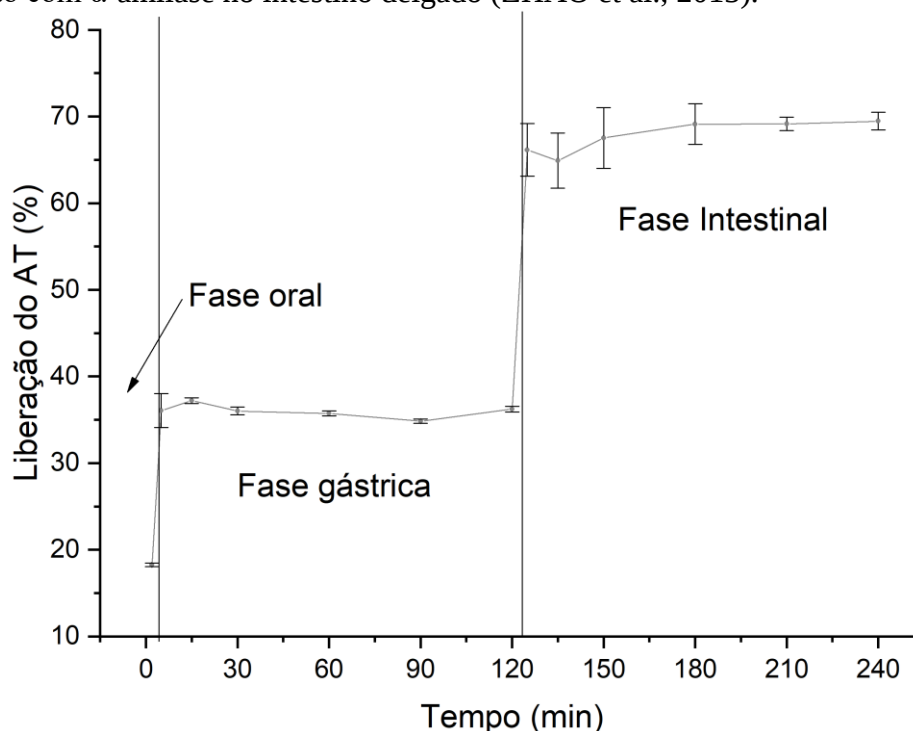


Figura 9: Liberação do AT contido nas microcápsulas (amostra S5) durante a digestão *in vitro*.

5 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a AT pode ser eficientemente encapsulado mediante a formação uma emulsão A/O/A utilizando como material de parede a Lf e Pec. As microcápsulas foram obtidas em pH 5,5 e na razão de 10:1 (lactoferrina: pectina) de material de parede, e a maior EE (91,71%) foi obtido na concentração de 0,5% de biopolímero e proporção de 1:0,15 (parede para núcleo). Além disso, foi possível constatar que quando as microcápsulas são expostas a pH muito ácido (pH 2,0) ou básico (pH ~ 8,0) o diâmetro e a estabilidade das mesmas podem ser afetados, entretanto quando estas são expostas a temperaturas elevadas (80 °C) nenhum efeito deletério é observado em sua estrutura ($\sim 0,75 \pm 0,19 \mu\text{m}$) ou estabilidade o que permite inferir o seu potencial de aplicação em matrizes alimentícias ou farmacêuticas que são produzidas nesta faixa de temperatura. Além disso, as microcápsulas formadas foram capazes de proteger boa parte do AT ao longo do trato digestivo simulado promovendo uma liberação controlada e mais acentuada no intestino delgado, onde o AT obteve uma bioacessibilidade de 38% após a digestão *in vitro*. Assim, as micropartículas estudadas apresentam-se como um sistema eficaz de carregamento do ácido tânico que poderiam ser aplicadas em alimentos nutracêuticos, suplementos alimentícios ou formulações farmacêuticas.

6 REFERÊNCIAS IBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSSON, B., Pal, A., SJOBERG, M., CARLSSON, M., LAURELL, E., BRASSEUR, J. G. A novel in vitro and numerical analysis of shear-induced drug release from extended release tablets in the fed stomach. **Pharmaceutical Research**, p.1215–1226. 2005.
- ANNUNZIATA, G. et al. Microencapsulation as a tool to counteract the typical low bioavailability of polyphenols in the management of diabetes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 139, p. 111248, 2020.
- BAGHERI, Leila et al. Spray-dried alginate microparticles carrying caffeine-loaded and potentially bioactive nanoparticles. **Food Research International**, v. 62, p. 1113-1119, 2014.
- BAKRY, Amr M. et al. Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 143-182, 2016.
- BAKRY, Amr M. et al. Myofibrillar protein with κ -or λ -carrageenans as novel shell materials for microencapsulation of tuna oil through complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, v. 96, p. 43-53, 2019.
- BARTH, Andreas. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007.
- BASTOS, Livia Pinto Heckert 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, p. 126345, 2020.
- BENZIE, Iris FF; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, 1999. p. 15-27.
- BERMÚDEZ-SOTO, M.-J.; TOMÁS-BARBERÁN, F.-A.; GARCÍA-CONESA, M.-T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. **Food chemistry**, v. 102, n. 3, p. 865-874, 2007.
- BOKKHIM, Huma 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.
- BOUYAHYA, Abdelhakim et al. Study of the antioxidant and antidiabetic activity in vitro of free and encapsulated phenolic compounds of olive pomace. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 36, p. 102126, 2021.
- BRAIDY, Nady et al. Molecular targets of tannic acid in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 14, n. 8, p. 861-869, 2017.

- BRANEN, A. Larry et al. **Food additives**. CRC Press, 2001.
- BRODKORB, André et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature protocols**, v. 14, n. 4, p. 991-1014, 2019.
- BUYUKKESTELLI, Hulya Ilyasoglu; EL, Sedef Nehir. Development and characterization of double emulsion to encapsulate iron. **Journal of Food Engineering**, v. 263, p. 446-453, 2019.
- CANIZALES, Jacqueline R. et al. Encapsulation to protect different bioactives to be used as nutraceuticals and food ingredients. **Bioactive Molecules in Food**, p. 1-20, 2018.
- CARPENTIER, Jérémy et al. Complex coacervation of pea protein isolate and tragacanth gum: Comparative study with commercial polysaccharides. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 69, p. 102641, 2021.
- CASTEJÓN, Natalia; LUNA, Pilar; SEÑORÁNS, F. Javier. Microencapsulation by spray drying of omega-3 lipids extracted from oilseeds and microalgae: effect on polyunsaturated fatty acid composition. **LWT**, p. 111789, 2021.
- CHAPEAU, Anne-Laure et al. Spontaneous co-assembly of lactoferrin and β -lactoglobulin as a promising biocarrier for vitamin B9. **Food hydrocolloids**, v. 57, p. 280-290, 2016.
- CHEN, M.; BOLOGNESI, G.; VLADISAVLJEVIĆ, G. T. Crosslinking Strategies for the Microfluidic Production of Microgels. **Molecules**, 26, n. 12, p. 3752, 2021.
- CHUNG, King-Thom et al. Tannins and human health: a review. Critical reviews in **Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.
- CILEK, Betul et al. Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. **European Food Research and Technology**, v. 235, n. 4, p. 587-596, 2012.
- CLARK, Allan H.; ROSS-MURPHY, Simon B. Biopolymer network assembly: measurement and theory. In: **Modern biopolymer science**. Academic Press, 2009. p. 1-27.
- COMUNIAN, Talita A. et al. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 373-379, 2013.
- COSTA, André MM et al. Microencapsulation of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil by complex coacervation: Development of a potential functional ingredient for food application. **LWT**, v. 131, p. 109519, 2020.
- COVIELLO, Tommasina et al. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of controlled release*, v. 119, n. 1, p. 5-24, 2007.
- DA SILVA SOARES, Barbara et al. Microencapsulation of Sacha Inchi Oil (*Plukenetia volubilis* L.) using Complex Coacervation: Formation and Structural Characterization. **Food Chemistry**, p. 125045, 2019.

DAI, Lei et al. Development of protein-polysaccharide-surfactant ternary complex particles as delivery vehicles for curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 85, p. 75-85, 2018.

DAVIDOV-PARDO, Gabriel; JOYE, Iris J.; MCCLEMENTS, David Julian. Food-grade protein-based nanoparticles and microparticles for bioactive delivery: fabrication, characterization, and utilization. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 98, p. 293-325, 2015.

DE ALMEIDA PAULA, Daniele et al. Use of gelatin and gum arabic for microencapsulation of probiotic cells from *Lactobacillus plantarum* by a dual process combining double emulsification followed by complex coacervation. **International journal of biological macromolecules**, v. 133, p. 722-731, 2019.

DE KRUIF, Cornelus G.; WEINBRECK, Fanny; DE VRIES, Renko. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 9, n. 5, p. 340-349, 2004.

DE MATOS, Eric F.; SCOPEL, Bianca S.; DETTMER, Aline. Citronella essential oil microencapsulation by complex coacervation with leather waste gelatin and sodium alginate. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 1989-1994, 2018.

DE SOUSA, André LN et al. Chemical modification of common melon pectin (*cucumis melo* var. *Acidulus*). **Química Nova**, v. 40, n. 5, p. 554-560, 2017.

DIMA, Cristian; DIMA, Stefan. Bioaccessibility study of calcium and vitamin D3 co-microencapsulated in water-in-oil-in-water double emulsions. **Food chemistry**, v. 303, p. 125416, 2020.

DRANCA, Florina; OROIAN, Mircea. Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications. **Food Research International**, v. 113, p. 327-350, 2018.

EISINAITE, V.; DUQUE ESTRADA, P.; SCHROËN, K.; BERTON-CARABIN, C. et al. Tailoring W/O/W emulsion composition for effective encapsulation: The role of PGPR in water transfer-induced swelling. **Food Research International**, 106, p. 722-728, 2018/04/01/ 2018.

ESPINAL-RUIZ, M.; RESTREPO-SÁNCHEZ, L.-P.; NARVÁEZ-CUENCA, C.-E.; MCCLEMENTS, D. J. Impact of pectin properties on lipid digestion under simulated gastrointestinal conditions: Comparison of citrus and banana passion fruit (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*) pectins. **Food Hydrocolloids**, 52, p. 329-342, 1// 2016.

FATHI, Milad; MARTIN, Angel; MCCLEMENTS, David Julian. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in food science & technology**, v. 39, n. 1, p. 18-39, 2014.

FRAJ, Jadranka et al. Encapsulation and release of vitamin C in double W/O/W emulsions followed by complex coacervation in gelatin-sodium caseinate system. **Journal of Food Engineering**, v. 292, p. 110353, 2021.

GAONKAR, A. G. et al. Microencapsulation in the Food Industry:.. **Elsevier Science Publishing Company**, 2014.

GARCÍA-MONTOYA, Isui Abril et al. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1820, n. 3, p. 226-236, 2012.

GARTI, Nissim. Double emulsions—scope, limitations and new achievements. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 123, p. 233-246, 1997.

GHOSH, Swapan Kumar. Functional coatings and microencapsulation: a general perspective. **Functional coatings**, p. 1-28, 2006.

GIANSANTI, Francesco et al. Lactoferrin from milk: nutraceutical and pharmacological properties. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 4, p. 61, 2016.

GÜLÇİN, İlhami et al. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. **Arabian journal of chemistry**, v. 3, n. 1, p. 43-53, 2010.

HATTREM, Magnus N. et al. Macro-vs. micromolecular stabilisation of W/O/W-emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 77-85, 2014.

HERNÁNDEZ-NAVA, Ruth et al. Encapsulation of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) by complex coacervation between gelatin and chia mucilage and its properties after spray drying. **Food Hydrocolloids**, v. 109, p. 106077, 2020.

HOSSEINI, Seyed Saeid; KHODAIYAN, Faramarz; YARMAND, Mohammad Saeid. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 140, p. 59-65, 2016.

HU, Wanqing et al. Modification of chitosan grafted with collagen peptide by enzyme crosslinking. **Carbohydrate polymers**, v. 206, p. 468-475, 2019.

HUANG, Hao et al. Protein-polysaccharide complex coated W/O/W emulsion as secondary microcapsule for hydrophilic arbutin and hydrophobic coumaric acid. **Food chemistry**, v. 300, p. 125171, 2019.

HUANG, Qian et al. Inhibition of α -glucosidase activity and non-enzymatic glycation by tannic acid: Inhibitory activity and molecular mechanism. **International journal of biological macromolecules**, v. 141, p. 358-368, 2019.

HUANG, Xulin et al. Resveratrol encapsulation in core-shell biopolymer nanoparticles: Impact on antioxidant and anticancer activities. **Food Hydrocolloids**, v. 64, p. 157-165, 2017.

IUPAC. (1997). IUPAC Compendium of Chemical Technology, North Carolina, USA.

JAIN, Ashay 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.

JARA-PALACIOS, M. José et al. Effects of in vitro gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of different white winemaking byproducts extracts. **Food research international**, v. 109, p. 433-439, 2018.

JIAO, Guangling et al. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine drugs**, v. 9, n. 2, p. 196-223, 2011.

JYOTHI, N. Venkata Naga et al. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 187-197, 2010.

KAKRAN, Mitali; ANTIPINA, Maria N. Emulsion-based techniques for encapsulation in biomedicine, food and personal care. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 18, p. 47-55, 2014.

KANHA, Nattapong et al. Microencapsulation of copigmented anthocyanins using double emulsion followed by complex coacervation: Preparation, characterization and stability. **LWT**, v. 133, p. 110154, 2020.

KAUR, Indu Pal; KAKKAR, Shilpa. Nanotherapy for posterior eye diseases. **Journal of controlled release**, v. 193, p. 100-112, 2014.

KETNAWA, Sunantha; OGAWA, Yukiharu. Evaluation of protein digestibility of fermented soybeans and changes in biochemical characteristics of digested fractions. **Journal of functional foods**, v. 52, p. 640-647, 2019.

KHEYNOOR, Najme et al. Encapsulation of vitamin C in a rebaudioside-sweetened model beverage using water in oil in water double emulsions. **LWT**, v. 96, p. 419-425, 2018.

KILIC, E.; NOVOSELOVA, M. V.; LIM, S. H.; PYATAEV, N. A. et al. Formulation for Oral Delivery of Lactoferrin Based on Bovine Serum Albumin and Tannic Acid Multilayer Microcapsules. **Scientific Reports**, 7, p. 44159, 03/10/online 2017. Article.

KIM, Dal-Ah et al. Tannic acid attenuates the formation of cancer stem cells by inhibiting NF- κ B-mediated phenotype transition of breast cancer cells. **American journal of cancer research**, v. 9, n. 8, p. 1664, 2019.

KIM, T. J. et al. Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 740-746, 2010.

KING, A. M. Y.; YOUNG, Gloria. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KULKARNI, S. G.; VIJAYANAND, P. Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* L.). **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1026-1031, 2010.

LAU, H. H.; MURNEY, R.; YAKOVLEV, N. L.; NOVOSELOVA, M. V. et al. Protein-tannic acid multilayer films: A multifunctional material for microencapsulation of food-derived bioactives. **Journal of Colloid and Interface Science**, 505, p. 332-340, 2017/11/01/ 2017.

LEE, Y.; LEE, S.-Y.; DONOVAN, J. D. Chapter 28 - Stability Characterization and Sensory Testing in Food Products Containing Microencapsulants. In: **Microencapsulation in the Food Industry**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 367-381.

LENGERT, Ekaterina V. et al. Influence of the new formulation based on silver alginate microcapsules loaded with tannic acid on the microcirculation of the experimental periodontitis in rats. **Materials Science and Engineering: C**, v. 126, p. 112144, 2021.

LI, Feifan; WANG, Hongfu; MEI, Xiaohong. Preparation and characterization of phytosterol-loaded microcapsules based on the complex coacervation. **Journal of Food Engineering**, p. 110728, 2021.

LI, Jianshen et al. Formation of multiple water-in-ionic liquid-in-water emulsions. **Journal of colloid and interface science**, v. 368, n. 1, p. 395-399, 2012.

LI, X.; FANG, Y.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O. et al. Complexation of Bovine Serum Albumin and Sugar Beet Pectin: Structural Transitions and Phase Diagram. **Langmuir**, 28, n. 27, p. 10164-10176, 2012/07/10 2012.

LI, Yuting; BAO, Tao; CHEN, Wei. Comparison of the protective effect of black and white mulberry against ethyl carbamate-induced cytotoxicity and oxidative damage. **Food chemistry**, v. 243, p. 65-73, 2018.

LIANG, Xiao et al. Tannic acid-fortified zein-pectin nanoparticles: Stability, properties, antioxidant activity, and in vitro digestion. **Food Research International**, v. 145, p. 110425, 2021.

LOPES, George KB; SCHULMAN, Herbert M.; HERMES-LIMA, Marcelo. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1472, n. 1-2, p. 142-152, 1999.

LORAND, Laszlo; GRAHAM, Robert M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 4, n. 2, p. 140, 2003.

LOU, Wenjuan et al. Antioxidant and α -amylase inhibitory activities of tannic acid. **Journal of food science and technology**, v. 55, n. 9, p. 3640-3646, 2018.

LUDUVICO, Karina Pereira et al. Antidepressant effect and modulation of the redox system mediated by tannic acid on lipopolysaccharide-induced depressive and inflammatory changes in mice. **Neurochemical Research**, v. 45, p. 2032-2043, 2020.

LUO, Yangchao; TENG, Zi; WANG, Qin. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 3, p. 836-843, 2012.

MANCER, Daya; ALLEMANN, Eric; DAOUD, Kamel. Metformin hydrochloride microencapsulation by complex coacervation: Study of size distribution and encapsulation yield using response surface methodology. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 45, p. 184-195, 2018.

MAO, Like et al. Formation of soy protein isolate-carrageenan complex coacervates for improved viability of *Bifidobacterium longum* during pasteurization and in vitro digestion. **Food chemistry**, v. 276, p. 307-314, 2019.

MARIĆ, Mirela et al. An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. **Trends in food science & technology**, v. 76, p. 28-37, 2018.

MÁRQUEZ, Andrés L. et al. Effect of calcium salts and surfactant concentration on the stability of water-in-oil (w/o) emulsions prepared with polyglycerol polyricinoleate. **Journal of colloid and interface science**, v. 341, n. 1, p. 101-108, 2010.

MATOS, María et al. Encapsulation of resveratrol using food-grade concentrated double emulsions: Emulsion characterization and rheological behaviour. **Journal of Food Engineering**, v. 226, p. 73-81, 2018.

McCLEMENTS, David Julian. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297-2316, 2011.

MENDANHA, Debora V. et al. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1099-1104, 2009.

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

MOKOONLALL, Aryama et al. Structure modification of stirred fermented milk gel due to laccase-catalysed protein crosslinking in a post-processing step. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 33, p. 563-570, 2016.

MOLLEA, C.; CHIAMPO, F.; CONTI, R. Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: A preliminary study. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1353-1356, 2008.

MOORTHY, I. Ganesh et al. Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 1323-1328, 2015.

MORI, Takashi et al. Tannic acid is a natural β -secretase inhibitor that prevents cognitive impairment and mitigates Alzheimer-like pathology in transgenic mice. **Journal of Biological chemistry**, v. 287, n. 9, p. 6912-6927, 2012.

MUELLER-HARVEY, Irene. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal feed science and technology**, v. 91, n. 1-2, p. 3-20, 2001.

NEAGU, Corina et al. Cross-Linked Microencapsulation of CO₂ Supercritical Extracted Oleoresins from Sea Buckthorn: Evidence of Targeted Functionality and Stability. **Molecules**, v. 25, n. 10, p. 2442, 2020.

NESTERENKO, Alla et al. The effect of vegetable protein modifications on the microencapsulation process. **Food hydrocolloids**, v. 41, p. 95-102, 2014.

NIE, Fangyuan et al. Apoptotic effect of tannic acid on fatty acid synthase over-expressed human breast cancer cells. **Tumor Biology**, v. 37, n. 2, p. 2137-2143, 2016.

NISISAKO, Takasi; OKUSHIMA, Shingo; TORII, Toru. Controlled formulation of monodisperse double emulsions in a multiple-phase microfluidic system. **Soft Matter**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2005.

NKURUNZIZA, David et al. Effect of wall materials on the spray drying encapsulation of brown seaweed bioactive compounds obtained by subcritical water extraction. **Algal Research**, v. 58, p. 102381, 2021.

OLIVEIRA, Fernanda Moreira et al. Encapsulation of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) in gelatin/tragacanth gum by complex coacervation for application in sheep meat hamburger. **Food Control**, v. 131, p. 108426, 2022.

PAL, Rajinder. Rheology of simple and multiple emulsions. Current Opinion in **Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 1, p. 41-60, 2011.

PARK, Hye Rin; RHO, Shin-Joung; KIM, Yong-Ro. Solubility, stability, and bioaccessibility improvement of curcumin encapsulated using 4- α -glucanotransferase-modified rice starch with reversible pH-induced aggregation property. **Food Hydrocolloids**, v. 95, p. 19-32, 2019

PETKOWICZ, C. L. O.; VRIESMANN, L. C.; WILLIAMS, P. A. Pectins from food waste: Extraction, characterization and properties of watermelon rind pectin. **Food Hydrocolloids**, 65, p. 57-67, 2017.

PHIWCHAI, Isara et al. Tannic acid (TA): A molecular tool for chelating and imaging labile iron. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 114, p. 64-73, 2018.

POLEKKAD, Abhinash et al. Microencapsulation of zinc by spray-drying: Characterisation and fortification. **Powder Technology**, v. 381, p. 1-16, 2021.

QUINTANA, Gabriel et al. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* in W/O emulsions of okara oil and block-copolymers of poly (acrylic acid) and pluronic using microfluidic devices. **Food Research International**, v. 140, p. 110053, 2021.

RALET, Marie-Christine et al. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. **Carbohydrate research**, v. 336, n. 2, p. 117-125, 2001.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REZAEINIA, Hassan et al. Electrohydrodynamic atomization of Balangu (*Lallemantia royleana*) seed gum for the fast-release of *Mentha longifolia* L. essential oil: Characterization of nano-capsules and modeling the kinetics of release. **Food Hydrocolloids**, v. 93, p. 374-385, 2019.

RODRÍGUEZ-FRANCO, D. A; VÁZQUEZ-MORENO, L; RAMOS-CLAMONT, M. G. Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. Revista **Latino-americana de Microbiología**, v. 47, p. 101-111, 2005.

ROY, Manik Chandra et al. Extraction and characterization of pectin from pomelo peel and its impact on nutritional properties of carrot jam during storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 1, p. e13411, 2018.

RUDKE, Adenilson Renato et al. Microencapsulation of ergosterol and *Agaricus bisporus* L. extracts by complex coacervation using whey protein and chitosan: Optimization study using response surface methodology. **LWT**, v. 103, p. 228-237, 2019.

SADEGHI, M. Synthesis of a biocopolymer carrageenan-g-poly (AAm-co-IA)/montmorillonite superabsorbent hydrogel composite. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 29, n. 2, p. 295-305, 2012.

SAHINER, Nurettin. Self-Crosslinked Ellipsoidal Poly (Tannic Acid) Particles for Bio-Medical Applications. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2429, 2021.

SAKAI, Takuo et al. Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. In: *Advances in applied microbiology*. **Academic Press**, 1993. p. 213-294.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: uma alternativa viável, Biotecnologia, ciência e desenvolvimento. Brasília, n. 16, p. 26-30, 2001. Disponível em: <http://docplayer.com.br/5884268-Microcapsulas-uma-alternativa-viavel.html> . Acesso em: 25 set. 2019.

SANTOS, Monique Barreto; DE CARVALHO, Carlos Wanderlei Piler; GARCIA-ROJAS, Edwin Elard. Microencapsulation of vitamin D3 by complex coacervation using carboxymethyl tara gum (*Caesalpinia spinosa*) and gelatin A. **Food Chemistry**, v. 343, p. 128529, 2021.

SERRANO, M. E. D. Lactoferrina: producción industrial y aplicaciones. Revista **Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, v. 38, n. 3, p. 30-38, 2007.

SHADDEL, Rezvan et al. Double emulsion followed by complex coacervation as a promising method for protection of black raspberry anthocyanins. **Food hydrocolloids**, v. 77, p. 803-816, 2018.

SHAH, Bakht Ramin; XU, Wei; MRÁZ, Jan. Fabrication, stability and rheological properties of zein/chitosan particles stabilized Pickering emulsions with antioxidant activities of the encapsulated vit-D3. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021.

SHAHIDI, Fereidoon; HAN, Xiao-Qing. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SHISHIR, Mohammad Rezaul Islam et al. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*, v. 78, p. 34-60, 2018.

SINGLETON, Vernon L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOUZA, Clitor JF et al. Complex coacervates obtained from interaction egg yolk lipoprotein and polysaccharides. **Food hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 375-381, 2013.

SOUZA, Clitor JF et al. Microencapsulation of lactase by W/O/W emulsion followed by complex coacervation: Effects of enzyme source, addition of potassium and core to shell ratio on encapsulation efficiency, stability and kinetics of release. **Food Research International**, v. 121, p. 754-764, 2019.

SOUZA, Clitor JF; GARCIA-ROJAS, Edwin E. Interpolymeric complexing between egg white proteins and xanthan gum: Effect of salt and protein/polysaccharide ratio. **Food Hydrocolloids**, v. 66, p. 268-275, 2017.

SOYOCAK, A. et al. Tannic acid exhibits anti-inflammatory effects on formalin-induced paw edema model of inflammation in rats. **Human & experimental toxicology**, v. 38, n. 11, p. 1296-1301, 2019.

SP, Nipin et al. Tannic acid promotes TRAIL-induced extrinsic apoptosis by regulating mitochondrial ROS in human embryonic carcinoma cells. **Cells**, v. 9, n. 2, p. 282, 2020.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente/Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

TAGLIAZUCCHI, Davide et al. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 599-606, 2010.

TALÓN, Emma et al. Encapsulation of eugenol by spray-drying using whey protein isolate or lecithin: Release kinetics, antioxidant and antimicrobial properties. **Food chemistry**, v. 295, p. 588-598, 2019.

TAVARES, Loleny; SANTOS, Lúcia; NOREÑA, Caciano Pelayo Zapata. Microencapsulation of organosulfur compounds from garlic oil using β -cyclodextrin and complex of soy protein isolate and chitosan as wall materials: A comparative study. **Powder Technology**, 2021.

THAKUR, Beli R. et al. Chemistry and uses of pectin—a review. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 47-73, 1997.

THAKUR, N. S. et al. Microencapsulation of wild pomegranate flavedo phenolics by lyophilization: Effect of maltodextrin concentration, structural morphology, functional properties, elemental composition and ingredient for development of functional beverage. **LWT**, v. 133, p. 110077, 2020.

TIMILSENA, Y. P.; HAQUE, M. A.; ADHIKARI, B. Encapsulation in the Food Industry: A Brief Historical Overview to Recent Developments. **Food and Nutrition Sciences**, Vol.11No.06, p. 28, 2020.

TIMILSENA, Yakindra Prasad et al. Digestion behaviour of chia seed oil encapsulated in chia seed protein-gum complex coacervates. **Food hydrocolloids**, v. 66, p. 71-81, 2017.

TIMILSENA, Yakindra Prasad 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.

TOLUN, Aysu; ARTIK, Nevzat; ALTINTAS, Zeynep. Effect of different microencapsulating materials and relative humidities on storage stability of microencapsulated grape pomace extract. **Food chemistry**, v. 302, p. 125347, 2020.

TUCCI, Sonia A.; BOYLAND, Emma J.; HALFORD, Jason CG. The role of lipid and carbohydrate digestive enzyme inhibitors in the management of obesity: a review of current and emerging therapeutic agents. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 3, p. 125, 2010.

ULU, Ahmet; BIRHANLI, Emre; ATEŞ, Burhan. Tunable and tough porous chitosan/ β -cyclodextrin/tannic acid biocomposite membrane with mechanic, antioxidant, and antimicrobial properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021.

VARGAS, Sara A. et al. High-intensity ultrasound pretreatment influence on whey protein isolate and its use on complex coacervation with kappa carrageenan: Evaluation of selected functional properties. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 70, p. 105340, 2021.

VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, Gustavo R. et al. Encapsulation and stability of a phenolic-rich extract from mango peel within water-in-oil-in-water emulsions. **Journal of functional foods**, v. 56, p. 65-73, 2019.

VILLANUEVA, Ronald D.; MONTAÑO, Marco Nemesio e. Fine chemical structure of carrageenan from the commercially cultivated kappaphycus striatum (sacol variety) (solieriaceae, gigartinales, rhodophyta) 1. **Journal of phycology**, v. 39, n. 3, p. 513-518, 2003.

WANG, Bo et al. Preparation and study of digestion behavior of lactoferrin-sodium alginate complex coacervates. **Journal of functional foods**, v. 37, p. 97-106, 2017.

WEI, Zihao; HUANG, Qingrong. Assembly of protein-polysaccharide complexes for delivery of bioactive ingredients: A perspective paper. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 5, p. 1344-1352, 2019.

XIONG, Wenfei et al. Thermodynamic parameters of gelatin-pectin complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, p. 106958, 2021.

XU, Gang et al. One-step anchoring of tannic acid-scaffolded bifunctional coatings of antifouling and antimicrobial polymer brushes. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 1, p. 1786-1795, 2018.

XU, Yuting et al. Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. **Journal of Food Engineering**, v. 126, p. 72-81, 2014.

YABE, Tomio. New understanding of pectin as a bioactive dietary fiber. **Journal of Food Bioactives**, v. 3, p. 95-100, 2018.

YAPO, Beda M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 373-385, 2011.

YILDIZ, Gulcin et al. Microencapsulation of docosahexaenoic acid (DHA) with four wall materials including pea protein-modified starch complex. **International journal of biological macromolecules**, v. 114, p. 935-941, 2018.

YINBIN, Li et al. Effect of different encapsulating agent combinations on physicochemical properties and stability of microcapsules loaded with phenolics of plum (*Prunus salicina* lindl.). **Powder technology**, v. 340, p. 459-464, 2018.

YUAN, Yang et al. Complex coacervation of soy protein with chitosan: Constructing antioxidant microcapsule for algal oil delivery. **LWT**, v. 75, p. 171-179, 2017.

ZHAI, Zhaolan et al. Ultra-stable soybean oil-in-water emulsions stabilized by a polymeric surfactant derived from soybean oil. **Industrial Crops and Products**, v. 160, p. 113093, 2021.

ZHANG, Ka et al. Synthesis and release studies of microalgal oil-containing microcapsules prepared by complex coacervation. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, p. 61-66, 2012.

ZHAO, C.; WEI, L.; YIN, B.; LIU, F. et al. Encapsulation of lycopene within oil-in-water nanoemulsions using lactoferrin: Impact of carrier oils on physicochemical stability and bioaccessibility. **International Journal of Biological Macromolecules**, 153, p. 912-920, 2020/06/15/ 2020.

ZHAO, Wei et al. Microencapsulation of tannic acid for oral administration to inhibit carbohydrate digestion in the gastrointestinal tract. **Food & function**, v. 4, n. 6, p. 899-905, 2013.

ZHENG, J.; TANG, C.-h.; SUN, W. Heteroprotein complex coacervation: focus on experimental strategies to investigate structure formation as a function of intrinsic and external physicochemical parameters for food applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, p. 102268, 2020/09/14/ 2020.