

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

DISSERTAÇÃO

ENCAPSULAÇÃO DA VITAMINA C POR COACERVAÇÃO COMPLEXA
EMPREGANDO GOMA XANTANA E PROTEÍNA COMO MATERIAL DE
PAREDE

Aline Cortines de Almeida Guena

2019



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

**ENCAPSULAÇÃO DA VITAMINA C POR COACERVAÇÃO COMPLEXA
EMPREGANDO GOMA XANTANA E PROTEÍNA COMO MATERIAL DE
PAREDE**

Aline Cortines de Almeida Guena

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

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

Seropédica, RJ
Agosto, 2019

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

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

G924e Guena, Aline Cortines de Almeida, 1986-
Encapsulação da vitamina C por coacervação complexa empregando goma xantana e proteína como material de parede. / Aline Cortines de Almeida Guena. - Rio de Janeiro, 2019.
83 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, 2019.

1. Ácido ascórbico. 2. Polissacarídeo aniônico. 3. Lactoferrina. 4. Gelatina de porco. 5. Complexos coacervados. I. Garcia-Rojas, Edwin Elard, 1972-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos III. Título.

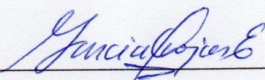
***O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.***

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

ALINE CORTINES DE ALMEIDA GUENA

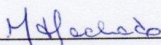
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 08/08/2019

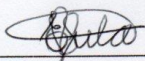


Edwin Elard Garcia-Rojas (Dr.) UFF. RJ

(Orientador)



Mariana Teixeira da Costa Machado (Dr.^a) UFRRJ. RJ



Eliana da Silva Gulão (Dr.^a) UFRJ. RJ

RESUMO

A microencapsulação é utilizada no setor alimentício para a proteção de compostos bioativos suscetíveis à degradação durante o processamento, como o ácido ascórbico, que é uma vitamina com propriedades antioxidantes, mas altamente instável. Biopolímeros vem sendo empregados como materiais de revestimento devido a sua influência na formação e estabilização de microcápsulas através da técnica de coacervação complexa. A microencapsulação do ácido ascórbico o protege, possibilitando a sua aplicação em novos alimentos e prevenindo alterações sensoriais indesejáveis no produto aplicado. O objetivo deste trabalho foi a produção de microcápsulas de ácido ascórbico formadas por emulsificação dupla seguida de coacervação complexa da goma xantana com duas proteínas diferentes: lactoferrina ou gelatina tipo A. Os complexos coacervados tiveram sua formação avaliada em relação ao pH e à razão dos biopolímeros por potencial zeta e turbidimetria. Os coacervados formados entre a proteína e o polissacarídeo na proporção de 6 : 1 em pH 5,0 para o sistema contendo lactoferrina e na proporção de 2 : 1 em pH 4,0 para o sistema com gelatina, foram os que apresentaram os melhores rendimentos, assim, foram aplicados para a microencapsulação usando diferentes proporções de núcleo e material de parede. Foi feita a caracterização morfológica, de estabilidade e térmica, por TGA e DSC, das microcápsulas contendo 75% de núcleo em relação à concentração de biopolímeros no material de parede formado pelo complexo coacervado entre a goma xantana e proteínas, as quais apresentaram as melhores eficiências de encapsulação neste estudo, de $83,19 \pm 0,37$ % para a lactoferrina e $73,60 \pm 0,71$ %, para a gelatina. Embora uma maior eficiência de encapsulação tenha sido obtida pelo sistema contendo a lactoferrina, o melhor desempenho geral do estudo foi alcançado pelas microcápsulas contendo gelatina, que apresentaram melhor estabilidade e propriedades térmicas, proporcionando uma melhor proteção do ácido ascórbico durante pelo menos 30 dias, mantidas em temperatura ambiente. Em ambos os sistemas de microcápsulas avaliados, houve aumento da estabilidade térmica, em comparação ao ácido ascórbico não encapsulado, através da coacervação complexa entre os biopolímeros, o que possibilitaria sua aplicação em produtos alimentícios submetidos ao aquecimento, como pães, biscoitos ou hamburguers.

Keywords: Ácido ascórbico, Polissacarídeo aniônico, Lactoferrina, Gelatina de porco, Complexos coacervados.

ABSTRACT

Microencapsulation is used in the food technology to protect bioactive compounds susceptible to degradation during processing, such as ascorbic acid, which is a vitamin with antioxidant properties but highly unstable. Biopolymers have been used as wall materials because of their influence on the formation and stabilization of microcapsules through the complex coacervation technique. The microencapsulation of ascorbic acid protects it, enables its application in new foods and prevents undesirable sensorial changes. The aim of this work was the production of ascorbic acid microcapsules formed by double emulsification followed by complex coacervation of xanthan gum with two different proteins: lactoferrin or type A gelatine. The coacervate complexes had their formation evaluated in relation to the pH and the ratio of the biopolymers by zeta potential and turbidimetry. The coacervates formed between protein and xanthan at a ratio of 6 : 1 at pH 5.0 for the lactoferrin-containing system and at a ratio of 2 : 1 at pH 4.0 for the gelatin system were the ones with the best performance. Thus, they were applied for microencapsulation using different proportions of core and wall material. The morphological, stability and thermal characterization by TGA and DSC were assessed for the microcapsules with 75% core in relation to the total concentration of the wall material, which showed the best encapsulation efficiencies in this study, $83.19 \pm 0.37\%$ for lactoferrin and $73.60 \pm 0.71\%$ for gelatin. Although higher encapsulation efficiency was obtained by the lactoferrin-containing system, the best overall performance of the study was achieved by microcapsules containing gelatin, which showed better stability and thermal properties, providing better protection of ascorbic acid for at least 30 days at room temperature. In both microcapsule systems studied, there was an increase in thermal stability, compared to free ascorbic acid, provided by the complex coacervation between biopolymers, which would allow the application of these capsules in food products, such as breads, cookies or hamburgers.

Keywords: Ascorbic acid, Anionic polysaccharide, Lactoferrin, Pig gelatin, Complex coacervates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microcápsulas e microsferas com diferentes morfologias: (a) microcápsula, (b) microsfera, (c) microcápsula multicamadas mononucleada, (d) microsfera polinucleada multicamadas	14
Figura 2: Interações possíveis entre biopolímeros em solução.	17
Figura 3: Fenômenos relacionados à instabilidade de emulsões.	25
Figura 4: Coacervação complexa após dupla emulsificação do tipo água-em-óleo-em-água (A1/O/A2).	26
Figura 5: Esquema da estrutura química da lactoferrina bovina.	28
Figura 6: Estrutura química da gelatina.	29
Figura 7: Estrutura química da goma xantana.	30
Figura 8: Estrutura química do ácido ascórbico.	31
Figura 9: Diagrama de fluxo de preparação das microcápsulas de AA.	38
Figura 10: Potencial ζ da GX e potencial ζ da LF em diferentes valores de pH e valores de FIE.	43
Figura 11: Potencial ζ dos complexos coacervados entre GX e LF em diferentes razões em valor de pH fixo igual a 4,0.	44
Figura 12: Turbidez dos complexos coacervados entre GX e LF em diferentes valores de pH na razão fixa de 1:6 entre a proteína e o polissacarídeo.	44
Figura 13: Potencial ζ dos complexos coacervados entre GX e LF em diferentes valores de pH na razão fixa de 1:6 entre a proteína e o polissacarídeo.	45
Figura 14: Potencial ζ da GX e potencial ζ da GE-A em diferentes valores de pH e valores de FIE.	46
Figura 15: Potencial ζ dos complexos coacervados entre GX e GE em diferentes razões em valor de pH fixo igual a 4,0.	46
Figura 16: Turbidez dos complexos coacervados entre GX e GE em diferentes valores de pH na razão fixa de 1:2 entre a proteína e o polissacarídeo.	47
Figura 17: Potencial ζ dos complexos coacervados entre GX e GE em diferentes valores de pH na razão fixa de 1:2 entre a proteína e o polissacarídeo.	47
Figura 18: Emulsões primárias contendo óleo de milho e o AA disperso: (a) sistema com GE; (b) sistema com LF. Imagens realizadas em microscópio óptico, com aumento de 100x.	48
Figura 19: (a) Emulsão dupla feita a partir da proteína GE; (b) Emulsão dupla feita a partir da proteína LF. Imagens realizadas em microscópio óptico, com aumento de 100x.	49
Figura 20: Microcápsulas de AA coacervadas por (a) complexo entre GX e GE; (b) complexo entre GX e LF. Imagens realizadas em microscópio óptico, com aumento de 100x.	50
Figura 21: Estabilidade do AA armazenado a 25°C em presença de O ₂ . Os dados representam a média \pm desvio padrão (n = 3).	54
Figura 22: Espectros de FTIR referentes à GX pura, GE pura, AA puro e microcápsulas de AA formadas pelo complexo entre GX e GE.	56
Figura 23: Espectros de FTIR referentes à GX pura, LF pura, AA puro e microcápsulas de AA formadas pelo complexo entre GX e LF.	58
Figura 24: Análise de TGA para as microcápsulas formadas do complexo GX e LF e padrões.	59
Figura 25: Análise de TGA para as microcápsulas formadas do complexo GX e GE e padrões.	60
Figura 26: DTG para as microcápsulas de AA formadas pelo complexo coacervado entre GE e GX e padrões.	61

Figura 27: DTG para as microcápsulas de AA formadas pelo complexo coacervado entre LF e GX e padrões.	62
Figura 28: Análise de DSC para os padrões LF, GE-A, GX e AA.	63
Figura 29: Análise de DSC para as microcápsulas formadas do complexo GX e proteínas (LF ou GE-A).	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos recentes de microencapsulação por coacervação complexa.	19
Tabela 2: Microencapsulação do ácido ascórbico através de diferentes técnicas.	33
Tabela 3: Teores de BP no MP e AA no N em cada tratamento realizado para as microcápsulas formadas pelo complexo coacervado entre GX e LF na proporção de 1:6, adotando-se uma base de cálculos igual a 100g.	37
Tabela 4: Teores de BP no MP e AA no N em cada tratamento realizado para as microcápsulas formadas pelo complexo coacervado entre GX e GE-A na proporção de 1:2, adotando-se uma base de cálculos igual a 100g.	37
Tabela 5: Eficiência de microencapsulação do AA para tratamentos do sistema GX e GE-A na razão de 1:2 entre o polissacarídeo e a proteína.	52
Tabela 6: Eficiência de microencapsulação do AA obtida para tratamentos do sistema GX e LF na razão de 1:6 entre o polissacarídeo e a proteína.	53

NOMENCLATURA/ABREVIATÖES

AA	– ácido ascórbico
A/O/A	– emulsão água-em-óleo-em-água
A/O	– emulsão água-em-óleo
BP	– biopolímero
DSC	– calorimetria diferencial de varredura
EE%	– eficiência de encapsulação (%)
FTIR	– espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GA	– goma arábica
GE	– gelatina
GE-A	– gelatina tipo A
GE-B	– gelatina tipo B
LF	– lactoferrina
MC_GE_GX	– microcápsulas de ácido ascórbico formadas pelo complexo coacervado entre a gelatina e a goma xantana
MC_LF_GX	– microcápsulas de ácido ascórbico formadas pelo complexo coacervado entre a lactoferrina e a goma xantana
MM	– massa molar
MP	– material de parede
NaCl	– cloreto de sódio
O/A	– emulsão óleo-em-água
pH	– potencial de hidrogênio
pI	– ponto isoelétrico
Potencial ζ ,	– potencial zeta
T	– transmitância
T	– turbidez
TGA	– análise termogravimétrica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3	REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1	Microencapsulação	14
3.1.1	Técnicas de Microencapsulação	15
3.2	Coacervação Complexa	16
3.2.1	Conceito	16
3.2.2	Coacervação complexa: Processo de microencapsulação	18
3.2.2.1	Emulsões e sua instabilidade	24
3.2.2.2	Microencapsulação por coacervação complexa de compostos hidrofílicos precedida de dupla emulsificação	25
3.3	Material de parede a partir de biopolímeros	27
3.3.1	Biopolímeros	27
3.3.1.1	Proteínas	27
3.3.1.1.1	Lactoferrina	27
3.3.1.1.2	Gelatina	28
3.3.1.2	Polisacarídeos	30
3.3.1.2.1	Goma xantana	30
3.4	Composto bioativo: ácido ascórbico	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Materiais	34
4.2	Métodos	34
4.2.1	Determinação da massa molar da GX e da GE-A pelo método viscosimétrico	34
4.2.2	Formação dos complexos coacervados entre a LF e GX e entre a GE-A e GX	35
4.2.2.1	Preparo das soluções	35
4.2.2.2	Titulação Turbidimétrica	35
4.2.2.3	Potencial ζ	36
4.2.2.4	Cálculo da Força de Interação Eletrostática (FIE)	36
4.2.3	Microencapsulação do ácido ascórbico	36
4.2.3.1	Preparo das microcápsulas	36
4.2.3.2	Análise da vitamina c por titulação	39
4.2.3.3	Eficiência de Encapsulação (EE %)	39
4.2.4	Caracterização morfológica, de estabilidade e térmica das microcápsulas de AA formadas por coacervação complexa entre LF e GX e entre GE-A e GX	40

4.2.4.1	Morfologia	40
4.2.4.2	Estabilidade das microcápsulas	40
4.2.4.3	Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR)	40
4.2.4.4	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	40
4.2.4.5	Análise Termogravimétrica (TGA)	41
4.2.5	Tratamento estatístico	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Determinação da Massa molar dos biopolímeros	42
5.2	Determinação do pH ótimo de formação dos complexos coacervados e da razão ideal entre os biopolímeros : Potencial ζ, e Turbidez	42
5.3	Microencapsulação do ácido ascórbico	48
5.3.1	Formação e estabilização de emulsões	48
5.3.2	Formação das microcápsulas por coacervação complexa após a emulsificação	50
5.4	Eficiência de encapsulação	51
5.5	Estabilidade das microcápsulas	54
5.6	Análise de Infravermelho (FTIR)	55
5.7	Análises térmicas	58
5.7.1	TGA	58
5.7.2	DSC	62
6	CONCLUSÃO	65
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico (AA) ou vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel encontrada naturalmente em diversas frutas cítricas. Desempenha no organismo humano funções fisiológicas importantes, como a formação de fibras colágenas existentes em praticamente todos os tecidos do corpo e prevenção de doenças como escorbuto. Sua ingestão diária recomendada é de cerca de 100 miligramas, sendo requeridas doses um pouco maiores em alguns casos especiais como infecções, gestação ou amamentação (LAM et al., 2014, PALMA-RODRÍGUEZ et al., 2013, WILSON, SHAH, 2007). Seu vasto emprego na indústria alimentícia se deve as suas propriedades antioxidantes, prevenindo a ocorrência de alterações químicas e sensoriais indesejáveis em diversos produtos (ALVIM et al., 2016, ABBAS et al., 2012). Apesar de seus benefícios nutricionais e tecnológicos, o ácido ascórbico é um composto altamente instável em presença de oxigênio, variações de pH e elevadas temperaturas usualmente empregadas durante o processamento de alimentos, como pasteurização e assamento. Desse modo, é fundamental a sua proteção contra a degradação térmica, bem como contra a formação de produtos tóxicos como furanos (FARIAS et al., 2018, ALVIM et al., 2016, SABERIAN et al., 2013).

Um dos recursos mais utilizados para a proteção de compostos vulneráveis é a microencapsulação, que consiste em revestir um ativo de interesse, chamado de núcleo (N) por um material chamado de material de parede (MP) (KARIM et al., 2017, MARTINS et al., 2009). Diversas técnicas podem ser aplicadas para a microencapsulação de compostos bioativos, como o spray-drying, a emulsificação, a gelificação iônica ou a coacervação complexa. Sua escolha implica em diferentes características das microcápsulas obtidas, como tamanho das partículas, morfologia e eficiência de microencapsulação (OZKAN et al., 2019, CARVALHO et al., 2016, NAZZARO et al., 2012).

O processo de microencapsulação por coacervação complexa consiste na separação de fases de hidrocolóides a partir de uma solução inicial, seguida da deposição da fase coacervada desenvolvida em torno do composto emulsificado no mesmo meio reacional, finalizando-se com o devido ajuste do pH e da temperatura. Uma etapa opcional pode ser posteriormente realizada para a consolidação das microcápsulas, através do uso de agentes reticulantes ou *crosslinkers*, como o glutaraldeído e o formaldeído (ERATTE et al., 2018 ALOYS et al., 2016, TRIFKOVIĆ et al., 2016, ACH et al., 2015, JAMEKHORSHID et al., 2014, MARTINS et al., 2009).

A técnica de coacervação complexa apresenta diversas vantagens como elevada eficiência de microencapsulação, além de excelentes propriedades de liberação e resistência mecânica, tornando viável a microencapsulação de compostos voláteis como aromas e óleos essenciais, de microrganismos probióticos e de substâncias lábeis pois são realizadas condições brandas de operação, em que não há emprego de elevadas temperaturas nem são utilizados solventes orgânicos (TIMILSENA et al., 2019, COMUNIAN et al., 2018, ERATTE et al., 2018, TRIFKOVIĆ et al., 2016, DA SILVA et al., 2015, XIAO et al., 2014). Compostos bioativos hidrofílicos como o ácido ascórbico (DA CRUZ et al., 2019, DA CRUZ et al., 2018, COMUNIAN et al., 2013), enzimas (SOUZA et al., 2018c), edulcorantes (SANTOS et al., 2015, ROCHA-SELMI et al., 2013), antocianinas (SHADDEL et al., 2018) vem sendo frequentemente microencapsulados por coacervação complexa entre biopolímeros, precedida de dupla emulsificação.

O uso de biopolímeros (BPs) para microencapsulação por coacervação complexa vem sendo extensivamente feito, dada a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixo custo e abundância na natureza. Os mais utilizados são polissacarídeos, como a κ -carragena e o alginato; gomas como a arábica e xantana e ainda proteínas, como a gelatina e proteínas do leite. Quando associados podem ser obtidas propriedades diversificadas e otimizadas em relação ao custo, resistência, morfologia e eficiência de microencapsulação (KUMAR et al., 2018, PRAMANAIK, GANGULY, 2017, CAZÓN et al., 2017, ROKKA, RANTAMÄKI, 2010, DAMODARAN et al., 2010).

A goma xantana (GX) é um hidrocolóide poli-eletrólito com que vem sendo largamente empregada para a estabilização de emulsões e proteção de compostos bioativos (FU et al., 2019, VICENTE et al., 2018), tendo sido também utilizada para a microencapsulação por coacervação complexa do óleo de palma rico em carotenoides (RUTZ et al., 2017). A lactoferrina (LF) é uma glicoproteína de ligação com o ferro, com propriedades imunomodulatória e anti-inflamatória (GULÃO et al., 2018, SANTOS et al., 2018a), que juntamente com a β -Lactoglobulina, foi empregada para a coacervação complexa heteroproteica da vitamina B9 (CHAPEAU et al., 2016). A gelatina (GE) é uma proteína abundante preparada a partir da degradação hidrolítica do colágeno, que vem sendo amplamente utilizada na coacervação complexa para a microencapsulação de diversos compostos, como protocianidinas (DE SOUZA et al., 2018), vitaminas (JANNASARI et al., 2019, DA CRUZ et al., 2019), probióticos (ZHAO et al., 2018), óleo de atum (WANG et al., 2014), óleo de gengibre (WANG et al., 2016), etc. Recentemente há um interesse considerável na identificação de novos complexos entre proteínas e polissacarídeos para estabilização de emulsões e formação de complexos coacervados com potencial de aplicação em microencapsulação de biocompostos (TIMILSENA et al., 2019, ANAL et al., 2019, EGHBAL, CHOUDHARY, 2018, EVANS et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi microencapsular o ácido ascórbico através da técnica de coacervação complexa empregando biopolímeros goma xantana e proteína (lactoferrina ou gelatina) como material de revestimento.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência do pH e da proporção dos biopolímeros na formação dos complexos coacervados formados entre a lactoferrina e goma xantana e entre a gelatina e goma xantana;
- Verificar a viabilidade da técnica de coacervação complexa empregando goma xantana e gelatina e também goma xantana e lactoferrina para a microencapsulação do ácido ascórbico;
- Estudar as propriedades morfológicas, térmicas e de estabilidade das microcápsulas contendo o ácido ascórbico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Microencapsulação

A microencapsulação é uma tecnologia que consiste em revestir um ativo de interesse, que pode ser sólido, líquido ou gasoso, chamado de núcleo, por um material chamado de material de revestimento ou material de parede (KARIM et al., 2017, MARTINS et al., 2009). Em uma microcápsula, o material de parede deve apenas envolver o núcleo. Quando há presença de núcleo no material de parede o sistema é denominado de microesfera, podendo, neste caso, haver interação entre eles (PAULO, SANTOS, 2017, AGNIHOTRI et al., 2012). Microcápsulas e microesferas podem apresentar morfologias diversas, conforme ilustrado na Figura 1.

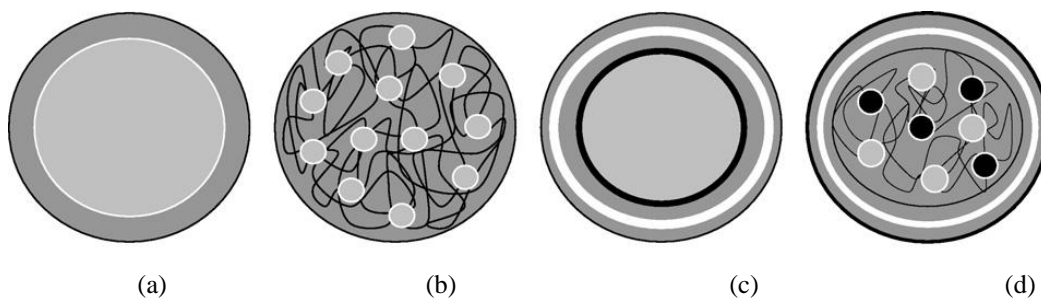


Figura 1: Microcápsulas e microesferas com diferentes morfologias: (a) microcápsula, (b) microesfera, (c) microcápsula multicamadas mononucleada, (d) microesfera polinucleada multicamadas
Fonte: NESTERENKO et al., 2013.

Em geral as microcápsulas possuem um tamanho variável entre 1 – 1000 μm (YE et al., 2018, PAULO, SANTOS, 2017). O recurso da microencapsulação é utilizado por diversos setores, com grande destaque para o segmento farmacêutico, seguido do alimentício, cosmético e têxtil (PAULO, SANTOS, 2017, ALOYS et al., 2016, AGNIHOTRI et al., 2012) com diferentes propósitos, como proteção, isolamento ou liberação controlada (YE et al., 2018, GHAYEMPOUR, MONTAZER, 2016). O núcleo permanece retido na microcápsula por período de tempo variável conforme a necessidade de revestimento e o sistema empregado (CARVALHO et al., 2016, SACHAN et al., 2006), podendo ser liberado da matriz encapsulante de diversas maneiras, em resposta a estímulos externos como alterações de temperatura, na umidade ou no pH, ou através da ação de enzimas (TIMILSENA et al., 2017, NESTERENKO et al., 2013), por meio de diferentes mecanismos, como difusão, dissolução ou erosão (GHAYEMPOUR, MONTAZER, 2016, COMUNIAN, FAVARO-TRINDADE, 2016, AGNIHOTRI et al., 2012, SACHAN et al., 2006).

A microencapsulação é um processo vastamente empregado na área de ciência, tecnologia e biotecnologia de alimentos (TIMILSENA et al., 2019, PRAMANIK, GANGULY, 2017, NAZZARO et al., 2012) permitindo a otimização nutricional de diversos alimentos através de variados mecanismos, seja por meio da redução de determinados constituintes indesejados, como sais, açúcares ou gorduras trans, seja pela redução de calorias ou ainda pela introdução de compostos promotores de benefícios à saúde, como vitaminas, compostos fenólicos de ação antioxidante, prebióticos como a inulina e microrganismos probióticos (EGHBAL, CHOUDHARY, 2018, ERATTE et al., 2015).

A proteção em relação ao pH gastrointestinal é uma das principais justificativas para o emprego da microencapsulação em alimentos. O alimento pode permanecer de 5

minutos a 2 horas no estômago, cujo pH varia de 1 a 2,5. Após passar pelo estômago, as microcápsulas devem entrar no intestino delgado, cujo pH varia entre 6,15 a 7,35 (COOK et al., 2012). Desse modo, microcápsulas contendo microrganismos probióticos ou biocompostos conseguem atravessar o trato gástrico e promover a liberação no intestino, através da variação do pH nessas regiões, o que aumenta a absorção desses elementos pelo organismo (EGHBAL, CHOUDHARY, 2018, RAEI et al., 2017, ADITYA et al., 2017, COMUNIAN, FAVARO-TRINDADE, 2016, COOK et al., 2012). Além da proteção ao pH gastrointestinal, a microencapsulação proporciona a microrganismos probióticos e biocompostos adequada proteção contra fatores associados à sua menor sobrevivência, como teores de oxigênio dissolvido, acidez, temperatura e tempo de armazenamento durante a vida útil do alimento (HOLKEM et al., 2017).

Através da microencapsulação é possível proteger compostos susceptíveis a degradação, como as vitaminas, de fatores responsáveis pela sua instabilidade, como a luz, umidade e oxigênio. O uso da microencapsulação evita adicionalmente alterações sensoriais indesejáveis, mascarando aromas e odores desagradáveis e prevenindo alterações de cor, além de promover melhoras na solubilidade e dissolução de diversos compostos (CAI et al., 2019, DE SOUZA et al., 2018, PARTHASARATHI, ANANDHARAMAKRISHNAN, 2016).

A microencapsulação possibilita a incorporação de compostos hidrossolúveis em matrizes lipofílicas e vice-versa. Adicionalmente, propicia melhoras na biodisponibilidade desses compostos (FU et al., 2019, LIU, WANG, MCCLEMENTS et al., 2018, ADITYA et al., 2017). Esta tecnologia vem sendo empregada de modo bem sucedido para a preservação de produtos naturais de interesse farmacológico (SERVAT et al., 2010), enzimas (SOUZA et al., 2018b, MCCLEMENTS, 2018) bem como para o aumento da biodisponibilidade oral de biocompostos como o beta-caroteno (FU et al., 2019) e a vitamina E (PARTHASARATHI, ANANDHARAMAKRISHNAN, 2016). Portanto é uma das principais ferramentas para a produção e desenvolvimento de alimentos funcionais (ANAL et al., 2019, ERATTE et al., 2018, ADITYA et al., 2017).

3.1.1 Técnicas de Microencapsulação

Diversas técnicas podem ser aplicadas para a microencapsulação de compostos bioativos, podendo ser utilizados processos físicos, como spray-drying ou evaporação de solventes; processos químicos, como polimerização e complexos de inclusão; ou ainda processos físico-químicos, como a gelificação iônica ou a coacervação complexa (OZKAN et al., 2019, CARVALHO et al., 2016, NESTERENKO et al., 2013). O procedimento geral de preparo das microcápsulas envolve a incorporação do ativo numa matriz carreadora, seguida da dispersão dessa matriz, usualmente por emulsificação ou suspensão e finalizada com a estabilização das microcápsulas (TRIFKOVIĆ et al., 2016, BURGAIN et al., 2011).

A técnica empregada para a microencapsulação apresenta significativa influência no tamanho, morfologia, porosidade, eficiência de microencapsulação, conteúdo de umidade das partículas obtidas (NAZZARO et al., 2012, DONHOWE et al., 2014). O tamanho das partículas obtidas para a microencapsulação de compostos bioativos e de probióticos, por exemplo, é um parâmetro fundamental na escolha da técnica. Maiores partículas acarretam em menor estabilidade na formulação e piores percepções sensoriais. Entretanto, uma vez que as células precisam ser mantidas vivas, viáveis e em

quantidade adequada, o uso da nanotecnologia não é a opção mais viável para a encapsulação de probióticos (BURGAIN, 2011, NAZZARO et al., 2012).

É possível a microencapsulação de diversos compostos bioativos por meio da técnica de emulsificação (ANAL et al., 2019, LU et al., 2016). Por exemplo, a técnica de dupla emulsificação, através de emulsões duplas do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) possibilitou a co-encapsulação de compostos hidrofílicos, como polifenóis e antocianinas obtidas do bagaço de mirtilo (BAMBA et al., 2018) e também de biocompostos de polaridades distintas entre si, como a curcumina (hidrofóbica) e a catequina (hidrofílica) (ADITYA et al., 2015), a quercetina (hidrofóbica) e a epigallocatequina-3-galato (hidrofílica) (CHEN, MCCLEMENTS, WANG et al., 2018). Além disso, o uso conjunto da técnica de emulsificação com complexos formados a partir de interações eletrostáticas entre proteínas e polissacarídeos, promoveu benefícios adicionais de estabilização do sistema e de proteção do composto, como aumento da estabilidade química e da bioacessibilidade do núcleo (LIU, WANG, MCCLEMENTS et al., 2018, CHEN, YUE, LIU et al., 2018).

Uma outra técnica amplamente utilizada para a microencapsulação de ingredientes alimentares por conta de sua rapidez e baixo custo é a técnica de spray drying, que consiste na atomização de uma emulsão ou uma suspensão contendo o ativo, contra uma corrente de ar quente, resultando numa rápida evaporação da água, obtendo-se assim as microcápsulas na forma de pó seco (CARNEIRO et al., 2013, ROKKA, RANTAMÄKI, 2010, GHARSALLAOUI et al., 2007). No entanto, as elevadas temperaturas empregadas durante o processo de spray drying podem muitas vezes inviabilizar a sua utilização para substâncias termolábeis como vitaminas (DA CRUZ et al., 2019, PARTHASARATHI, ANANDHARAMAKRISHNAN, 2016), aromas e óleos essenciais (KROUPANTIS et al., 2016, GHARSALLAOUI et al., 2007) e microrganismos probióticos (BOSNEA et al., 2017, ERATTE et al., 2015), reduzindo consideravelmente a eficiência da microencapsulação. Nesse sentido, uma das técnicas mais adequadas para a microencapsulação desses materiais, por não empregar elevadas temperaturas e gerar elevados rendimentos é a técnica de coacervação complexa (TIMILSENA et al., 2019, COMUNIAN et al., 2018, ERATTE et al., 2018).

3.2 Coacervação Complexa

3.2.1 Conceito

Coacervação é o fenômeno definido como a separação coloidal de sistemas líquidos de duas fases (SANTOS et al., 2018b). Quando o processo de separação de fases envolve a presença de um único tipo de biopolímero, trata-se de coacervação simples. Quando há mais de uma espécie de biopolímero, denomina-se coacervação complexa (EGHBAL, CHOUDHARY, 2018, KATOZIAN, JAFARI, 2016).

Numa dispersão aquosa pode haver diferentes tipos de interações entre biopolímeros (polissacarídeos e proteínas): interações de compatibilidade ou de incompatibilidade termodinâmica (BASTOS et al., 2018, CHEN, YUE, LIU et al., 2018). A coacervação complexa ocorre quando essas interações são compatíveis, gerando associação entre esses biopolímeros. Apesar das interações eletrostáticas serem predominantes, o sistema também conta com interações mais fracas, como ligações de

hidrogênio e interações hidrofóbicas (DEVI et al., 2017; RUTZ et al., 2017; JAMEKHORSHID et al., 2014).

A Figura 2 ilustra a formação desse processo.

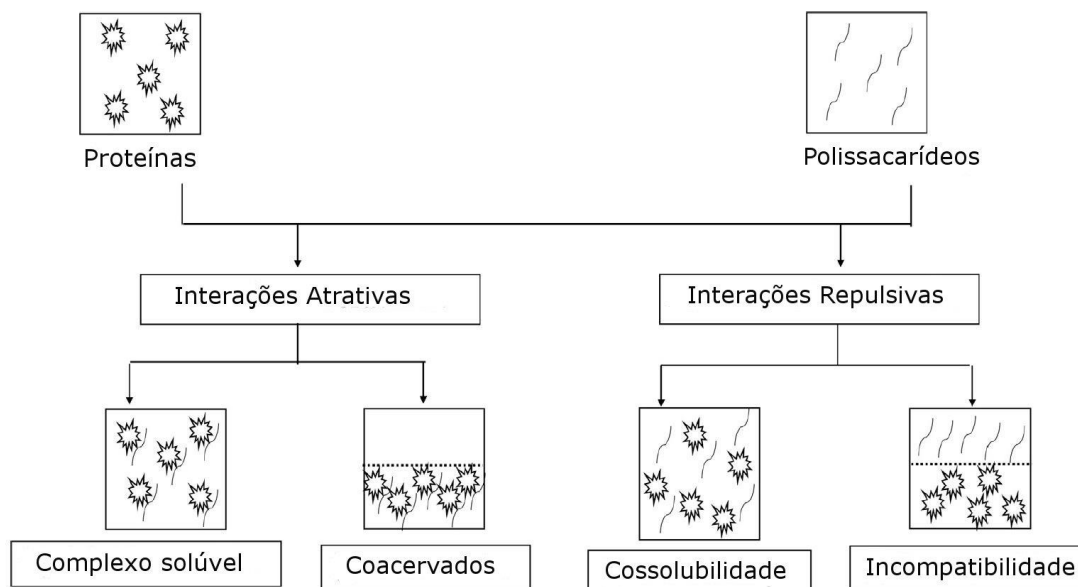


Figura 2: Interações possíveis entre biopolímeros em solução.
Fonte: ANAL et al., 2019.

A formação e características estruturais de complexos coacervados baseados em proteínas e polissacarídeos é afetada por fatores intrínsecos, como o pH, a força iônica, a concentração total, a estrutura e a massa molar do biopolímero, bem como por fatores extrínsecos, tais como agitação, pressão e temperatura (TIMILSENA et al., 2019, ERATTE et al., 2018, EGHBAL, CHOUDHARY, 2018, MOSCHAKIS, BILIADERIS, 2017). A natureza dos complexos formados entre esses biopolímeros é influenciada por fatores entrópicos, como sua estrutura e massa molecular e também por forças entálpicas que são reguladas pela razão empregada entre o polissacarídeo e a proteína, pela natureza e pela densidade das cargas nos biopolímeros (JOYE, MCCLEMENTS, 2014, GIRARD et al., 2003).

O pH é um parâmetro de extrema importância para a formação e estabilização de complexos coacervados entre proteínas e polissacarídeos empregados para a microencapsulação de compostos bioativos (SANTOS et al., 2018a, SANTOS et al., 2018b). Complexos coacervados entre proteínas e polissacarídeos são estáveis numa faixa de pH compreendida entre o pKa do polissacarídeo e o ponto isoelétrico da proteína, fazendo com que esses biopolímeros apresentem cargas opostas entre si (BASTOS et al., 2018, RAEI et al., 2017).

Complexos coacervados formados entre polissacarídeos e proteínas também são suscetíveis a efeitos da concentração salina. Em baixas concentrações, é favorecida a formação dos complexos coacervados (GULÃO et al., 2014). No entanto, com um pronunciado aumento da concentração de sal ocorre o enfraquecimento das interações eletrostáticas entre os biopolímeros, além da redução dos valores críticos de pH de formação dos complexos (SOUZA et al., 2018a, SOUZA, GARCIA-ROJAS, 2017).

3.2.2 Coacervação complexa: Processo de microencapsulação

O processo de microencapsulação por coacervação complexa consiste na separação de fases de hidrocolóides a partir de uma solução inicial, seguida da deposição da fase coacervada desenvolvida em torno do composto disperso (emulsificado ou suspenso) no mesmo meio reacional, finalizando-se com o devido ajuste do pH e da temperatura (ALOYS et al., 2016, TRIFKOVIĆ et al., 2016, ACH et al., 2015, JAMEKHORSHID et al., 2014, MARTINS et al., 2009). Uma etapa opcional pode ser posteriormente realizada para a consolidação das microcápsulas, através do uso de agentes reticulantes ou de endurecimento (ERATTE et al., 2018, MARTINS et al., 2009) também chamados de *crosslinkers*, como o glutaraldeído e o formaldeído. No entanto, devido a características de toxicidade, seu uso vem sendo substituído por alternativas como o ácido tânico, a genipina e a enzima transglutaminase, entre outras (COMUNIAN et al., 2018, XIAO et al., 2014).

Através da técnica de coacervação complexa, é possível a co-encapsulação de biocompostos e de probióticos, o que possibilita a redução de custos, aumento da absorção e da biodisponibilidade, efeito simbiótico entre microrganismos e ainda sinergismo entre os ativos co-encapsulados (ERATTE et al., 2018, CHAWDA et al., 2017, ALOYS et al., 2016). Por meio de coacervação complexa foi feita a co-encapsulação de flavorizantes (SANTOS et al., 2014), fitosterol e óleo de semente de Echium (COMUNIAN et al., 2018), probiótico e óleo de atum (ERATTE et al., 2015), entre outras aplicações.

A técnica de coacervação complexa mostrou-se apropriada tanto para a imobilização da enzima lactase como para a sua microencapsulação, importante recurso tecnológico para a obtenção de produtos sem lactose e para a suplementação alimentar, já que também proporcionou boas propriedades de resistência em condições simuladas do trato gastrointestinal (SOUZA et al., 2018b, SOUZA et al., 2018c, SOUZA et al., 2019). Microcápsulas obtidas por coacervação complexa apresentam tamanho variável entre 0,1- 500 μm (COMUNIAN, FAVARO-TRINDADE, 2016). Essa técnica apresenta diversas vantagens como elevadíssima eficiência de microencapsulação, além de excelentes propriedades de liberação e resistência mecânica. Através dessa técnica é viável a microencapsulação de compostos voláteis como aromas e óleos essenciais, microrganismos probióticos e de substâncias lábeis pois são realizadas condições brandas de operação, já que não há emprego de elevadas temperaturas nem são utilizados solventes orgânicos. Como principais desvantagens, possui alto custo e dificuldade de ampliação de escala, além de elevada sensibilidade a variações de força iônica e de pH (TIMILSENA et al., 2019, XIAO et al., 2014, DEVI et al., 2017, TRIFKOVIĆ et al., 2016, DA SILVA et al., 2015, ROKKA, RANTAMÄKI, 2010).

Embora a técnica de coacervação complexa tenha sido tradicionalmente e em maior número, empregada para a microencapsulação de compostos lipofílicos (TIMILSENA et al., 2019, ERATTE et al., 2018, DEVI et al., 2017, SILVA et al., 2012), atualmente na literatura já é possível encontrar diversos trabalhos que utilizam a coacervação complexa para a microencapsulação de compostos hidrofílicos, conforme apresentado na Tabela

Tabela 1: Estudos recentes de microencapsulação por coacervação complexa.

Material de Parede		Núcleo	Polaridad e do Núcleo	Tipo de Emulsão	Objetivo	Análises	Referência
Polissacarídeo	Proteína						
GA	GE Tipo B	Ácido ascórbico (Vitamina C)	Hidrofílica	Dupla A/O/A	Verificar as características físico-químicas, estabilidade térmica e perfil de liberação das microcápsulas de ácido ascórbico obtidas por coacervação complexa.	EE%, TGA, Solubilidade, Higroscopicidade	Da Cruz et al., 2019
Mucilagem de semente de agrião	GE Tipo não especificado	Vitamina D	Lipofílica	Simples O/A	Utilizar a técnica de coacervação complexa para microencapsular a vitamina D. Verificar as propriedades das microcápsulas e testar <i>in vivo</i> as microcápsulas obtidas.	EE%, TGA, FTIR, SEM Análise <i>in vitro</i> de liberação, Estudo <i>in vivo</i> , Metodologia de superfície-resposta	Jannasari et al., 2019
Quitosana	WPI	Extrato de alho rico em alicina	Hidrofílica	—	Estudar os mecanismos de coacervação complexa entre a WPI e quitosanas de diferentes graus de desacetilação. Microencapsular o extrato de alho por coacervação complexa e promover a secagem das microcápsulas por Spray-drying. Avaliar as propriedades físicas, químicas e morfológicas das microcápsulas obtidas	Pot ζ , Medições reológicas, TGA, FTIR, Morfologia, Solubilidade, Higroscopicidade	Tavares, Noreña, 2019
Goma de semente de linhaça	Proteína de farelo de arroz	Vanilina (em complexo de inclusão com β -ciclodextrina)	Lipofílica	—	Aplicar a coacervação complexa para microencapsular a vanilina. Formar um complexo de inclusão prévio a coacervação para incrementar a estabilidade térmica e possibilitar a liberação controlada da vanilina. Estudar a relação entre o material de parede e o núcleo. Avaliar as propriedades estruturais e térmicas das microcápsulas obtidas .	EE%, Pot ζ , TGA, DSC, SEM, FTIR, XRD, Perfil de Liberação, Morfologia	Hasanvand, Rafe, 2019

Pectina	GE Tipo B	Cinamaldeído	(Pouco) Hidrofílica	Simples O/A	Investigar o processo de coacervação complexa entre a gelatina e a pectina bem como aplica-la para microencapsular o cinamaldeído.	MM, FTIR, Pot ζ , TGA, Turbidez	Muhoza et al., 2019
GA	GE Tipo A	Oleato de metila	Lipofílica	Simples O/A	Determinar o efeito dos seguintes parâmetros na microencapsulação: Concentração total do material de parede, Razão entre proteína e o polissacarídeo. Avaliar e estabelecer uma relação entre a morfologia e a estabilidade oxidativa das microcápsulas obtidas	Estabilidade oxidativa, Morfologia, Índice de agregação	Ma et al., 2019
GA	GE Tipo A	Antocianinas da framboesa negra	Hidrofílica	Dupla A/O/A	Microencapsular as antocianinas da framboesa negra pela técnica de coacervação complexa precedida de dupla emulsificação. Verificar as propriedades das microcápsulas obtidas, com a finalidade de aplica-las em produtos alimentícios e nutracêuticos.	Tamanho das MC, Morfologia, FTIR, DSC, Pot ζ , Análise de cor, Solubilidade, Higroscopicidade	Shaddel et al., 2018
GA	GE Tipo A	Xantona	(Pouco) Hidrofílica	Simples O/A	Microencapsular a xantona por coacervação complexa e secar as microcápsulas por Spray-drying. Comparar a solubilidade em água do núcleo microencapsulado com a da xantona não-microencapsulada. Realizar a caracterização físico-química das microcápsulas obtidas.	XRD, FTIR, DSC, Solubilidade	Ho et al., 2018
GA	GE Tipo A	<i>Lactobacillus plantarum</i> ST-III (probiótico)	—	—	Utilizar a coacervação complexa para microencapsular o microorganismo probiótico. Verificar a sobrevivência das células probióticas durante a estocagem das microcápsulas.	Pot ζ , SEM, EE%, Umidade relativa, Estabilidade térmica	Zhao et al., 2018

GA	GE Tipo B	Lactase (enzima)	Hidrofílica	Dupla A/O/A	Estudar a viabilidade de formação de microcápsulas de lactase por coacervação complexa precedida de dupla emulsificação. Verificar a cinética de liberação e a atividade enzimática em ensaio <i>in vitro</i> de digestão.	EE%, FTIR, Estabilidade térmica, Solubilidade, Simulação gástrica	Souza et al., 2018c
Quitosana Pectina ou GX	—	Óleo de palma rico em carotenóides	Lipofílica	Simples O/A	Microencapsular o óleo de palma com alta concentração de carotenoides por meio da técnica de coacervação complexa, empregando a quitosana e a pectina ou a quitosana e a goma xantana como materiais de parede. Promover a caracterização físico-química e avaliar o perfil de liberação do carotenoide microencapsulado. Estudar a aplicação das microcápsulas em produtos alimentícios como pão e iogurte.	EE%, DSC, Morfologia, Perfil de liberação gastrointestinal	Rutz et al., 2017
GA	WPI	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> E6L <i>paraplantarium</i> B1 (Probiótico)	—	—	Avaliar a incorporação do microrganismo probiótico microencapsulado no iogurte. Verificar o efeito da incorporação das microcápsulas nas propriedades reológicas do produto.	Simulação gástrica, reologia e estabilidade térmica do produto (iogurte)	Bosnea et al., 2017
Alginato ou Pectina	Colágeno	Nisina com extrato de abacate	(Pouco) Hidrofílica	Dupla A/O/A	Estudar e comparar a influência da composição do material de parede, do tipo de secagem e do tipo de dispersão do núcleo, envolvidos no processo de microencapsulação do núcleo por coacervação complexa.	Potζ, Turbidimetria, Morfologia	Calderón-Oliver et al., 2017
CMC	Caseinato de sódio ou WPI	B-pineno	Lipofílica	Simples O/A	Verificar a performance do uso do glicerol e do ácido tânico como agentes de reticulação das microcápsulas formadas pela técnica de coacervação complexa. Caracterizar as microcápsulas formadas.	TGA, FTIR, SEM	Koupantis et al., 2016

GA ou Pectina	GE Tipo B	Sulforanos	Lipofílica	Simples O/A	Microencapsular sulforanos provenientes do extrato da semente de brócolis sem o uso de tensoativos nem de agentes de reticulação.	EE%, UV, FTIR	García-Saldaña et al., 2016
Goma de semente de chia	Isolado protéico de semente de chia	Óleo de semente de chia	Lipofílica	Simples O/A	Microencapsular por coacervação complexa o óleo de semente de chia (fonte de ômega 3 e potencial substituto do óleo de peixe) através de um material de parede isento de ingredientes de origem animal, mirando o público vegetariano e vegano. Avaliar os efeitos da razão material de parede e núcleo e do método de secagem aplicado.	EE%, Morfologia e Tamanho das partículas, Porosidade e Área de superfície, SEM, Estabilidade oxidativa do óleo	Timilsena et al., 2016
—	β -LG LF	Ácido fólico (Vitamina B9)	Hidrofílica	—	Estudar um sistema de liberação de compostos bioativos hidrofílicos, como a vitamina B9, constituído por proteínas do soro do leite heterocomplexadas, visando a produção de alimentos funcionais com benefícios à saúde e com o menor uso possível de aditivos.	Pot ζ , Turbidimetria, EE%, Tamanho e esfericidade das partículas	Chapeau et al., 2016
GA	GE Tipo B	Xilitol (Edulcorante)	Hidrofílica	Dupla A/O/A	Produzir microcápsulas de xilitol por meio da técnica de coacervação complexa. Controlar a liberação do xilitol. Prolongar a doçura e o frescor por meio da introdução das microcápsulas obtidas no produto (chiclete).	EE%, Solubilidade, FTIR, Isoterma de sorção	Santos et al., 2015
GA	WPI	β -caroteno	Lipofílica	Simples O/A	Microencapsular o β -caroteno. Avaliar a influência da variação da concentração de biopolímeros no material de parede. Delinear o perfil de liberação do β -caroteno.	Pot ζ , FTIR, CLSM Reologia Estabilidade química, Liberação <i>in vitro</i>	Jain et al., 2015

SHMP	GE Tipo A	Óleo de atum	Lipofílica	Simples O/A	Produzir microcápsulas de óleo de atum através da técnica de coacervação complexa. Avaliar a estabilidade oxidativa do óleo de atum microencapsulado.	Pot ζ , Turbidimetria, EE%, Estabilidade oxidativa	Wang et al., 2014
GA	GE Tipo B	Ácido ascórbico (Vitamina C)	Hidrofílica	Dupla A/O/A	Microencapsular o ácido ascórbico através da técnica de coacervação complexa precedida de dupla emulsificação. Caracterizar estrutural e físico-quimicamente as microcápsulas produzidas. Determinar a estabilidade oxidativa do ácido ascórbico microencapsulado.	EE%, FTIR, Estabilidade térmica, Solubilidade, Higroscopicidade	Comunian et al., 2013
GA	GE Tipo B	Aspartame (Edulcorante)	Hidrofílica	Dupla A/O/A	Promover a microencapsulação do edulcorante por meio da técnica de coacervação complexa precedida de dupla emulsificação. Avaliar as propriedades estruturais e físico-químicas das microcápsulas obtidas. Estudar a taxa de liberação em água do aspartame microencapsulado.	EE%, Solubilidade, Higroscopicidade, Isoterma de sorção, Liberação em água do aspartame microencapsulado	Rocha-Selmi et al., 2013

Legenda da Tabela

A/O/A – emulsão água-óleo-em-água; CLSM – microscopia de scanner laser confocal; DSC – calorimetria diferencial de varredura; EE% - eficiência de encapsulação (%); FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier; GA – goma arábica; GE – gelatina; SHMP – hexametáfosfato de sódio; β -LG – β -lactoglobulina; LF – lactoferrina; O/A – emulsão óleo-em-água; Pot ζ , - potencial zeta; SEM – microscopia de scanner eletrônico; TGA – análise termogravimétrica; UV – ultravioleta; WPI – isolado de proteína do soro; XRD – difração de raio-X

A maioria dos trabalhos de coacervação complexa disponíveis na literatura emprega a emulsificação para a dispersão de biocompostos (TIMILSENA et al., 2019, OZKAN et al., 2019, ERATTE et al., 2018, COMUNIAN et al., 2018). A formação de uma emulsão estável contendo o princípio bioativo é, portanto, fundamental para a microencapsulação por coacervação complexa (ERATTE et al., 2018, DEVI et al., 2017, TRIFKOVIĆ et al., 2016) sendo, desse modo a etapa de emulsificação de extrema importância para a adequada proteção do núcleo e longevidade das microcápsulas obtidas (CALDERÓN-OLIVER, 2017, DEVI et al., 2017). Adicionalmente, as condições de preparo e de estabilização de emulsões podem justificar variações na eficiência e na estabilidade das microcápsulas formadas por coacervação complexa (DA CRUZ et al., 2019, CALDERÓN-OLIVER, 2017). Por essa razão, alguns aspectos relacionados ao uso de emulsões e aos fenômenos associados à sua instabilidade serão explicados no tópico a seguir.

3.2.2.1 Emulsões e sua instabilidade

Emulsões são sistemas de dispersão de partículas de um fluido num segundo fluido imiscível (MCCLEMENTS, 2018, GULÃO et al., 2018, MCCLEMENTS et al., 2007). Emulsões duplas são um tipo de emulsão que se constitui em sistemas líquidos de dispersões complexas, nos quais partículas de uma fase líquida dispersa serão posteriormente dispersas em outra fase líquida (NEUMANN et al., 2018, PEREIRA, GARCIA-ROJAS, 2015).

Diversos tipos de emulsões podem ser utilizados na técnica de microencapsulação por coacervação complexa, sendo que emulsões do tipo óleo em água (O/A) são frequentemente utilizadas como sistemas carreadores de biocompostos lipofílicos (GULÃO et al., 2018, COMUNIAN, FAVARO-TRINDADE, 2016) e emulsões do tipo água-óleo-em-água (A/O/A) carreadores de compostos bioativos hidrofílicos (MUTALIYEVA et al., 2017, KUROIWA et al., 2016).

Quando preparadas a partir de biopolímeros, as emulsões apresentam excelentes propriedades de proteção de compostos bioativos ao longo do trato gastro-intestinal, proporcionando aumento de sua digestibilidade e biodisponibilidade (ANAL et al., 2019, LU et al., 2016). Contudo, emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis (MCCLEMENTS, 2018, NEUMANN et al., 2018). Os principais fenômenos relacionados a instabilidade de emulsões são coalescência, floculação, maturação de Ostwald, cremeação e sedimentação (ANAL et al., 2019, ADITYA et al., 2017, KHAR et al., 2011), como ilustrado na Figura 3.

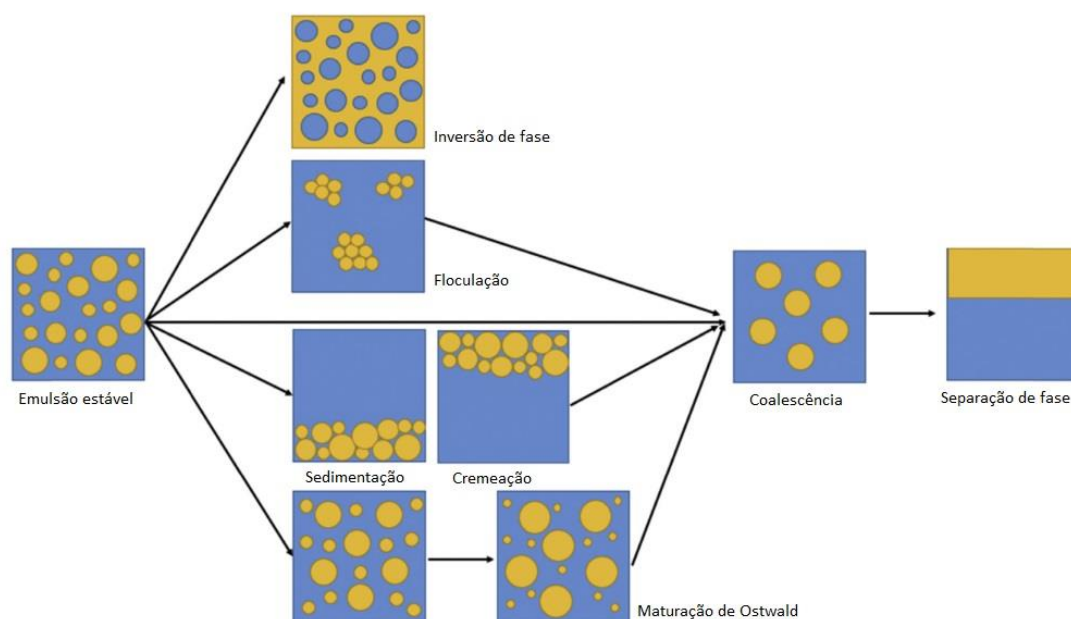


Figura 3: Fenômenos relacionados à instabilidade de emulsões.
Fonte: HU et al., 2017.

Embora esses fenômenos possam ocorrer em qualquer tipo de emulsão, conforme a natureza da emulsão a susceptibilidade a determinados fenômenos é maior: enquanto emulsões do tipo O/A estão mais propensas a floculação e coalescência (GULÃO et al., 2018), emulsões do tipo A/O/A são mais susceptíveis a difusão do núcleo da fase aquosa interna para a externa, expulsão das gotículas de água da fase oleosa, além de floculação, coalescência e maturação de Ostwald (NEUMANN et al., 2018, BAMBA et al., 2018, LU et al., 2016).

3.2.2.2 Microencapsulação por coacervação complexa de compostos hidrofílicos precedida de dupla emulsificação

Para a microencapsulação de compostos hidrofílicos por coacervação complexa, em muitos casos, é apropriada a realização de uma etapa de dupla emulsificação, prévia a coacervação, para que haja melhoria na retenção e proteção do composto bioativo hidrossolúvel durante a formação do coacervado (COMUNIAN et al., 2013, MENDANHA et al., 2009). Isso é feito por meio de um sistema de emulsão dupla, do tipo água-óleo em água (A1/O/A2), no qual é fundamental a formação de uma emulsão primária, contendo o composto bioativo, do tipo água-em-óleo (A1/O) estável (SOUZA et al., 2018c, SHADDEL et al., 2018, ESTÉVEZ et al., 2019). A estabilização da emulsão primária (fase interna) é feita através do uso de um tensoativo lipofílico e a estabilização da emulsão secundária (fase externa) é feita empregando-se um emulsificante hidrofílico (NEUMANN et al., 2018, HATTREM et al., 2014) sendo usualmente realizada partir da proteína empregada (ESTÉVEZ et al., 2019, SOUZA et al., 2018c, SANTOS et al., 2015).

O tensoativo empregado para a estabilização da emulsão primária, bem como a sua proporção apresentam, portanto, um papel fundamental (TAMNAK et al., 2016). O poliricinelato de poliglicerila (PGPR) é um tensoativo lipofílico que vem sendo amplamente utilizado para a microencapsulação de compostos hidrofílicos por coacervação complexa, com etapa prévia de dupla emulsificação (HATTREM et al., 2014). Para a microencapsulação do ácido ascórbico, foi empregado nas proporções (%)

m/m da emulsão primária) de 0,5% (COMUNIAN et al., 2013) e de 0,8% (DA CRUZ et al., 2019). Para a microencapsulação de antocianinas da framboesa negra foi utilizado na proporção de 3% (SHADDEL et al., 2018) e na de 4% para a microencapsulação do extrato da semente de uva rico em compostos fenólicos, como as protocianidinas (ESTÉVEZ et al., 2019).

Além do tensoativo, as condições de homogeneização também apresentam um papel importante para a formação e estabilização de emulsões. Maiores velocidades de emulsificação estão relacionadas a formação de partículas de menores tamanhos e maior estabilidade. No entanto, a partir de certo ponto, o aumento da velocidade promove desestabilização do sistema, além da possibilidade da incorporação de ar (BAMBA et al., 2018, WANG et al., 2015, KHAN et al., 2011, XING et al., 2004).

No caso de emulsões duplas para a microencapsulação de compostos hidrofílicos previamente a etapa de coacervação complexa, costuma-se trabalhar com velocidades relativamente altas, entre 10000 e 22000 rpm. Alguns trabalhos vêm sendo realizados com iguais parâmetros de velocidade de rotação e de tempo, tanto para a produção da emulsão primária como para a da emulsão secundária (MENDANHA et al., 2009, ROCHA-SELMÍ et al., 2013), enquanto outros empregam velocidades de rotação e tempos um pouco menores na emulsão secundária, de modo a não romper a emulsão primária e assim evitar perda do biocomposto (DA CRUZ et al., 2019, SANTOS et al., 2015).

A coacervação complexa é finalmente realizada, com a adição da solução do polissacarídeo à emulsão dupla previamente formada e devido ajuste do pH, promovendo dessa forma a microencapsulação do composto bioativo hidrofílico (ROCHA-SELMÍ, et al., 2013, SANTOS et al., 2015), ilustrada na Figura 4.

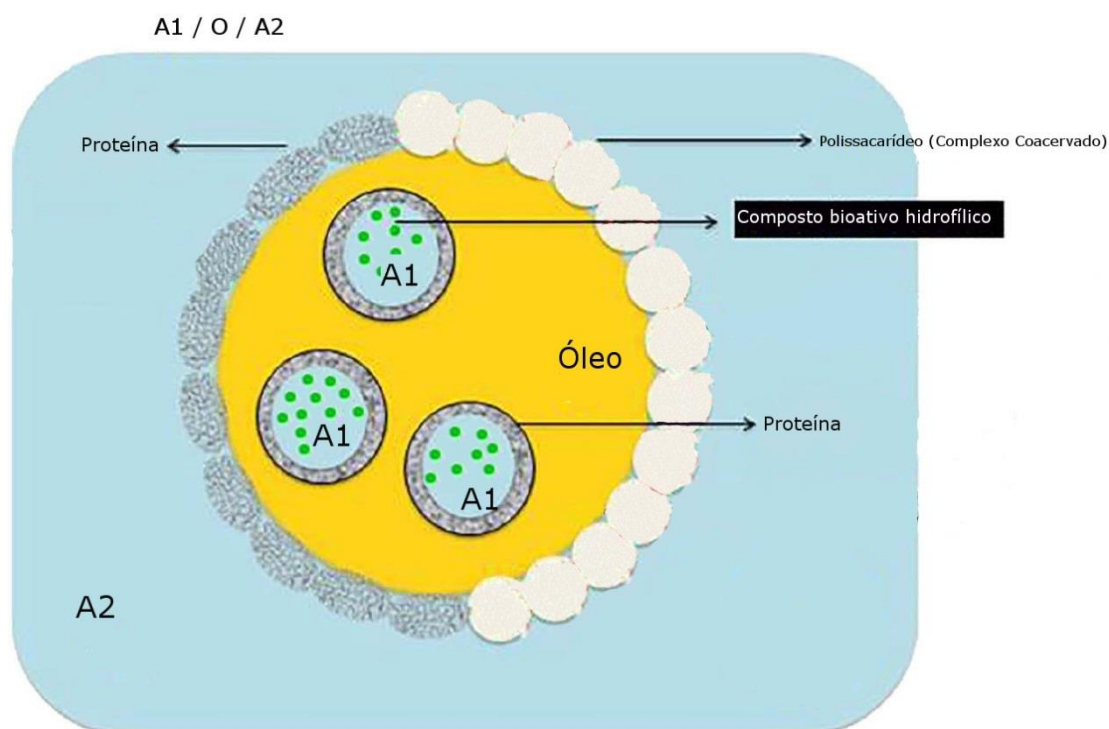


Figura 4: Coacervação complexa após dupla emulsificação do tipo água-em-óleo-em-água (A1/O/A2). Adaptado de ADITYA et al., 2017.

3.3 Material de parede a partir de biopolímeros

3.3.1 Biopolímeros

Biopolímeros ou polímeros naturais são, por definição, polímeros formados por diversos organismos vivos, como animais, vegetais e microrganismos, em suas células, por meio de processos metabólicos complexos. São exemplos de biopolímeros polissacarídeos como amidos e gomas (do cajueiro, xantana, acácia, gelana, tara) e também proteínas, como a gelatina, a caseína, etc. (RAO et al., 2014, PAWAR et al., 2015). Biopolímeros de grau alimentício vem sendo cada vez mais empregados nas indústrias de alimentos, farmacêutica, entre outras, em substituição a polímeros sintéticos, por conta de sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixo custo e abundância na natureza (SHIT, SHAH, 2014, PRAMANAIK, GANGULY, 2017, CAZÓN et al., 2017, KUMAR et al., 2018).

São utilizados para a fabricação de embalagens e filmes de revestimento com propriedades de barreira a gases (SHIT, SHAH, 2014, CAZÓN et al., 2017), agentes de liberação controlada de fármacos (PAWAR et al., 2015, PRAMANAIK, GANGULY, 2017), engenharia de biotécidos (KUMAR et al., 2018) e proteção de compostos bioativos através de diversas técnicas de microencapsulação (JIMÉNES-COLMENERO, 2013).

Tanto a técnica de microencapsulação empregada como a natureza dos materiais de revestimento, direcionam a aplicação das microcápsulas, exercendo extrema influência em suas propriedades (NAZZARO et al., 2012), o que justifica o estudo de novos materiais de revestimento para microencapsulação (ROKKA, RANTAMÄKI, 2010, JAMEKHORSHID et al., 2014).

Diversos materiais de parede são empregados para a microencapsulação, em variadas concentrações e técnicas, podendo ser utilizados sozinhos ou em associações. Os mais utilizados são polissacarídeos, como a κ -carragena e o alginato; gomas como a arábica, xantana e gelana e ainda proteínas de origem animal como a gelatina e proteínas do leite (ROKKA, RANTAMÄKI, 2010). Quando associados podem ser obtidas propriedades diversificadas e otimizadas em relação ao custo, resistência, morfologia e eficiência de microencapsulação (DAMODARAN et al., 2010).

3.3.1.1 Proteínas

Proteínas são polipeptídeos, ou seja, biopolímeros formados a partir de diversas unidades de aminoácidos (IGE et al., 2012). Alguns exemplos de proteínas aplicadas para microencapsulação de compostos bioativos são a gelatina (DE SOUZA et al., 2018) e proteínas do soro do leite, como a β -lactoglobulina e a lactoferrina (SANTOS et al., 2018a).

3.3.1.1.1 Lactoferrina

A lactoferrina é uma proteína que pode ser isolada a partir do soro do leite, onde está presente em pequenas concentrações, correspondendo a cerca de 1 a 2% do total de proteínas (SANTOS et al., 2018a, MARSHALL, 2004). Essa glicoproteína de ligação com o ferro possui massa molar de aproximadamente 80 KDa. Apresenta-se em 3 formas distintas (apo, holo e nativa), conforme o grau de saturação com o ferro. A sua

forma nativa, por exemplo, possui de 15-20% de saturação com ferro e apresenta coloração rosa salmão (GULÃO et al., 2018, WANG et al., 2017). Apresenta excelentes propriedades biológicas, tais como função antioxidante, anti-inflamatória, bacteriostática, exercendo atividade tanto contra bactérias gram positivas quanto gram negativas, além de melhorar a biodisponibilidade do ferro (GONZÁLEZ-CHÁVEZ et al., 2009). Também possui propriedades anticâncer (ZHANG et al., 2014), imunomodulatória (PUDDU et al., 2009) e anti-inflamatória (GUILLEN et al., 2000). Por conta desses benefícios à saúde, a lactoferrina vem sendo encapsulada e utilizada em diversas formulações alimentícias e farmacêuticas (RAEI et al., 2017). A Figura 5 mostra a estrutura da lactoferrina bovina.

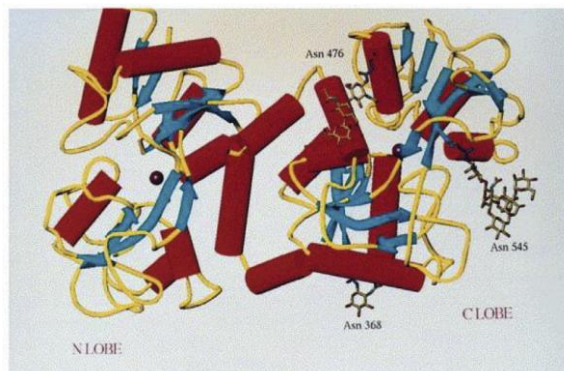


Figura 5: Esquema da estrutura química da lactoferrina bovina.
Fonte: LIU, ZHANG, LI et al., 2018.

O ponto isoelétrico da lactoferrina é de aproximadamente de 8,0 (GULÃO et al., 2014). Apresenta a capacidade de se complexar com diversos polissacarídeos aniônicos, como o alginato de sódio (BOKKHIM et al., 2016, BASTOS et al., 2018), a pectina e a carragena (PEINADO et al., 2010) e com a goma arábica (GULÃO et al., 2014). Isso evidencia o seu potencial de aplicação como material de parede para a microencapsulação de compostos bioativos e com isso, adicionalmente, promover o enriquecimento dessas microcápsulas (SANTOS et al., 2018a, LIU, ZHANG, LI, 2018).

O emprego da lactoferrina como agente encapsulante foi realizado para a encapsulação de compostos hidrofílicos como a curcumina e a cafeína através da técnica de nanohidrogel (BOURBON et al., 2016). O potencial tecnológico da lactoferrina também foi estudado por Chapeau et al. (2016), que a utilizou juntamente com a β -Lactoglobulina para a coacervação complexa heteroproteica da vitamina B9, obtendo boa performance no carreamento dessa vitamina hidrossolúvel.

3.3.1.1.2 Gelatina

A gelatina é uma proteína abundante preparada a partir da degradação hidrolítica do colágeno. O ponto isoelétrico (pI) da gelatina varia de acordo com o tratamento empregado para a sua produção. A gelatina produzida por hidrólise ácida (gelatina tipo A) possui pI em pH em torno de 8,0, enquanto que a gelatina produzida em condições alcalinas (gelatina tipo B) para a hidrólise do colágeno apresenta pI em pH por volta de 5,0 (XIAO et al., 2014).

Existem gelatinas de diferentes fontes animais, sendo as mais comuns são gelatinas feitas a partir da pele e ossos de porco, seguidas de boi, por serem mais

abundantes e por apresentarem melhores propriedades tecnológicas (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011). Contudo, diversas pesquisas vem sendo conduzidas para a obtenção de gelatinas semelhantes às gelatinas de mamíferos, mas de outras origens animais como aves e pescados, por conta de questões ligadas à fatores culturais e religiosos e também como forma de beneficiamento de subprodutos da indústria de alimentos (RAWDKUEN et al., 2013, SARBON et al., 2013, KARIM, BHAT, 2009).

A massa molar da gelatina é uma propriedade dependente do seu processamento, de sua origem animal e de outros fatores relacionados à complexidade estrutural do colágeno, como o tamanho e o teor de aminoácidos de suas cadeias protéicas, que variam conforme a idade e o tamanho do animal (MUYONGA et al., 2004, KARIM, BHAT, 2009). A força do gel, a termo-estabilidade e a capacidade de emulsificação são alguns parâmetros dependentes da massa molar da gelatina e que direcionam a sua aplicação como geleificantes, emulsificantes, agentes de microencapsulação e de formação de filmes, entre outras (MUYONGA et al., 2004, GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

A gelatina possui excelente capacidade de complexação com diversos polissacarídeos, como carragenas, pectinas, alginatos e gomas (DEVI et al., 2017, RAO et al., 2014). Tradicionalmente, ela vem sendo associada com a goma arábica em diversos estudos de microencapsulação por coacervação complexa (DEVI et al., 2017, JAMEKHORSHID et al., 2014). A coacervação complexa da gelatina e da goma arábica foi empregada para a microencapsulação de edulcorantes como o aspartame (ROCHA-SELMÍ et al., 2013) e também para a microencapsulação da vitamina C (COMUNIAN et al., 2013).

No estudo conduzido por De Souza et al. (2018), a gelatina tipo A de porco foi utilizada para a microencapsulação do extrato de canela rico em protocianidinas e em outros compostos fenólicos, por coacervação complexa com diversos polissacarídeos como a goma do cajueiro, a carboximetilcelulose e a κ -carragena, com eficiências de encapsulação variável entre 65% e 86%, conforme o material de parede empregado.

A estrutura química da gelatina encontra-se representada na Figura 6. Pode-se observar a presença de grupos carboxílicos e também amino-guanidínicos, que conferem a gelatina propriedades anfóteras (XIAO et al., 2014).

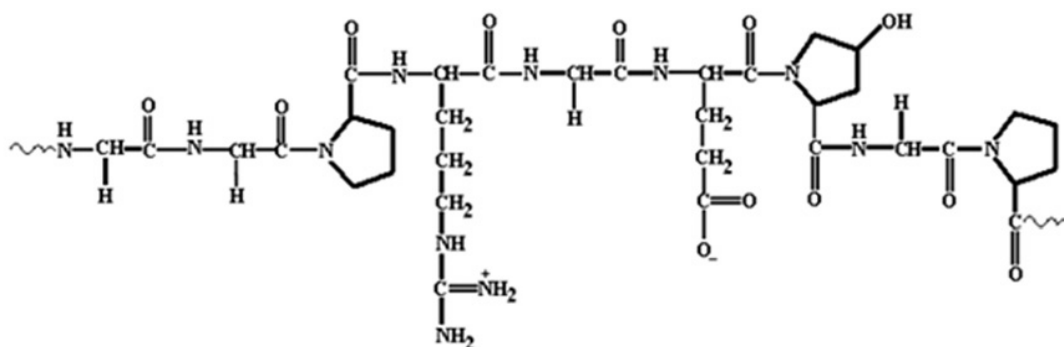


Figura 6: Estrutura química da gelatina.
Fonte: DEVI et al., 2017.

3.3.1.2 Polissacarídeos

Polissacarídeos são polímeros naturais de carboidratos nos quais diversos monossacarídeos encontram-se unidos através de ligações glicosídicas (SHISHIR et al., 2018). Gomas naturais são polissacarídeos com elevada massa molecular, são compostos exudados a partir de plantas ou de microrganismos, para a sua proteção diante de um ataque microbiano ou de uma agressão externa (GOSWAMI, NAIK, 2014, RANA et al., 2011).

Polissacarídeos como o alginato (LIU, WANG, MCCLEMENTS et al., 2018), a goma do cajueiro (DE SOUZA et al.; 2018) e a goma xantana (RUTZ et al., 2017) vem sendo empregadas para a microencapsulação de compostos bioativos.

3.3.1.2.1 Goma xantana

A goma xantana é um exopolissacarídeo aniônico de elevada massa molecular cujo valor de pka é de aproximadamente 2,8 (VICENTE et al., 2018). É produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris*, sendo composta de unidades de glicose, manose e ácido glucorônico (ROKKA, RANTAMÄKI, 2010), sua estrutura química é ilustrada na Figura 7.

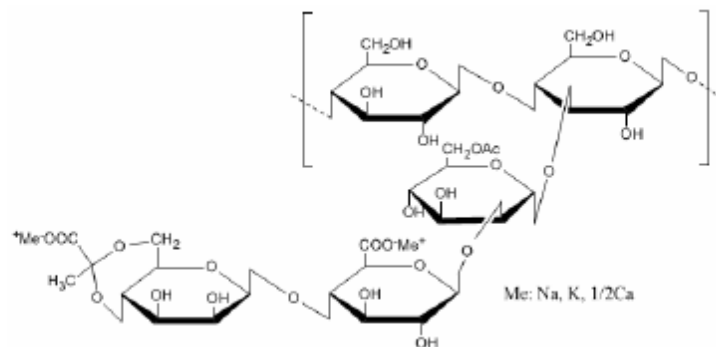


Figura 7: Estrutura química da goma xantana.
Fonte: SHAO et al., 2012.

Por apresentar carga negativa mesmo em torno do pH neutro, a goma xantana, assim como a pectina e a carragena recebe a denominação de poli-eletrólito aniônico (BOURGANIS et al., 2017). Apresenta estabilidade numa ampla faixa de pHs, em temperaturas elevadas e também em altas concentrações de eletrólitos (SHAO et al., 2012, KUMAR et al., 2018). Apresenta elevada solubilidade, tanto em água fria como em água quente e massa molar variável dependendo do processo fermentativo e da associação de suas cadeias, na faixa entre 2×10^6 e 20×10^6 Da (KUMAR et al., 2018).

Diversas características desejáveis da goma xantana justificam seu vasto emprego na indústria de alimentos, como ausência de cor, sabor e odor (CAI et al., 2019), sendo por isso amplamente utilizada como espessante, geleificante e dispersante. A goma xantana também atua como estabilizante de emulsões (FU et al., 2019, VICENTE et al., 2018, FAREEZ et al., 2015). Além disso, complexos formados entre a goma xantana e proteínas do soro mostraram-se promissores enquanto substitutos de gordura (LANEUVILLE et al., 2000).

Seu potencial de aplicação na área de microencapsulação vem sendo utilizado, dada a sua capacidade de complexação com proteínas (DE KRUIF et al., 2004; BUENO, PETRI, 2014). A goma xantana possui a habilidade de formação de

complexos coacervados insolúveis e estáveis em amplas faixas de pH com diferentes proteínas, como a lisozima e a ovoalbumina (SOUZA, GARCIA-ROJAS, 2017).

A goma xantana foi utilizada como material de parede associada com amido carboximetilado para a microencapsulação de antocianinas de mirtilo através da técnica de liofilização (CAI et al., 2019). Foi empregada, associada com a goma gelana (0,75%) num estudo de estabilidade de *Lactobacillus sp.* através de microencapsulação por extrusão com posterior aplicação de potencial eletrostático (6,5 kV), mostrando-se como a combinação mais efetiva dos materiais de encapsulamento testados neste estudo (JIMENES-PRANTEDA et al., 2012). Também foi utilizada como material de revestimento para microencapsulação do óleo de palma rico em carotenoides através de coacervação complexa com a quitosana apresentando eficiência de 62% quando associada à secagem por liofilização (RUTZ et al., 2017).

3.4 Composto bioativo: ácido ascórbico

O ácido ascórbico é um composto hidrossolúvel e termolábil, encontrado naturalmente em diversas frutas frescas, especialmente em frutas cítricas. Possui função vitamínica, sendo também conhecido como vitamina C (LAM et al., 2014, WILSON, SHAH, 2007). A Figura 8 mostra a estrutura química do ácido ascórbico.

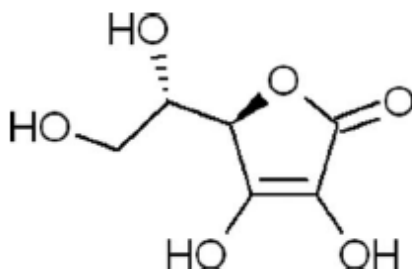


Figura 8: Estrutura química do ácido ascórbico.
Fonte: ABBAS, 2012.

A vitamina C apresenta funções fisiológicas importantes, como por exemplo, a prevenção de doenças como escorbuto e a formação de fibras colágenas existentes em praticamente todos os tecidos do corpo. A ingestão diária de vitamina C recomendada para garantir o funcionamento adequado do organismo é de cerca de 100 miligramas, sendo requeridas doses um pouco maiores em alguns casos especiais como infecções, gestação ou amamentação (LAM et al., 2014, PALMA-RODRÍGUEZ et al., 2013, MANELA-AZULAY et al., 2003). Além disso, uma vez que o ácido ascórbico também apresenta propriedades antioxidantes, ele previne que ocorram alterações químicas e sensoriais indesejáveis em diversos produtos alimentícios (ABBAS et al., 2012).

Apesar de seus benefícios nutricionais e tecnológicos, o ácido ascórbico é um composto altamente instável em presença oxigênio, variações de pH e elevadas temperaturas, podendo sofrer perdas significativas durante o armazenamento e processamento dos alimentos, sendo oxidado a ácido dehidroascórbico (SARTORI et al., 2015, MATOS-JR et al., 2015). A degradação do ácido ascórbico também é influenciada por fatores como elevada atividade de água, altos valores de pH e presença de íons como Cu^{+2} e Fe^{+3} (DA CRUZ et al., 2019). O uso da microencapsulação é, portanto, um dos melhores e mais utilizados recursos para proteger a vitamina C e prevenir perdas nutricionais e alterações sensoriais em formulações alimentícias que a contém (SARTORI et al., 2015, LAM et al., 2014, ABBAS et al., 2012).

Uma vez que o processamento de alimentos, como pasteurização e assamento, por exemplo, empregam elevadas temperaturas que podem reduzir o teor de ácido

ascórbico do alimento, é importante a produção de microcápsulas que protejam o ácido ascórbico da degradação térmica, bem como da formação de produtos tóxicos como furanos (FARIAS et al., 2018, ALVIM et al., 2016, SABERIAN et al., 2013).

Vitaminas, como a vitamina C, podem ser encapsuladas tanto por micro como por nano cápsulas. Comparativamente, a nanotecnologia oferece algumas vantagens, como uma redução na quantidade de material de parede e núcleo empregados, e aumento da superfície de contato do núcleo. No entanto, a nano-encapsulação é um processo de custo mais elevado que a microencapsulação, além de apresentar ausência de legislação específica para aplicação em alimentos. Adicionalmente, tem seu uso limitado por questões relacionadas a propriedades de barreira, com implicações toxicológicas que podem provocar doenças (SHISHIR et al., 2018, KATOUZIAN, JAFARI, 2016). Estudos de microencapsulação do ácido ascórbico vêm sendo realizados por meio de diversas abordagens, conforme pode ser observado na Tabela 2.

O ácido ascórbico microencapsulado promoveu a conservação e a preservação sensorial quando aplicado em produtos alimentícios como salsichas de frango (COMUNIAN et al., 2014b), biscoito (ALVIM et al., 2016) e hambúrguer de tilápia (FARIAS et al., 2018). Dentre as diversas técnicas de microencapsulação do ácido ascórbico, a coacervação complexa precedida de dupla emulsificação apresenta elevada eficiência de microencapsulação, além de conferir estabilidade térmica e oxidativa às microcápsulas obtidas, importantes atributos para o processamento de alimentos (DA CRUZ et al., 2019, COMUNIAN et al., 2013).

Tabela 2: Microencapsulação do ácido ascórbico através de diferentes técnicas.

Técnica de microencapsulação	Material de parede	Eficiência de encapsulação (%) máxima do estudo	Referência
Coacervação complexa precedida de dupla emulsificação	Gelatina tipo B e goma arábica	93,80	Da Cruz et al., 2019
Spray-chilling	Óleo de palma e óleo de palma totalmente hidrogenado em associação	93,51	Carvalho et al., 2019
Coacervação complexa precedida de dupla emulsificação	Gelatina tipo B e pectina	94,30	Da Cruz et al., 2018
Spray-drying	Amido de taro	20,90	Hoyos-Leyva et al., 2018
Emulsificação e gelificação interna	Alginato de sódio e Concentrado de proteínas do soro de leite	89,13	Zandi, 2018
Spray-drying	Amido modificado e goma arábica isoladamente e em associação	86,06	Palma-Rodríguez et al., 2018
Spray-chilling	Gordura interesterificada	73,00	Matos-Jr. et al., 2017
Spray-drying	Xiloglucano	96,34	Farias et al., 2018
Spray-drying	Alginato de sódio	93,48	Ferrándiz et al., 2016
Spray-congealing Dispositivos microflúidicos	Óleo de palma	96,60	Mastos-Jr et al., 2015 Comunian et al., 2014a
Spray-drying	Amido nativo e amido modificado de milho, batata e de arroz	93,30	Palma-Rodríguez et al., 2013
Coacervação complexa precedida de dupla emulsificação	Gelatina tipo B e goma arábica	99,57	Comunian et al., 2013
Lipossomo	Fosfolipídeos do leite	26,00	Farhang et al., 2012
Lipossomo	Fosfatidilcolina	38,42	Marsanasco et al., 2011

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Foram utilizados Goma Xantana (GX), Gelatina tipo A de porco Bloom 300 (GE-A) e 2,6-diclorofenol-indofenol de Sódio (DCFI) obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), Ácido L-Ascórbico 99% m/m de pureza (AA) e corante Coomassie azul brilhante (CBBG250) foram obtidos da Vetec (São Paulo, Brasil). A Lactoferrina desidratada (LF) empregada foi Bioferrin[®] 2000, 95% m/m de pureza, fornecida pela empresa Glanbia Nutritionals (Fitchburg, USA). Foram empregados o emulsificante Polirricinoleato de poliglicerol - PGPR (SGS, Brasil) e óleo de milho (Cargill, Brasil) adquiridos no mercado local. O equipamento Gehaka, Master- P&D, Brasil foi utilizado para a preparação da água ultrapura de condutividade de 0,05 $\mu\text{S}/\text{cm}$ empregada nos experimentos e preparo das soluções.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação da massa molar da GX e da GE-A pelo método

viscosimétrico

A massa molar da GE -A e da GX foi determinada a partir da viscosidade dinâmica, que foi calculada através do método viscosimétrico pelo tempo de escoamento da solução dos biopolímeros através do capilar, utilizando-se viscosímetros capilares Cannon-Fenske (Schott-Gerate, Alemanha) com diferentes diâmetros (100, 75 e 50 mm). Os capilares foram imersos em um banho termostático (Schott-Gerate, CT-52, Alemanha) a temperatura de $25 \pm 0,1$ °C. As concentrações empregadas para a GX basearam-se no estudo de Vicente et al. (2018), e variaram de 0,01% a 0,125% (m/v) e foram preparadas a partir de uma solução mãe na concentração de 0,125% (m/v) contendo NaCl na concentração de de 0,01 mol/L, em agitação branda à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante 30 minutos . As amostras de GE-A foram utilizadas nas concentrações entre 0,05% a 0,5% (m/v), como adaptação do estudo de Masueli (2014), preparadas a partir de uma solução mãe na concentração de 0,5% (m/v) do biopolímero, feita em solvente (água) contendo NaCl na concentração de de 0,1 mol/L, com aquecimento a 40 °C durante 1 hora. Após ter sido retirada a fonte de calor, a GE-A manteve-se sob agitação em temperatura ambiente, sendo em seguida diluída, sob agitação durante 30 minutos.

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ foi obtida através da extrapolação da curva de Martin tendendo a zero, conforme realizado por Vicente et al., (2018) a partir das Equações (1) e (2):

$$\ln(\eta_{sp}/c) = \ln[\eta] + K[\eta]c \quad (1)$$

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta} \quad (2)$$

em que $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca (cm^3/g), η_{sp} é a viscosidade específica, c é a concentração da solução de GE ou GX (g/mL), η é a viscosidade da solução de GE-A ou GX ($\text{g} / \text{cm} \cdot \text{s}$), η_0 é a viscosidade do solvente ($\text{g} / \text{cm} \cdot \text{s}$), e K é constante de Martin.

Para a determinação da massa molar (\bar{M}_v) dos polímeros foi utilizada a equação de Mark- Houwink-Sakurada, que relaciona a massa molar com a viscosidade intrínseca (Equação 3)

$$[\eta] = k(\bar{M}_v)^\alpha \quad (3)$$

Neste estudo, foram adotados os seguintes valores das constantes obtidos a partir da literatura (MARK, 1999, MASUELLI, 2014): para a GE-A, $k = 1,10 \times 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{g}$ e $\alpha = 0,74$; para a GX, $k = 2,78 \times 10^{-5} \text{ cm}^3/\text{g}$ e $\alpha = 1,28$.

4.2.2 Formação dos complexos coacervados entre a LF e GX e entre a GE-A e GX

4.2.2.1 Preparo das soluções

Para a realização das análises de potencial ζ e da turbidimetria, as concentrações de GX e de proteína (LF ou GE-A) foram fixadas em 0,1% m/m. Soluções de GX e de proteína (LF ou GE-A) foram usadas individualmente como controle. Foram estudados diferentes proporções de massa (m/m) de GX: LF 1:1, 1:2, 1:6, 1:8, 1:9, 1:15; GX:GE-A 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6; como adaptação da metodologia proposta por Diarrassouba et al. (2015). Na formação das cápsulas, foram preparadas soluções-mãe dos BPs: a solução-mãe de GX foi preparada na concentração de 1% (m/v), a de LF na concentração de 3% (m/v) e a de GE-A na concentração de 2% (m/V). Para o ajuste do pH, foram preparadas soluções de NaOH (1M) e de HCl (1M).

Para o preparo das soluções, os reagentes foram pesados em um balança analítica (Shimadzu, AY220, Philippines) e depois dissolvidos em água ultrapura usando um agitador magnético (NT101, Novatecnica, Brasil) por períodos de tempo variáveis: 30 minutos para as proteínas LF e GE-A e 24 horas para a GX. A temperatura da água de solubilização da GE-A foi 40°C enquanto que as demais soluções foram solubilizadas em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). O efeito do pH foi avaliado. Soluções com diferentes pHs foram preparadas, usando para a sua verificação um pHmetro de bancada (Tecnocon, mPA-210, Brasil) para subsequente titulação turbidimétrica.

4.2.2.2 Titulação Turbidimétrica

A turbidez foi avaliada com auxílio do espectrofotômetro (espectrofotômetro Libra S12, Biochrom, Inglaterra) em um comprimento de onda de 400 nm, de acordo com metodologia proposta por Gulão et al., (2014). O espectrofotômetro foi calibrado para 100% de transmitância (%T) com água ultrapura. A turbidez (τ) é definida pela equação: $\tau = 100\% - T$. A solução contendo a razão estabelecida de GX:LF ou GX:GE-A tiveram o pH ajustado com HCl 0,5 mol/L e NaOH 0,25 mol/L, com auxílio de um agitador magnético (NT 101, Novatecnica, Brasil). O pH das soluções foi verificado através de pHmetro de bancada (mPA-210, Tecnocon, Brasil) e uma alíquota de 2 mL foi retirada para aferição do valor da turbidez em uma cubeta de quartzo. Todas as titulações foram realizadas em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) com quatro replicatas, com intervalos de aproximadamente 1 minuto entre as aferições.

4.2.2.3 Potencial ζ

O valor potencial ζ foi obtido tanto para o complexo formado, como para a proteína (LF ou GE-A) e para o polissacarídeo (GX) isoladamente, através do equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As soluções foram diluídas em água deionizada com pH previamente ajustado em uma proporção de 0.1% m/m, acondicionadas em tubos capilares posicionados dentro do equipamento.

4.2.2.4 Cálculo da Força de Interação Eletrostática (FIE)

O cálculo da FIE foi realizado conforme a Equação 4 (YUAN et al., 2017), com aferições de potencial ζ em (mV) feitas em diferentes valores de pH (2 – 12).

$$FIE (mV^2) = \left| \zeta_{\text{proteína}} \times \zeta_{\text{polissacarídeo}} \right| \quad (4)$$

4.2.3 Microencapsulação do ácido ascórbico

4.2.3.1 Preparo das microcápsulas

Para o preparo das microcápsulas foi adotada a metodologia empregada por Comunian et al. (2013), com adaptações. Foi inicialmente preparada uma emulsão primária (A1/O) a partir de uma solução de AA (20% m/m) na proporção de 33% (m/m) e óleo de milho na proporção de 66% (m/m) mais 1% (m/m) de tensoativo PGPR com agitação de 12.000 rpm por 4 min. As emulsões secundárias (A1/O/A2) foram em seguida preparadas adicionando-se as soluções de proteína (GE-A ou LF) à (A1/O), com agitação de 10.000 rpm durante 3 minutos em um agitador Ultraturrax, IKA T25, Germany. A coacervação complexa foi promovida através da adição da solução de goma xantana à (A1/O/A2) com o auxílio de agitação magnética, realizada na temperatura de 40 ° C para o sistema contendo a proteína GE-A e na temperatura de 25° C para o sistema contendo a proteína LF. Em seguida, o pH foi ajustado, baseado nos valores ótimos obtidos na formação dos complexos coacervados entre a GX e a proteína, sendo 4,0 para o sistema contendo GE-A e para 5,0 para o sistema contendo LF.

Diferentes concentrações totais de biopolímeros foram obtidas a partir de solução-mãe de GX 1% (m/v), LF 3% (m/v) e GE 2% (m/v). Foram avaliados 9 diferentes tratamentos para as microcápsulas formadas por complexos coacervados entre a LF e a GX com concentrações totais de BP no MP que variaram de 0,49% a 1,05% e de núcleo correspondente a 100%, 75% e 50% do total da quantidade de BP empregada no MP, conforme mostra a Tabela 3. As microcápsulas formadas por complexos coacervados entre a GE-A e a GX foram testados 12 diferentes tratamentos com concentrações totais de BP no MP que variaram de 0,84% a 1,2% e de núcleo correspondente a 100%, 75% , 50% e 25% do total de BP no MP, conforme mostra a Tabela 4. As microcápsulas produzidas foram então armazenadas a 6 °C durante 24 horas para decantação e então congeladas em nitrogênio líquido a -195 °C durante 4 minutos. Em seguida foram desidratadas em liofilizador de bancada (Terroni, Enterprise I, Brasil), durante 24 horas. O diagrama de fluxo de preparação das microcápsulas pode ser visualizado na Figura 9.

Tabela 3: Teores de BP no MP e AA no N em cada tratamento realizado para as microcápsulas formadas pelo complexo coacervado entre GX e LF na proporção de 1:6, adotando-se uma base de cálculos igual a 100g.

Experimento	(%) Massa (g)					Razão MP: N
	N		MP		Total	
	AA	GX	LF			
E1	1,05	0,15	0,9	1,05	1:1	
E2	0,7	0,1	0,6	0,7	1:1	
E3	0,49	0,07	0,42	0,49	1:1	
E4	0,7875	0,15	0,9	1,05	1:0,75	
E5	0,525	0,1	0,6	0,7	1:0,75	
E6	0,3675	0,07	0,42	0,49	1:0,75	
E7	0,525	0,15	0,9	1,05	1:0,5	
E8	0,35	0,1	0,6	0,7	1:0,5	
E9	0,245	0,07	0,42	0,49	1:0,5	

Legenda: BP: Biopolímero, MP: Material de Parede, N: Núcleo, EE%: Eficiência de Encapsulação, AA: ácido ascórbico, LF: lactoferrina, GX: goma xantana

Tabela 4: Teores de BP no MP e AA no N em cada tratamento realizado para as microcápsulas formadas pelo complexo coacervado entre GX e GE-A na proporção de 1:2, adotando-se uma base de cálculos igual a 100g.

Experimento	Massa (g)				Razão MP: N
	N		MP		
	AA (%)	GX (%)	GE-A (%)	MP (%)	
E1	1,2	0,4	0,8	1,2	1:1
E2	1,05	0,35	0,7	1,05	1:1
E3	0,84	0,28	0,56	0,84	1:1
E4	0,9	0,4	0,8	1,2	1:0,75
E5	0,7875	0,35	0,7	1,05	1:0,75
E6	0,63	0,28	0,56	0,84	1:0,75
E7	0,6	0,4	0,8	1,2	1:0,5
E8	0,525	0,35	0,7	1,05	1:0,5
E9	0,42	0,28	0,56	0,84	1:0,5
E10	0,3	0,4	0,8	1,2	1:0,25
E11	0,2625	0,35	0,7	1,05	1:0,25
E12	0,21	0,28	0,56	0,84	1:0,25

Legenda: BP: Biopolímero, MP: Material de Parede, N: Núcleo, EE%: Eficiência de Encapsulação, AA: ácido ascórbico, GE-A: gelatina tipo A, GX: goma xantana

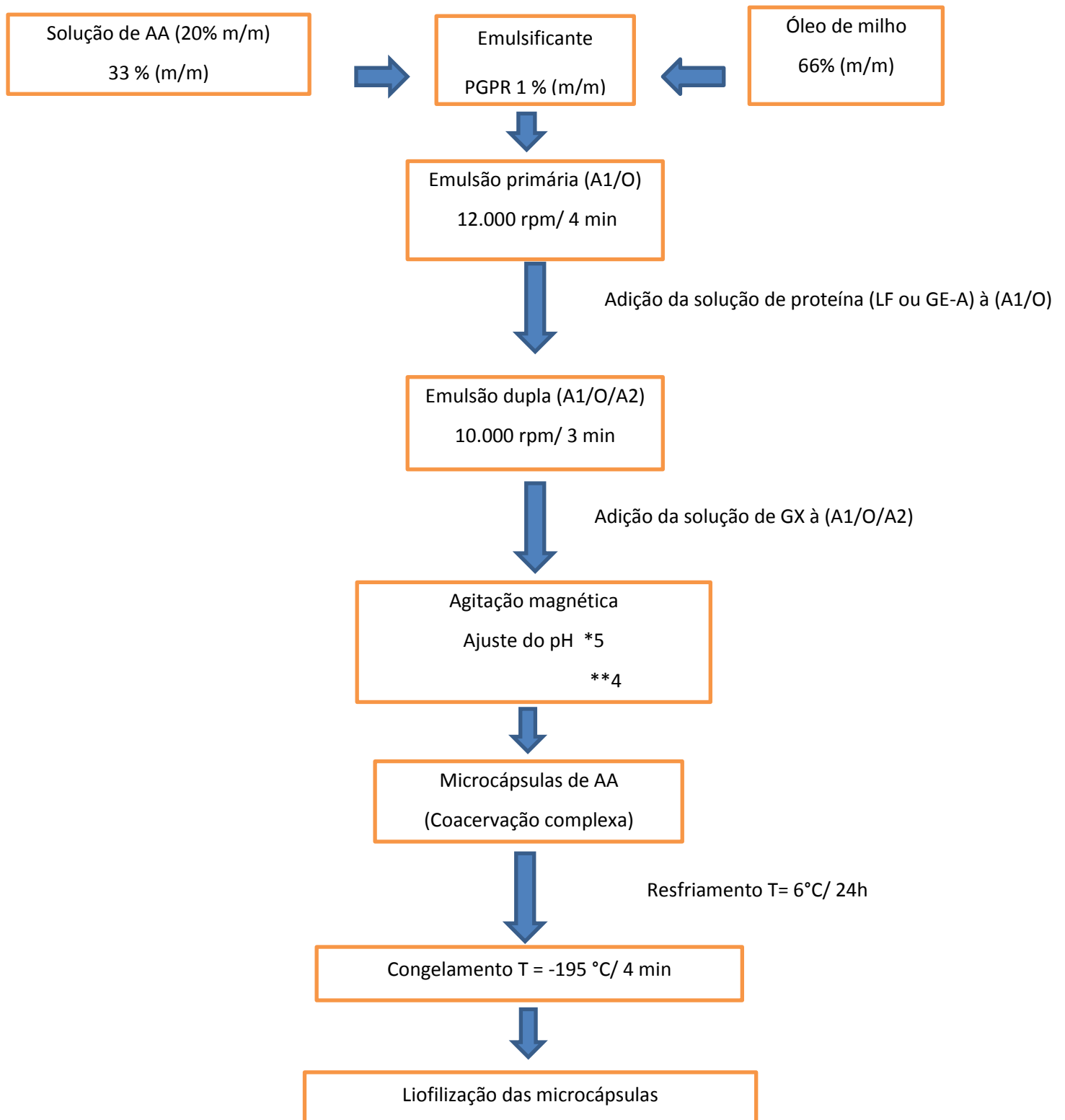


Figura 9: Diagrama de fluxo de preparação das microcápsulas de AA.
 Legenda: * Ajuste do pH empregando a proteína LF; ** Ajuste do pH empregando a proteína GE-A.

4.2.3.2 Análise da vitamina c por titulação

O ácido ascórbico foi quantificado por titulometria com reagente de Tillmans de acordo com a metodologia da AOAC, (1984), com modificações de Benassi e Antunes, (1988). O reagente de Tillmans, empregado como titulante, foi preparado a partir de uma solução de DCFI 0,025% (m/v) produzida dissolvendo-se 50,0 mg de DCFI em 100 mL de água na temperatura de 40 °C, contendo 42 mg de NaHCO₃ e completando-se o volume para 200 mL em balão volumétrico com água destilada após o resfriamento para temperatura ambiente.

Uma alíquota de 1,0 mL da amostra contendo o AA foi então diluída em 25 mL de solução ácido oxálico a 1% (m/m), sendo titulada até o ponto em que a solução contendo o AA adquire coloração rosada. A concentração de AA foi determinada a partir da Equação 5.

$$C = \frac{V \times f \times fD}{A} \quad (5)$$

em que: C é igual a concentração de AA (mg) na amostra, A é a alíquota utilizada da amostra (1mL), fD é o fator de diluição empregado (25), V é o volume em mL de reagente DCFI utilizado na amostra e f deverá ser obtido por padronização, através da Equação 6.

$$f = \frac{10 \times m}{p} \quad (6)$$

em que: m é a massa (mg) conhecida de AA dissolvida em 10 mL de solução que reagirá com o titulante DCFI e p é o volume do titulante DCFI gasto em mL.

4.2.3.3 Eficiência de Encapsulação (EE %)

A eficiência de encapsulação (EE), em porcentagem, foi analisada por titulação com reagente de Tillmans, anteriormente descrita, calculada a partir da massa de AA efetivamente encapsulada, através da diferença entre a quantidade de AA total aplicada e a quantidade de AA presente no sobrenadante, calculada a partir da Equação 7.

$$EE (\%) = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad (7)$$

em que M_1 = massa inicial de AA utilizada para a encapsulação e M_2 = massa final de AA presente no sobrenadante, após a preparação das microcápsulas.

4.2.4 Caracterização morfológica, de estabilidade e térmica das microcápsulas de AA formadas por coacervação complexa entre LF e GX e entre GE-A e GX

4.2.4.1 Morfologia

A morfologia das estruturas foi observada por microscopia óptica (Kasvi, China) com ampliação de 100 x. Foi feito o registro das imagens com uma câmera acoplada (Moticam 5.0, China). As análises foram feitas com amostras úmidas de emulsões A1/O; A1/O/A2 e das cápsulas coacervadas empregando-se o corante Coomassie azul brilhante.

4.2.4.2 Estabilidade das microcápsulas

Inicialmente foi feita a ruptura das cápsulas para a extração e quantificação do seu teor de AA, usando 0,5 g da amostra em 12,5 mL de solução de extração contendo 5% de NaCl e 1% de dodecil sulfato de sódio (COMUNIAN et al., 2013). Em seguida, foi feita a quantificação do AA através da análise de titulação com reagente de Tillmans previamente descrita, adotando-se como 100% a quantidade de AA presente nas microcápsulas do dia 0 para a verificação de sua estabilidade, de acordo com a metodologia adaptada de Farias et al. (2018) e de Matos-Jr et al. (2015). As microcápsulas foram armazenadas durante diferentes intervalos de tempo (0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias) em presença de O₂ e UR de 43 % num dessecador protegido da luz contendo solução saturada de K₂CO₃ em temperatura ambiente (25° ± 1,3°C).

4.2.4.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier foram analisados segundo a metodologia empregada por Bastos et al. (2018) para as amostras de AA puro, de proteínas puras (LF e GE), para o polissacarídeo puro (GX) e também para as microcápsulas liofilizadas. As análises foram realizadas utilizando a faixa de 4500-500 cm⁻¹.

4.2.4.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises de DSC foram realizadas conforme a metodologia de Santos et al. (2018c), utilizando calorímetro (TA Instruments, Q200, EUA). Foram analisados os materiais de parede e de núcleo isoladamente e também após a microencapsulação. Amostras com GX, proteína (LF ou GE), AA e também do material microencapsulado liofilizado foram pesadas em cadinho de alumínio através de balança de precisão (Mettler Toledo, Mx5, EUA). As análises foram realizadas num intervalo de temperatura entre -50°C a 300°C na taxa de 5°C/min com atmosfera de nitrogênio de 25 mL/min.

4.2.4.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada em adaptação à metodologia utilizada por Santos et al. (2019), com o objetivo de avaliar a variação de massa do núcleo e do material de parede em função da temperatura. As análises foram conduzidas em equipamento de TGA TGA2000 (Navas Instruments, Conway, Estados Unidos) com atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min e taxa de aquecimento de 10 °C/min na faixa de temperatura entre 20 °C e 700 °C.

4.2.5 Tratamento estatístico

Todas as análises foram realizadas em triplicada e tratadas estatisticamente. Foi realizada análise de variância (ANOVA) para a verificação dos efeitos significativos. Os dados que variarem qualitativamente foram tratados adicionalmente por teste de Tukey, a 5% de significância. Foi feito uso do programa estatístico SAS[®] versão 8.0, procedimento REG (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Os dados que apresentarem variações quantitativas foram tratados por análises de regressão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da Massa molar dos biopolímeros

Neste trabalho, o valor da massa molar encontrada para a GE-A foi de 127 kDa. A literatura também apresenta relato de produtos com mesmo valor de Bloom e de mesma origem animal apresentando valores de massa molar de 87,5 kDa (SAXENA et al, 2015) e de 282 kDa (MADHAMUTHANALLI, BANGALORE, 2014). A GE de porco possui uma distribuição de massa molar bastante ampla, por conta da ocorrência de cadeias α e β em maior quantidade, conforme o aumento do bloom do produto, de modo que quanto maior o bloom tanto maior é a sua massa molar (MADHAMUTHANALLI, BANGALORE, 2014). Além da fonte, o processo de hidrólise do colágeno durante a fabricação do produto pode levar a quebra das cadeias de forma bastante variável com redução na massa molar à medida em que o grau de hidrólise aumenta (MUYONGA et al., 2004, KARIM, BHAT, 2009).

O valor de massa molar encontrada neste trabalho para a goma xantana foi de 1420 kDa. O valor obtido é semelhante ao encontrado por Vicente et al. (2018), que apresentou o valor de 1403,7 kDa. A literatura também menciona uso de gomas xantanas comerciais com valor de massa molar em torno de 1000 kDa, como a empregada no estudo realizado por Brunchi et al. (2016), que apresentou o valor de 1165 kDa. Dependendo do processo fermentativo e da associação de suas cadeias, a massa molar da goma xantana apresenta um valor médio de 2000 a 20000 kDa (KUMAR et al., 2018). Além disso, fatores como a temperatura empregada durante a fermentação, o tipo de cepa bacteriana, bem como a fonte de nitrogênio utilizada, por exemplo, afetam diretamente a massa molar do produto, por impactar no teor de acetato e de piruvato do mesmo (CASAS et al., 2000). No estudo conduzido por Kalogiannis et al. (2003), foram obtidas gomas xantanas de massa molar variável de 800 a 1400 kDa a partir da fermentação do melão de beterraba, enquanto que Faria et al. (2011), em seu estudo obteve um produto de massa molar igual a 4200 kDa a partir da fermentação do caldo de cana de açúcar.

5.2 Determinação do pH ótimo de formação dos complexos coacervados e da razão ideal entre os biopolímeros : Potencial ζ , e Turbidez

Foi feita uma varredura de potencial ζ na faixa de pH entre 2 e 12, seguida do cálculo de FIE, mostrando ser possível a formação de complexos na faixa de pH entre 2,0 e 7,5 sendo o valor de pH mais provável para a coacervação complexa entre a GX e a LF foi o de 3,5, seguido pelo pH 4,0 conforme pode ser observado na Figura 10.

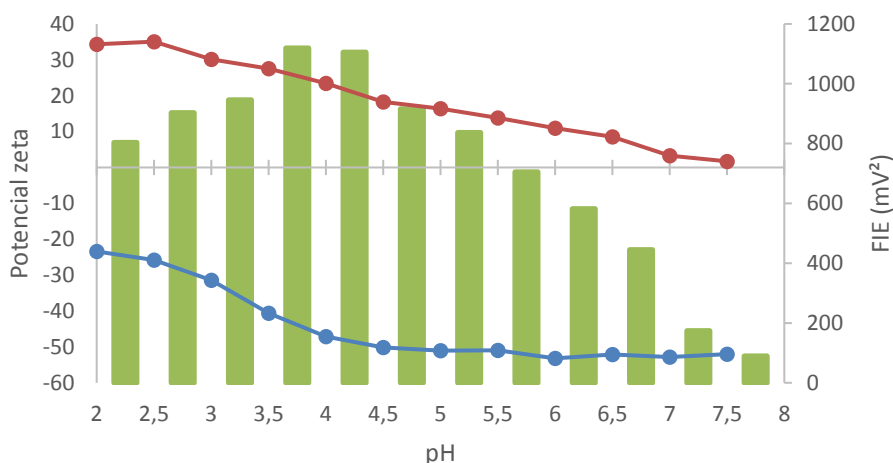


Figura 10: Potencial ζ da GX e potencial ζ da LF em diferentes valores de pH e valores de FIE.
 Legenda: GX: azul, LF: vermelho, FIE: verde.

Esse estado de ionização máxima entre a GX e a LF, expresso pelo elevado valor de FIE é fundamental para a formação dos complexos coacervados estáveis, visto que há possibilidade de apresentar elevada densidade de carga, de maneira a se estabelecerem interações eletrostáticas associativas entre os biopolímeros envolvidos, opostamente carregados entre si (ESTÉVEZ et al., 2019, TIMILSENA et al., 2019, ERATTE et al., 2018, EGHBAL, CHOUDHARY et al., 2018, CHEN, YUE, LIU, et al., 2018, MOSCHAKIS, BILADERIS, 2017). Contudo, a análise do valor obtido pela FIE não deve ser feita isoladamente, mas em conjunto com a avaliação das propriedades inerentes ao biopolímero empregado. Por exemplo, complexos entre a LF e outros biopolímeros (proteínas ou polissacarídeos) podem ser solúveis ou insolúveis conforme o pH (BASTOS et al., 2018, TAVARES et al., 2015, GULÃO et al., 2014). Em menores valores de pH, essa proteína tende a sofrer auto-agregação e/ou formar precipitados insolúveis, o que poderia comprometer a eficiência de coacervação (ADAL et al., 2017, FLANAGAN et al., 2015, YAN et al., 2013, BENGOCHEA et al., 2011, PEINADO et al., 2010). Desse modo, deu-se continuidade em valor de pH = 4,0 fixo para as análises de potencial ζ empregando-se diferentes razões entre a GX e a LF, conforme realizado por Diarrassouba et al. (2015), cujos resultados estão ilustrados na Figura 11.

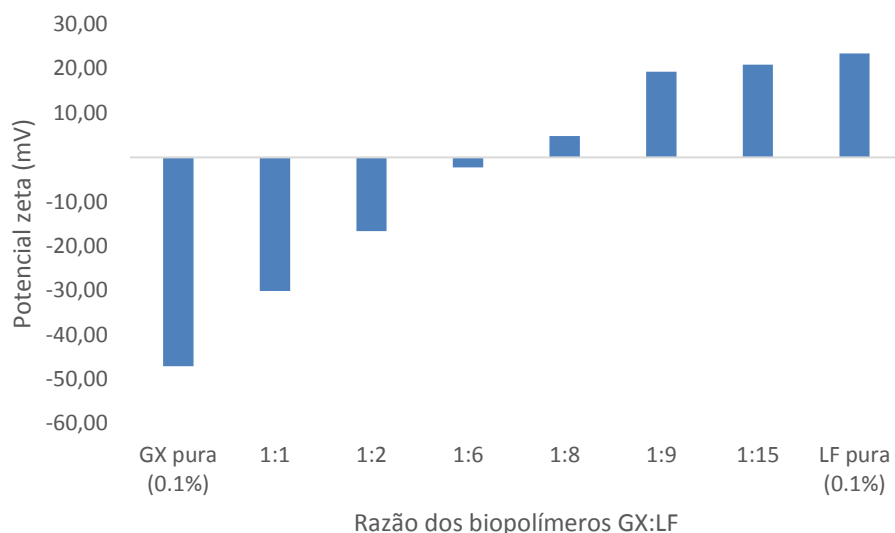


Figura 11: Potencial ζ dos complexos coacervados entre GX e LF em diferentes razões em valor de pH fixo igual a 4,0.

Quando o potencial ζ é mínimo, evidencia-se um maior equilíbrio entre as cargas positivas da proteína ionizada e negativas do polissacarídeo (SANTOS et al., 2018b, SANTOS et al., 2018c, TIMILSENA et al., 2017, RAOUFI et al., 2016). Nesse estudo, o valor mais baixo foi obtido na razão 1:6 entre o polissacarídeo e a proteína, correspondente a -2,27mV, seguido de 4,78 mV para a razão 1:8 e de -16,64 mV para a razão 1:2. Para se garantir que a formação ocorra dentro das condições ideais, conforme também realizado por Diarrassouba et al., (2015), procede-se uma leitura da turbidimetria para a razão de melhor desempenho, neste caso, GX:LF 1:6, conforme pode ser observado na Figura 12.

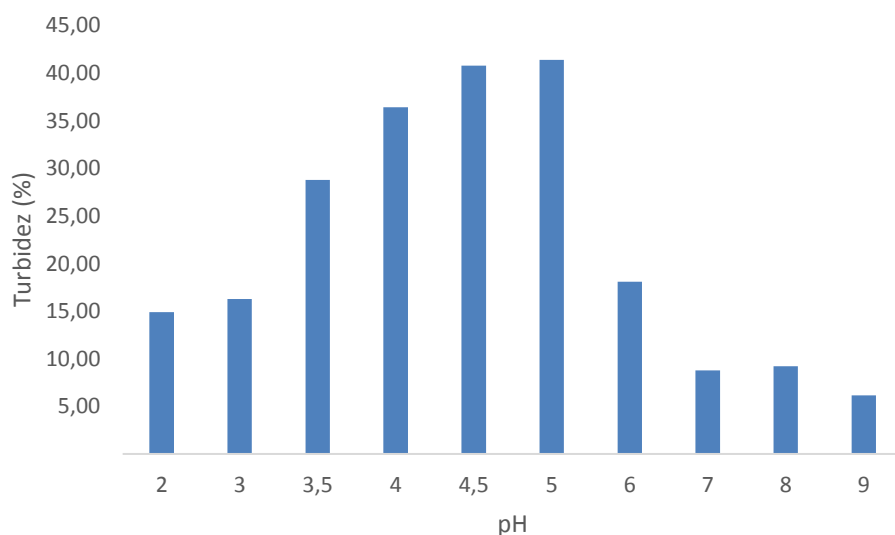


Figura 12: Turbidez dos complexos coacervados entre GX e LF em diferentes valores de pH na razão fixa de 1:6 entre a proteína e o polissacarídeo.

A análise turbidimétrica evidencia turbidez elevada na faixa de pH favorável para a formação do complexo coacervado, indicando a formação de uma dispersão coloidal de biopolímeros estável o suficiente para promover a dispersão da luz (BENGOECHEA et al., 2011). Com a análise turbidimétrica foi possível perceber que o pH em que turbidez foi máxima foi de 5,0; seguido de 4,5 e de 4,0, com valores de 41,40%; 40,78% e 36,42%. Uma vez que mais de um valor de pH levou a uma elevada turbidez, foi feita a confirmação do pH ideal através de uma nova varredura de ζ em diferentes pHs utilizando-se a razão fixa de 1:6 entre a GX e a LF, como por ser visto na Figura 13. Nesta Figura, observa-se que de fato o pH ideal de formação de complexos coacervados entre a LF e a GX é igual a 5,0, visto que nesse pH foi obtido o menor valor de potencial ζ (3,55 mV), denotando equilíbrio entre a proteína e o polissacarídeo opostamente carregados.

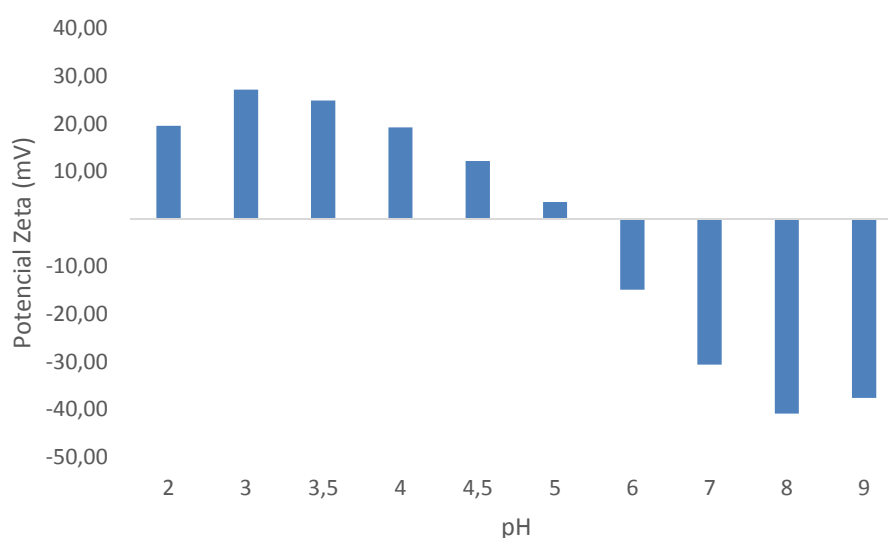


Figura 13: Potencial ζ dos complexos coacervados entre GX e LF em diferentes valores de pH na razão fixa de 1:6 entre a proteína e o polissacarídeo.

Foi feito o mesmo procedimento para a determinação das condições ideais entre a GX e a GE-A. Após a varredura em potencial ζ em diferentes pHs, tanto para a GE-A como para a GX, fez-se o cálculo de FIE, obtendo-se a possibilidade de formação de complexos coacervados entre essas espécies na faixa de pH entre 2 e 7,5, com valor máximo do produto de interação obtido no pH igual 4,0 seguido de 3,5 conforme pode ser observado na Figura 14.

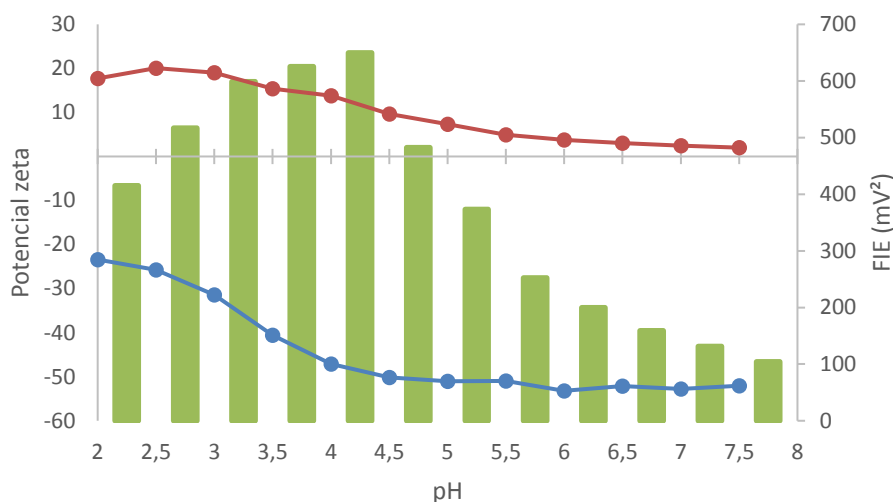


Figura 14: Potencial ζ da GX e potencial ζ da GE-A em diferentes valores de pH e valores de FIE. Legenda: GX: azul, GE-A: vermelho, FIE: verde.

Foi realizada então a análise de potencial ζ dessas razões no pH fixo igual a 4,0, já que para ele foi obtido o maior valor de FIE do estudo. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 15.

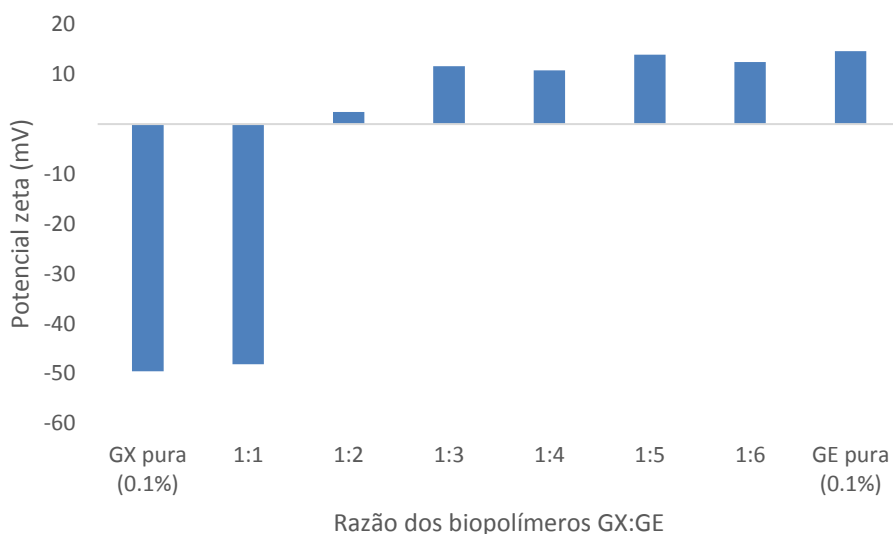


Figura 15: Potencial ζ dos complexos coacervados entre GX e GE em diferentes razões em valor de pH fixo igual a 4,0.

A análise de potencial ζ demonstrou que a razão de 1:2 foi a que levou ao maior equilíbrio entre as cargas positivas da proteína ionizada e negativas do polissacarídeo aniônico. Procedeu-se então uma análise turbidimétrica em diferentes pHs fixando-se a razão entre os BPs de melhor desempenho, cujos resultados estão apresentados na Figura 16.

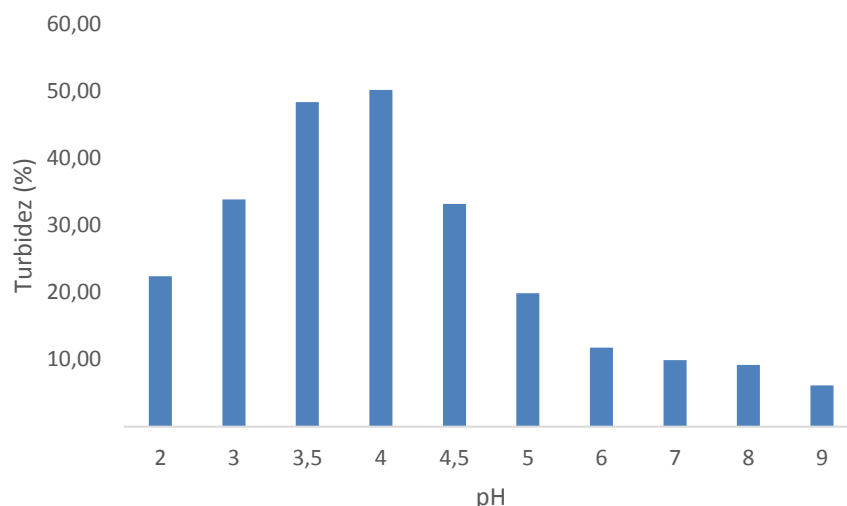


Figura 16: Turbidez dos complexos coacervados entre GX e GE em diferentes valores de pH na razão fixa de 1:2 entre a proteína e o polissacarídeo.

Na razão 1:2 entre a GX e a GE observou-se elevados valores de turbidez no pH 4,0; seguido de 3,5 e 3,0, com valores de 50,20%; 48,42% e 33,87%, respectivamente. A confirmação pôde ser feita com uma nova varredura de potencial ζ que pode ser vista na Figura 17.

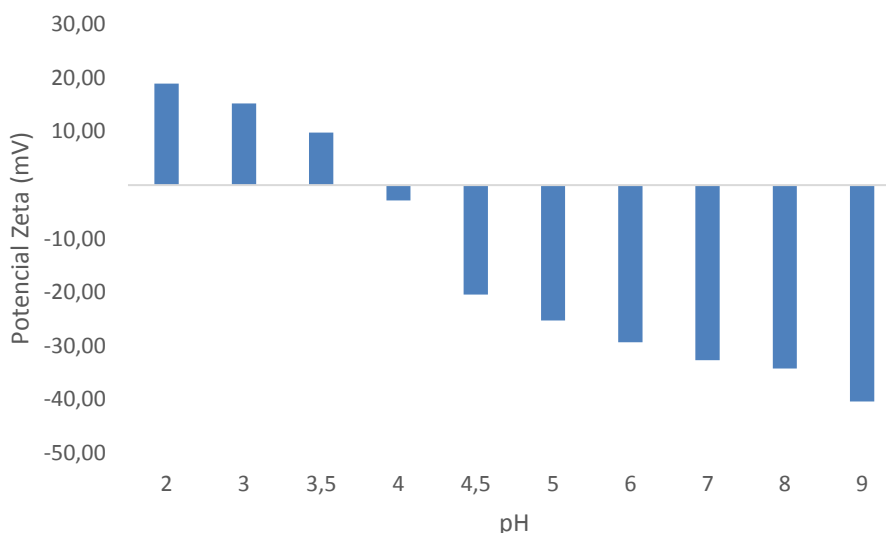


Figura 17: Potencial ζ dos complexos coacervados entre GX e GE em diferentes valores de pH na razão fixa de 1:2 entre a proteína e o polissacarídeo.

É possível observar que em pH 4,0 o complexo coacervado entre a GX e a GE apresentou o menor potencial ζ , no valor de -2,86 mV, sendo portanto o valor de pH ideal para a coacervação complexa entre esses biopolímeros.

Um estudo similar de formação de complexos coacervados entre proteínas e GX foi o trabalho de Souza e Garcia-Rojas (2017), no qual a formação do complexo coacervado entre a GX e a lisozima ocorreu na razão ideal de 1:3 em pH igual a 7,0, enquanto que para a o complexo entre a GX e a ovoalbumina e a razão ideal foi de 1:5

em pH igual a 3,0. Lii et al. (2002), verificaram em seu estudo que razão foi de 1:1 quando o pH empregado para a coacervação foi de 2,3; e a razão 1:2 entre a GX e a GE também foi a que rendeu maior rendimento na formação de complexos entre esses biopolímeros por meio de interações eletrostáticas, através da técnica de eletrossíntese, na faixa de pH entre 7 e 9.

A razão ideal para a formação de complexos entre a GX e proteínas varia de acordo com a proteína empregada (SOUZA, GARCIA-ROJAS, 2017). No estudo conduzido por Laneville et al., (2000) a razão entre as proteínas do soro e a GX foi o parâmetro que mais influenciou no tamanho e demais propriedades dos complexos obtidos. Maiores concentrações de proteína em relação a GX favoreceram a formação de agregações entre as proteínas, a elevação da viscosidade e a formação de complexos maiores. Além da diferença no potencial de ionização dos BPs, empregados em condições favoráveis para a coacervação, uma outra possível explicação para a diferença na proporção encontrada para a formação do complexo coacervado entre a GX e a LF e entre a GX e a GE-A pode estar relacionada à diferença na MM entre essas duas proteínas (YE et al., 2008, TURGEON et al., 2007). Uma vez que a MM encontrada para a GE-A (127 kDa) foi maior que a relatada pela literatura para a LF (cerca de 80 kDa), a quantidade de GE-A requerida para a coacervação complexa com a GX foi comparativamente menor que a requerida para a LF.

5.3 Microencapsulação do ácido ascórbico

5.3.1 Formação e estabilização de emulsões

A etapa de formação de uma emulsão primária estável contendo o núcleo, do tipo água em óleo é crítica, sendo fundamental para eficiência de encapsulação e retenção do núcleo hidrossolúvel microencapsulado por coacervação complexa (SHADDEL et al., 2018, ESTÉVEZ et al., 2019, DA CRUZ et al., 2019). As emulsões primárias do tipo água-em-óleo (A_1/O) para cada sistema são apresentadas na Figura 18 (a) e (b), tendo sido preparadas com os mesmos tempos e velocidades de rotação, diferencia-se apenas no teor de óleo de milho e de solução de AA para cada sistema.



Figura 18: Emulsões primárias contendo óleo de milho e o AA disperso: (a) sistema com GE; (b) sistema com LF. Imagens realizadas em microscópio óptico, com aumento de 100x.

Essa emulsão foi feita para ambos os sistemas estudados com as mesmas velocidades de rotação e tempos de emulsificação utilizados por Comunian et al. (2013). Nos dois sistemas, foram obtidas pequenas gotículas da solução do AA em água dispersas no óleo de milho.

Para a produção das emulsões secundárias também foram adotados os mesmos parâmetro de produção que Comunian et al. (2013), diferindo em relação a proteína empregada: GE tipo A ou LF. A Figura 19 (a) e (b) ilustra a emulsão dupla ($A_1/O/A_2$) para cada sistema.

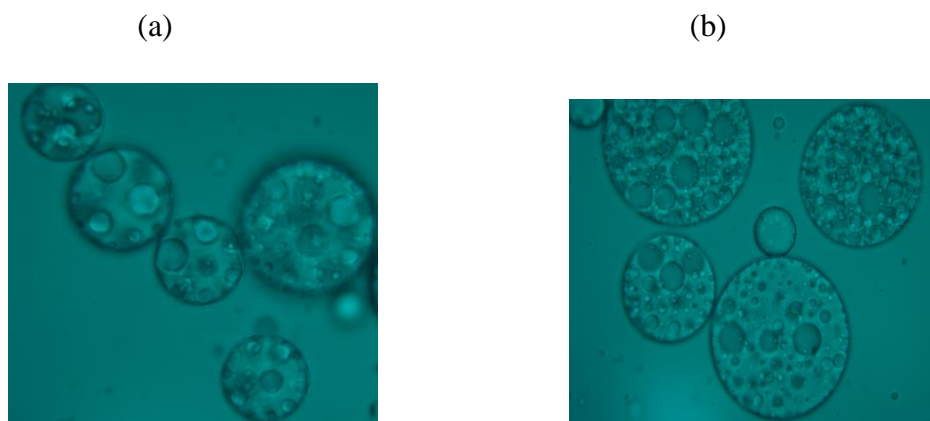


Figura 19: (a) Emulsão dupla feita a partir da proteína GE; (b) Emulsão dupla feita a partir da proteína LF. Imagens realizadas em microscópio óptico, com aumento de 100x.

A observação no microscópio óptico das estruturas das emulsões secundárias sugerem uma melhor estabilização do sistema contendo GE-A, comparado ao que contém LF, por conta de uma distribuição mais regular e de menor tamanho das partículas formadas. Emulsões de menor tamanho levam a formação de microcápsulas com maior estabilidade (BAMBA et al., 2018, YOUNG et al., 1993, BENICHOU et al., 2007, QIAN et al., 2011).

Propriedades físico-químicas das proteínas como solubilidade, polaridade, flexibilidade, conformação, ramificação, massa molar e carga são essenciais para o seu desempenho de formação e estabilização de estruturas coloidais. Proteínas exercem grande influência na formação e estabilização de emulsões, já que são adsorvidas em torno das gotículas da emulsão, prevenindo a sua coalescência. A quantidade e o tipo de proteína empregada afetam significativamente nas propriedades de formação e de estabilização das emulsões (GULÃO et al., 2018, MCCLEMENTS, 2018, JOYE, MCCLEMENTS, 2014, MCCLEMENTS et al., 2007). A eficiência da GE para a estabilização de emulsões parece diminuir com o aumento de sua concentração no sistema (RAWDKUEN et al., 2013). Assim como a concentração, a massa molecular da GE também parece desempenhar uma função importante para a estabilização de emulsões (GÓMEZ-GUILLEN et al., 2011). Um estudo, realizado por Rahayu et al. (2015), comparou as propriedades de emulsificação de diferentes sistemas contendo GE e proteínas do soro, acrescidas de polifenóis utilizados como *crosslinkers*. Nesse estudo, a GE apresentou melhores propriedades de formação e estabilização de emulsões, possivelmente por conta de sua maior massa molecular em comparação com a massa molecular das proteínas do soro. A adição dos polifenóis melhorou o desempenho das proteínas do soro, que ao estarem ligadas tiveram a sua massa molar aumentada, enquanto piorou as propriedades da GE, por ter aumentado sua massa molar para além de sua faixa ótima de desempenho. A capacidade de formação e estabilização de emulsões a partir de proteínas do soro é potencializada quando proteínas são utilizadas

em associação, com efeito sinérgico entre proteínas (CHEN, YUE, LIU et al., 2018). No caso da lactoferrina, melhora consideravelmente quando a lactoferrina está associada a polifenóis (LIU et al., 2015), a outras proteínas (GULÃO et al., 2018, LESMES et al., 2010) e a polissacarídeos aniônicos (TOKLE et al., 2010).

5.3.2 Formação das microcápsulas por coacervação complexa após a emulsificação

A GX é um hidrocolóide poli-eletrólito com excelentes propriedades de estabilização de emulsões. Assim, a adição da GX à dupla emulsão, além de ter promovido a coacervação complexa, adicionalmente, contribuiu para a proteção e estabilização do núcleo previamente emulsificado. A estrutura de cada sistema de microcápsulas coacervadas encontra-se na Figura 20 (a) e (b).

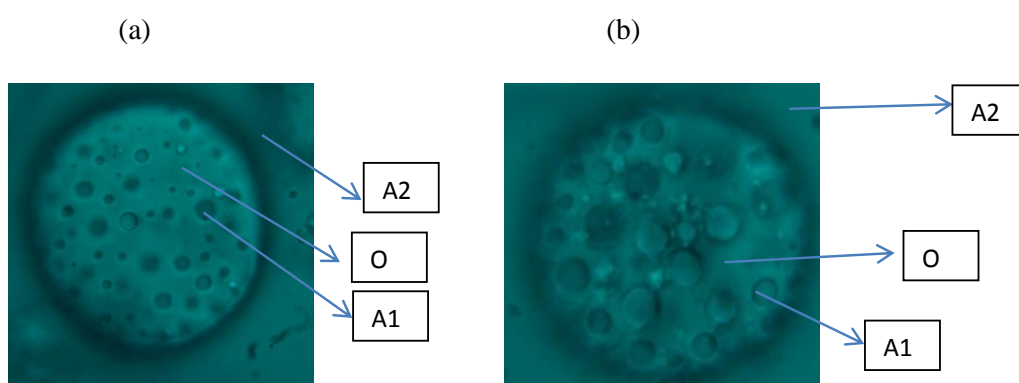


Figura 20: Microcápsulas de AA coacervadas por (a) complexo entre GX e GE; (b) complexo entre GX e LF. Imagens realizadas em microscópio óptico, com aumento de 100x.

Diversos estudos mostram as propriedades estabilizantes de emulsões da GX. Foi empregada para a estabilização de emulsões duplas, do tipo A/O/A e microencapsulação com liberação controlada da insulina (MUTALIYEVA et al., 2017). Seu uso promoveu estabilidade de emulsões constituídas por óleo e proteínas, susceptíveis à variações de temperatura, como congelamento e liofilização e também em altas concentrações de sal (XU et al., 2017, QIU et al., 2015, MUN et al., 2007).

A coacervação complexa, para ambos os sistemas, pôde ser observada em microscópio óptico através da formação de uma camada contínua e ligeiramente espessa circundante à emulsão (ACH et al., 2015, AGNIHOTRI et al., 2012, WEINBRECK et al., 2004), ocorrida após a adição da solução de GX e adequado ajuste do pH. A espessura das microcápsulas influencia tanto na liberação do núcleo quanto na sua estabilidade. Quanto mais espesso, maior a estabilidade e menor a difusividade (JACKSON, LEE, 1991). Num estudo realizado por Jiménez-Alvarado et al., (2009) a espessura do complexo entre proteínas e polissacarídeos adsorvido em torno das gotículas da múltipla emulsão foi o fator que pareceu ter tido a maior influência na funcionalidade do bisglicianato ferroso (núcleo). Ma et al., (2019) em seu estudo de microencapsulação por coacervação complexa observou que o aumento da espessura do material de parede promoveu aumento da proteção do núcleo até um ponto ótimo, a partir do qual não o protege mais tão efetivamente e apenas reduz a capacidade de

carregamento das microcápsulas. O maior carregamento das microcápsulas devido ao aumento na quantidade de gotículas de óleo promoveu uma diminuição na espessura da parede da microcápsula e consequente aumento na taxa de liberação do repelente microencapsulado (MAJI, HOUSSAIN, 2009).

A esquematização do sistema configurado com a coacervação complexa após a produção de uma emulsão dupla do tipo A1/O/A2 (WEI, HUANG, 2019, ADITYA et al., 2017) mostra uma estrutura de emulsão do tipo água-em-óleo (na qual o composto bioativo encontra-se solubilizado na fase aquosa) recoberta pelo complexo coacervado entre a proteína e o polissacarídeo. Observando-se no microscópio essa estrutura, visualiza-se que a emulsão A/O obtida, assim como a A1/O também é polinucleada, mas apresenta gotículas da fase aquosa dispersa maiores que as da A1/O. Emulsões líquidas do tipo A/O são sistemas estabilizados basicamente por forças estéricas e são bastante susceptíveis à sedimentação, floculação e/ou coalescência por conta da grande mobilidade das gotículas da fase aquosa (USHIKUBO, CUNHA, 2014, DICKINSON, 2012). A técnica de coacervação complexa aplicada após processos de emulsificação contribuiu, portanto, para a promoção da estabilidade, ao proteger a emulsão de efeitos indesejáveis como a coalescência e a floculação por conta do aumento de forças estéricas (CHEN, YUE, LIU et al., 2018, MOSCHAKIS, BILIADERIS, 2017).

Nesse trabalho tanto as emulsões quanto as microcápsulas coacervadas apresentaram morfologia e estruturas similares a de outros trabalhos de microencapsulação de compostos hidrofílicos por coacervação complexa com etapa prévia de dupla emulsificação (ESTÉVEZ et al., 2019, SHADDEL et al., 2018, COMUNIAN et al., 2013, ROCHA-SELMÍ et al., 2013, SANTOS et al., 2015).

5.4 Eficiência de encapsulação

Na Tabela 5 apresentam-se os resultados de eficiência de microencapsulação obtidos para os sistemas de microencapsulação do AA empregando o complexo coacervado entre a GX e a GE-A como material de parede.

Tabela 5: Eficiência de microencapsulação do AA para tratamentos do sistema GX e GE-A na razão de 1:2 entre o polissacarídeo e a proteína.

Tratamento	Concentração % BP do MP	Proporção MP: N	EE%	Estatística (A, B, ..., J)
E1	1,20	1:1	49,26 ± 1,17	E
E2	1,05	1:1	59,76 ± 1,10	D
E3	0,84	1:1	48,21 ± 0,77	E
E4	1,20	1: 0,75	63,34 ± 1,52	C
E5	1,05	1: 0,75	73,00 ± 0,70	A
E6	0,84	1: 0,75	44,17 ± 1,49	F
E7	1,20	1: 0,50	47,48 ± 1,07	E
E8	1,05	1: 0,50	44,09 ± 1,10	G
E9	0,84	1: 0,50	65,73 ± 0,33	B
E10	1,20	1: 0,25	24,06 ± 1,01	J
E11	1,05	1: 0,25	40,35 ± 1,24	H
E12	0,84	1: 0,25	27,22 ± 0,94	I

Letras iguais não se diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%. De A para J: ordem decrescente de eficiência de encapsulação. Legenda: BP: Biopolímero, MP: Material de Parede, N: Núcleo, EE%: Eficiência de Encapsulação.

Houve diferença significativa segundo o teste de Tukey ao nível de significância de 5% entre quase todos os tratamentos realizados. Apenas os tratamentos E1, E3 e E7 não apresentaram diferença significativa entre si. O tratamento E5 (A) apresenta a maior eficiência do estudo realizado e o tratamento E10 (J) a menor, correspondente a 24,06%. Em relação ao teor de material de parede empregado (% MP) para as concentrações de 0,84% e 1,05% todos os tratamentos variaram entre si. Para a concentração de 1,20% não houve diferença significativa para os tratamentos contendo 50% e 100% de N entre si, mas houve diferença significativa para os tratamentos com 25% e 75% de N, que também se diferenciaram entre si. Em relação ao teor de N todas as análises apresentaram diferença significativa entre si em todos os tratamentos. A única exceção ocorreu para o tratamento contendo 100% de N, em que o rendimento das microcápsulas contendo 0,84% e 1,20% de MP não se diferenciaram entre si, mas apresentaram diferença em relação às que continham 1,05% de MP. Por meio desta análise, pode-se afirmar que a concentração de BP que apresentou os melhores valores de eficiência foi a de 1,05% e que a melhor proporção de N em relação a quantidade de MP foi a de 75%. Os menores valores de eficiência foram obtidos para a razão de núcleo de 25%. Comunian et al. (2013), em seu estudo de microencapsulação do AA por coacervação complexa entre a GE e a GA também obteve como razão ótima 75% de N em relação ao MP, mas empregou maiores concentrações totais de BP no MP em comparação à este trabalho.

Na Tabela 6 é apresentado os valores de eficiência obtidos para as microcápsulas formadas do complexo coacervado entre a GX e a LF. Nesta Tabela observa-se que a análise pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% mostrou que quando a quantidade de N correspondia a 100% da quantidade total de BP no MP, nenhum dos 3 tratamentos estudados (E1, E2 e E3) variaram estatisticamente entre si. O contrário foi observado quando a quantidade de N foi 50% da quantidade de MP, todos os 3 (E7, E8 e E9) tratamentos estudados apresentaram variações entre si. Novamente, a proporção de 75% de N em relação ao MP foi a que conduziu aos melhores resultados do estudo, sendo o tratamento E4 o de maior eficiência do estudo, correspondendo a 83,83% ± 0,95 %. Esse tratamento não se diferenciou estatisticamente do tratamento E5, mas apresentou diferença do tratamento E6.

Tabela 6: Eficiência de microencapsulação do AA obtida para tratamentos do sistema GX e LF na razão de 1:6 entre o polissacarídeo e a proteína.

Tratamento	Concentração % BP do MP	Proporção MP: N	EE%	Estatística (A, B, C, D, E)
E1	1,05	1:1	75,02 ± 1,54	B
E2	0,7	1:1	76,48 ± 1,80	B
E3	0,49	1:1	73,06 ± 1,79	B,C
E4	1,05	1: 0,75	83,83 ± 0,95	A
E5	0,7	1: 0,75	83,19 ± 0,37	A
E6	0,49	1: 0,75	75,43 ± 3,14	B
E7	1,05	1: 0,50	57,04 ± 1,77	D
E8	0,7	1: 0,50	69,25 ± 2,08	C
E9	0,49	1: 0,50	51,02 ± 0,82	E

Letras iguais não se diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%. De A para E: ordem decrescente de eficiência de encapsulação. Legenda: BP: Biopolímero, MP: Material de Parede, N: Núcleo, EE%: Eficiência de Encapsulação.

A concentração de BPs ideal para a promoção da coacervação complexa varia conforme os polieletrólitos empregados (WEINBRECK et al., 2003). O uso da GX associada a proteínas como MP, em concentrações totais de BP de revestimento que variaram de 0,49% a 1,05% para as microcápsulas formadas por complexos coacervados entre a LF e a GX e entre 0,84% a 1,2%, quando o BP utilizado foi o complexo coacervado entre a GX e a GE-A mostrou-se adequado, assim como no estudo realizado por Weinbreck et al. (2004), em que a concentração total de biopolímeros coacervados na faixa entre 0,5 – 1% foi suficiente para a microencapsulação do óleo de laranja. Outros estudos da literatura para a microencapsulação de compostos bioativos empregaram concentrações totais de BP no MP similares. Wang et al. (2016), promoveram a microencapsulação do óleo de gengibre por coacervação complexa entre a GE-B e o alginato de sódio tendo como condições ideais a razão 1:6 entre o polissacarídeo e a proteína, pH igual a 3,5, proporção entre MP e N de 1:1 e concentração total ótima de BP no MP igual a 1%, acima da qual houve formação de agregados. Concentrações mais altas de material de parede estão associadas a menores taxas de liberação do núcleo e a maiores estabilidades térmicas das microcápsulas (MAJI, HOUSSAIN, 2009).

5.5 Estabilidade das microcápsulas

Na Figura 21 são apresentados os resultados da análise de estabilidade obtidos neste trabalho.

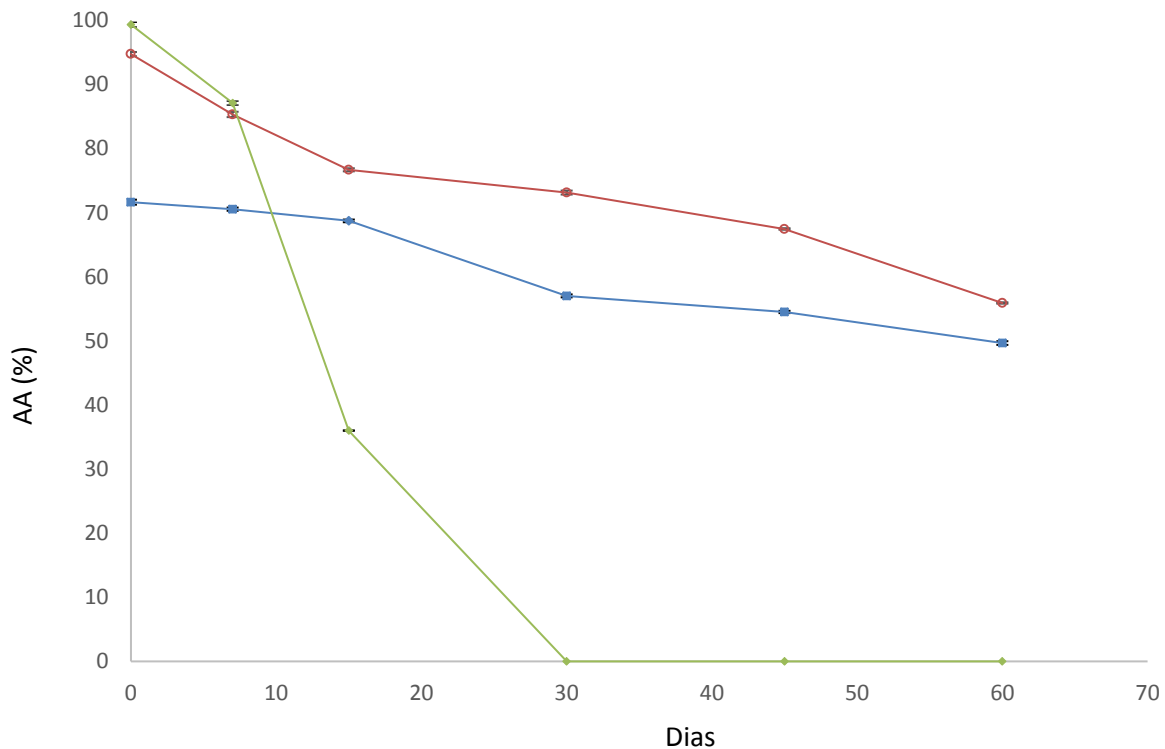


Figura 21: Estabilidade do AA armazenado a 25°C em presença de O₂. Os dados representam a média \pm desvio padrão (n = 3).

Legenda: MC_LF_GX: azul, MC_GE_GX: vermelho, AA livre: verde

Houve degradação tanto do AA livre como no AA microencapsulado. No entanto, nessas condições de estudo, após 23 dias ocorreu completa degradação do AA no estado livre, enquanto que para o AA microencapsulado houve uma degradação menos pronunciada e adequada proteção por pelo menos 30 dias. Após 45 dias ainda havia 54,52% de AA nas MC_LF_GX e 67,47% de AA nas MC_GE_GX. No entanto, as microcápsulas de ambos os sistemas estudados começaram a apresentar alterações de cor (amarelamento) o que denota a degradação do AA. Em 60 dias foi percebida um tom amarelo mais intenso, embora ainda houvesse algum teor de AA remanescente: 49,67% nas MC_LF_GX e 55,92% nas MC_GE_GX. Após esse mesmo período (60 dias), em outros trabalhos de microencapsulação do AA por coacervação complexa precedida de dupla emulsificação, empregando GE-B e GA, nos sistemas de melhor desempenho, houve uma manutenção menor, de 34,4% (DA CRUZ et al., 2019) e maior, de 73,6% (COMUNIAN et al., 2013) que as obtidas neste trabalho.

Um fator que pode justificar o melhor resultado de estabilidade das MC_GE_GX em comparação com as MC_LF_GX é a diferença de massa molar entre as duas proteínas, sendo a MM da GE-A maior que a MM da LF. A MM dos BPs que compõem os MPs influencia significativamente a capacidade de retenção e estabilização de Ns vulneráveis à oxidação, como o AA, por afetar a difusividade do núcleo e de compostos externos ao material de parede, como o oxigênio (DRUSCH et al., 2009). Desobry et al.

(1999), por exemplo, incorporaram maltodextrinas de menor dextrose equivalente (DE) (ou seja, de maior MM) ao material de parede. Com isso, houve melhor capacidade de estabilização do β -caroteno microencapsulado, aumentando o seu tempo de meia vida de 6 semanas, utilizando maltodextrinas 25DE, para 17 semanas (com o uso de maltodextrinas 4DE). Uma justificativa para isso seria de que o uso do polissacarídeo com maior massa molecular promoveu uma redução do tamanho dos poros das microcápsulas ou o seu preenchimento, limitando a entrada do oxigênio no seu interior.

Outro fator que pode ter influenciado esses resultados foi a combinação entre os BP de maior MM (GX) e de menor MM (LF ou GE-A), conforme observou Koida et al., (1984) em seu estudo para a microencapsulação do AA por coacervação complexa empregando polímeros (etilcelulose e poli-iso-butileno). Enquanto nas MC_GX_GE, a GX representa 33,3% do total de BP no MP, sendo os outros 66,6% de GE-A, nas MC_GX_LF o teor de GX presente no MP é de 14,3% enquanto que o da proteína LF é de 85,7% do total de BP no MP. Cai et al. (2019), obtiveram resultados semelhantes: houve aumento da estabilidade oxidativa com o aumento da concentração de GX no sistema de revestimento contendo amido carboximetilado para a microencapsulação de antocianinas de mirtilo pela técnica de liofilização.

5.6 Análise de Infravermelho (FTIR)

Na Figura 22 encontram-se os espectros da análise de FTIR para a GX pura, GE pura, AA puro e microcápsulas de AA em complexo coacervado entre GX e GE como material de parede na razão polissacarídeo: proteína de 1: 2.

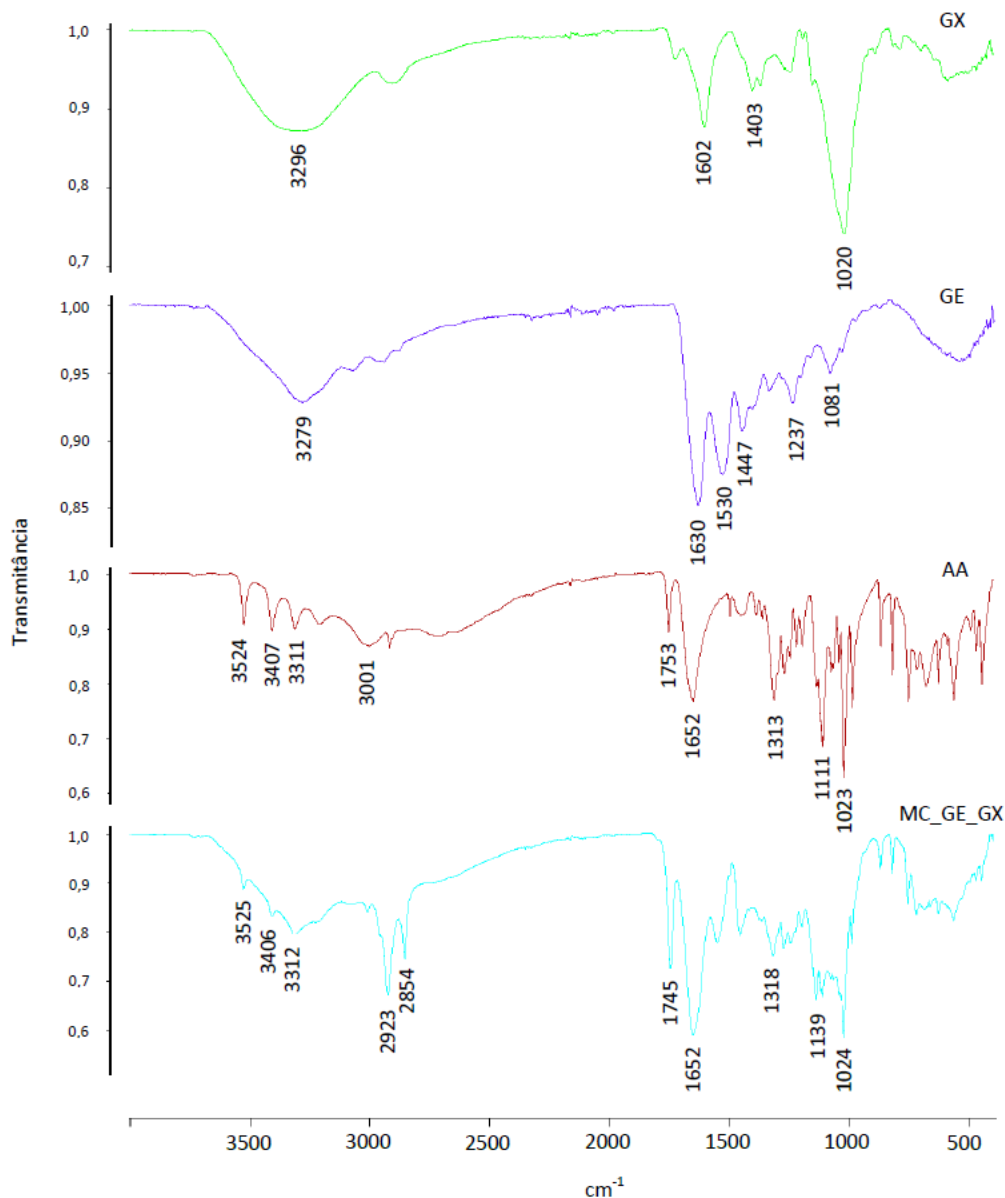


Figura 22: Espectros de FTIR referentes à GX pura, GE pura, AA puro e microcápsulas de AA formadas pelo complexo entre GX e GE.
 Legenda: GX: verde, GE: roxo, AA: vermelho, MC_GE_GX: ciano.

Para o AA podem ser observadas bandas características, como em 1753 cm^{-1} , associada à lactona (C=O). Em 1652 cm^{-1} , banda associada a (C=C); em 3524 cm^{-1} , 3407 cm^{-1} e 3311 cm^{-1} observam-se bandas referentes a (-OH). Em 1023 cm^{-1} tem-se a banda relacionada a ligação C-O (DE SOUZA et al., 2015).

No espectro da GX podem ser visualizadas bandas características, como a de -OH em ligação de hidrogênio, ocorrida em 3296 cm^{-1} ; a do grupamento acetil em 1020 cm^{-1} e também bandas características do ânion carboxilato da cadeia lateral do polissacarídeo, em 1602 cm^{-1} e 1403 cm^{-1} (SOUZA, GARCIA-ROJAS, 2017, FAREEZ et al., 2015). Analisando-se a GE-A é possível observar bandas do grupo amida I, II e II em 1630 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} e 1237 cm^{-1} , respectivamente. Também observa-se em 3279 cm^{-1} ligações de amida devido aos estiramentos de (-OH) e (NH). (WANG et al., 2018, DE SOUZA et al., 2018). Através do espectro das MC_GE_GX é possível observar a formação de um novo biopolímero proveniente da interação entre a GE-A e a GX, com o deslocamento de grupamentos característicos dos BPs individualmente (SANTOS et al., 2018b) com a formação de um perfil de bandas de amida, na faixa compreendida

entre 1460 e 1600 cm^{-1} , típicas da interação entre grupamentos amino, da proteína, e carboxilato, do polissacarídeo, decorrentes da interação entre esses BPs para a formação do complexo coacervado, com morfologia semelhante a encontrada em outros estudos similares (SOUZA, GARCIA-ROJAS, 2017, GULÃO et al., 2016, COMUNIAN et al., 2013).

Na Figura 23 encontram-se os espectros da análise de FTIR para a GX pura, LF pura, AA puro e microcápsulas de AA em complexo coacervado entre GX e LF como material de parede na razão polissacarídeo: proteína de 1: 6. Nesta Figura a imagem da LF, é perceptível bandas do grupo amida I, II e II em 1632 cm^{-1} , 1521 cm^{-1} e 1383 cm^{-1} , respectivamente, além da banda referente ao estiramento (-OH) de aminoácidos livres (BASTOS et al., 2018). No espectro das MC_LF_GX tem-se um BP de revestimento com características similares às da LF e às da GX, mas com características próprias, apesar manutenção das bandas dos grupamentos principais de cada BP individualmente, deslocadas em decorrência da interação entre a proteína e o polissacarídeo (SANTOS et al., 2018b, SOUZA, GARCIA-ROJAS, 2017). A presença do AA nas microcápsulas pode ser observada por grupamentos do AA já mencionados anteriormente, além do pico em 1441 cm^{-1} que pode ser atribuída a ligação (C-H) (DA CRUZ et al., 2019).

Para ambos sistemas de cápsulas também foi possível visualizar bandas em 2923 ± 1 cm^{-1} e em 2854 cm^{-1} presentes usualmente em microcápsulas formadas por complexos coacervados com etapa prévia de dupla emulsificação e que estão associadas à estrutura de carboxila negativamente carregada, podendo indicar polissacarídeo ionizado que não interagiu integralmente com a proteína (SHADDEL et al., 2018, COMUNIAN et al., 2013). Também foram observadas bandas do AA, minimamente deslocadas em relação ao espectro de AA puro, sugerindo não haver interação significativa entre o material de parede e o núcleo (DA CRUZ et al., 2019).

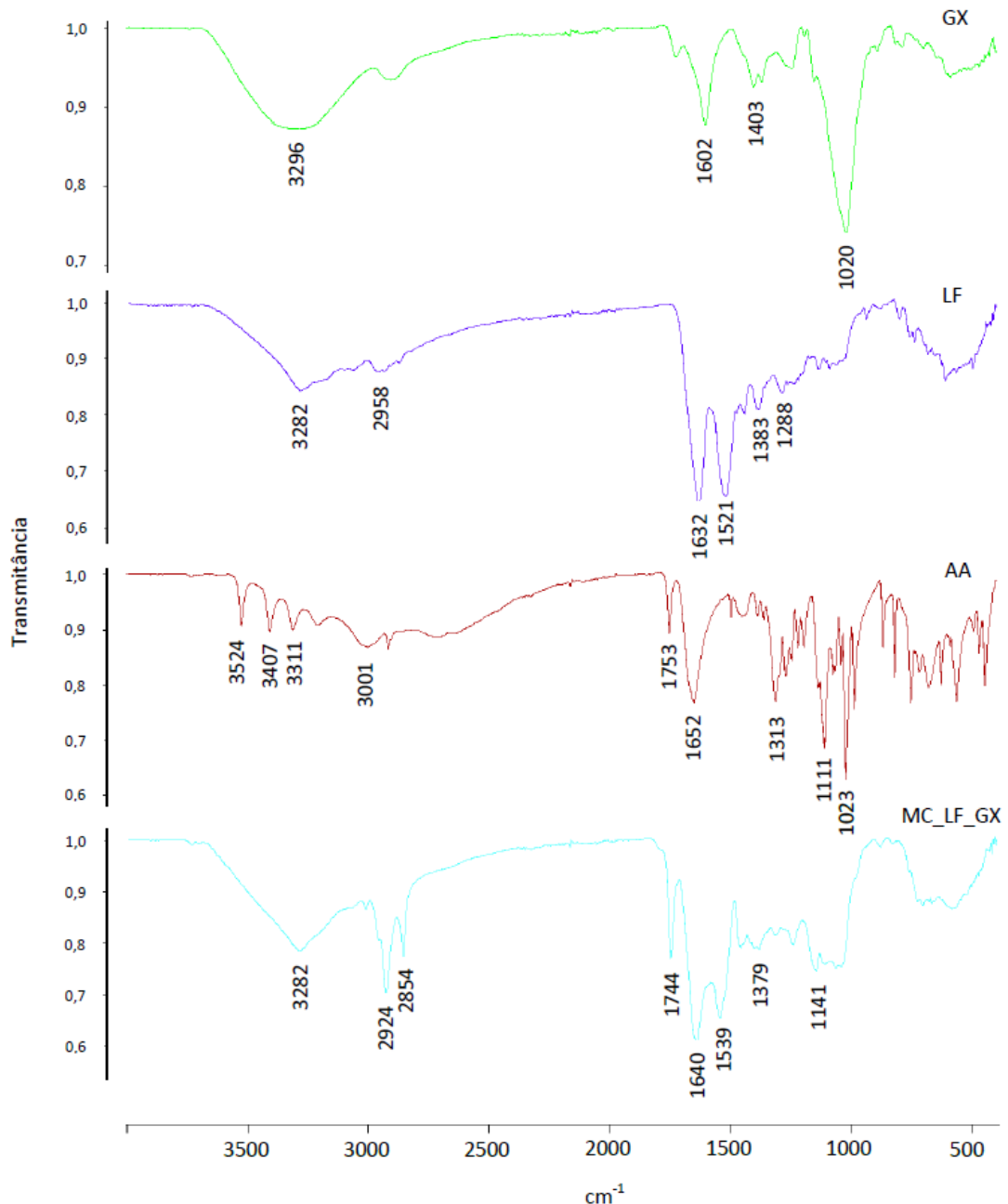


Figura 23: Espectros de FTIR referentes à GX pura, LF pura, AA puro e microcápsulas de AA formadas pelo complexo entre GX e LF.

Legenda: GX: verde, LF: roxo, AA: vermelho, MC_LF_GX: ciano.

5.7 Análises térmicas

5.7.1 TGA

Na Figura 24 é possível visualizar os resultados da análise do AA puro, da GX pura, da LF pura e da microcápsula de AA formada pelo complexo coacervado entre a GX e a LF. Nesta Figura observa-se que o AA apresentou um primeiro evento entre 60 e 100 °C associado a perda de água e outro evento maior com degradação significativa ocorrida na faixa de temperatura entre 190 °C e 285 °C, com perda de massa de 40,7%. Da Cruz et al. (2018), observou para o AA dois eventos térmicos; um ocorrido na faixa de temperatura compreendida entre 193 °C e 250 °C (com 31% de perda de massa) e

outro na faixa entre 275° C e 311° C (com 12,4% de perda de massa), atribuindo-se a decomposição do material ao evento principal. Em outro estudos similar, AA não demonstrou perdas de massa significativas antes da sua temperatura de fusão (em torno de 195 °C), mas logo e seguida apresentou decomposição pronunciada, com quase total perda de massa (DEVI et al, 2013).

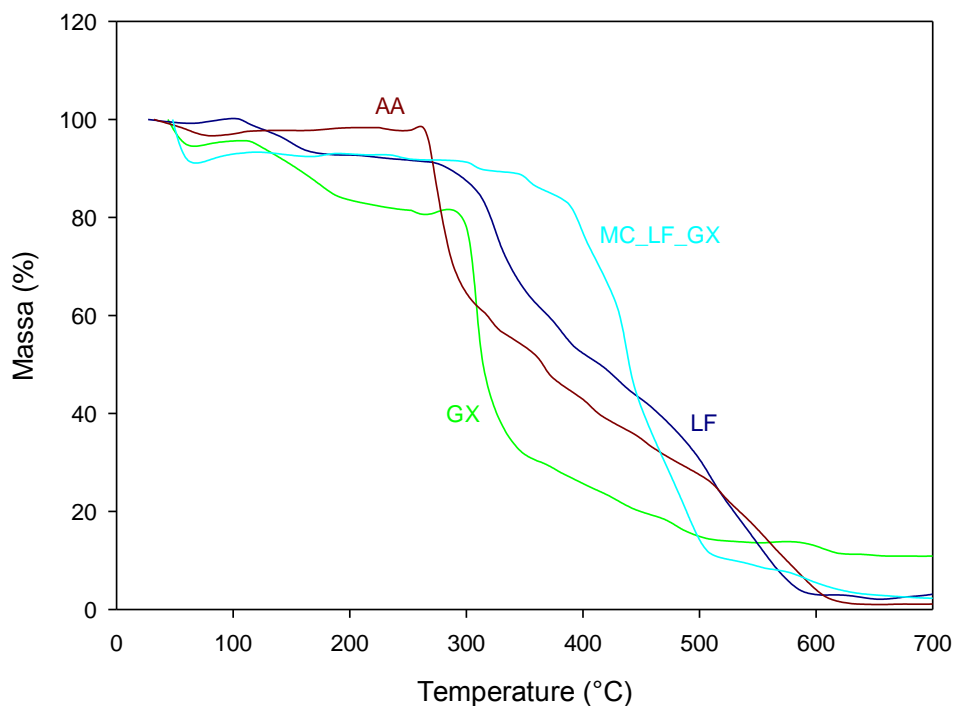


Figura 24: Análise de TGA para as microcápsulas formadas do complexo GX e LF e padrões.
 Legenda: AA: vermelho, GX: verde, LF: azul marinho, MC_LF_GX: ciano.

Nos resultados da análise da LF observa-se que ela sofreu degradação na faixa entre 280 e 350 °C, com perda de massa de mais de 30%. A estabilidade térmica dessa proteína varia em função do seu grau de saturação com o ferro (BOKKHIM et al., 2013). Observou-se significativa degradação na faixa de temperatura compreendida entre 400 °C e 500 °C para as microcápsulas formadas pelo complexo coacervado entre GX e LF, com mais de 60% de perda de massa que pode ser associada à liberação do núcleo juntamente com a decomposição da proteína e do polissacarídeo empregados no MP (DA CRUZ et al., 2018).

Na Figura 25 são apresentados os resultados da análise do AA puro, da GX pura, da GE pura e da microcápsula de AA formada pelo complexo coacervado entre a GX e a GE. Ocorreu para as MC_GE_GX um comportamento de degradação semelhante às MC_LF_GX, mas em diferente faixa de temperatura: entre 450 °C e 510 °C. Observa-se uma aguda degradação da GX em um faixa de temperatura entre 260 °C e 330 °C, com mais de 60% de perda de massa. Caddeo et al. (2014), determinaram que a estabilidade térmica da GX está compreendida na faixa de temperatura entre 200°C e 230 °C, com ocorrência de um evento exotérmico em 283°C associado à degradação térmica do BP. No estudo realizado por Outuki et al. (2016), a GX apresentou eventos associados à dessorção de água na faixa de temperatura entre 0 e 100 °C, com degradação do composto a partir de 200 °C.

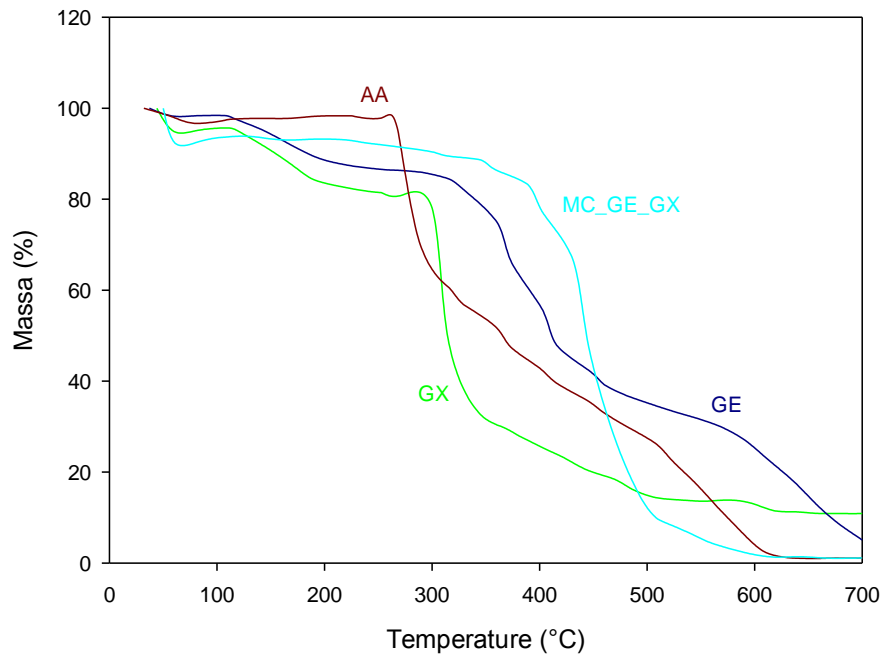


Figura 25: Análise de TGA para as microcápsulas formadas do complexo GX e GE e padrões.
 Legenda: AA: vermelho, GX: verde, LF: azul marinho, MC_LF_GX: ciano.

A degradação da GE-A ocorreu a partir de 310 °C perdendo-se cerca de 45% da massa até que a temperatura alcançasse 400 °C, apresentando um comportamento semelhante ao observado por Gómez-Mascaraque et al. (2019), em que a degradação do material liofilizado ocorreu por volta de 306 °C.

A análise de DTG confirma o ganho de estabilidade do AA microencapsulado em relação ao AA não microencapsulado. Na Figura 26 estão apresentados os resultados para o sistema MC_GE_GX.

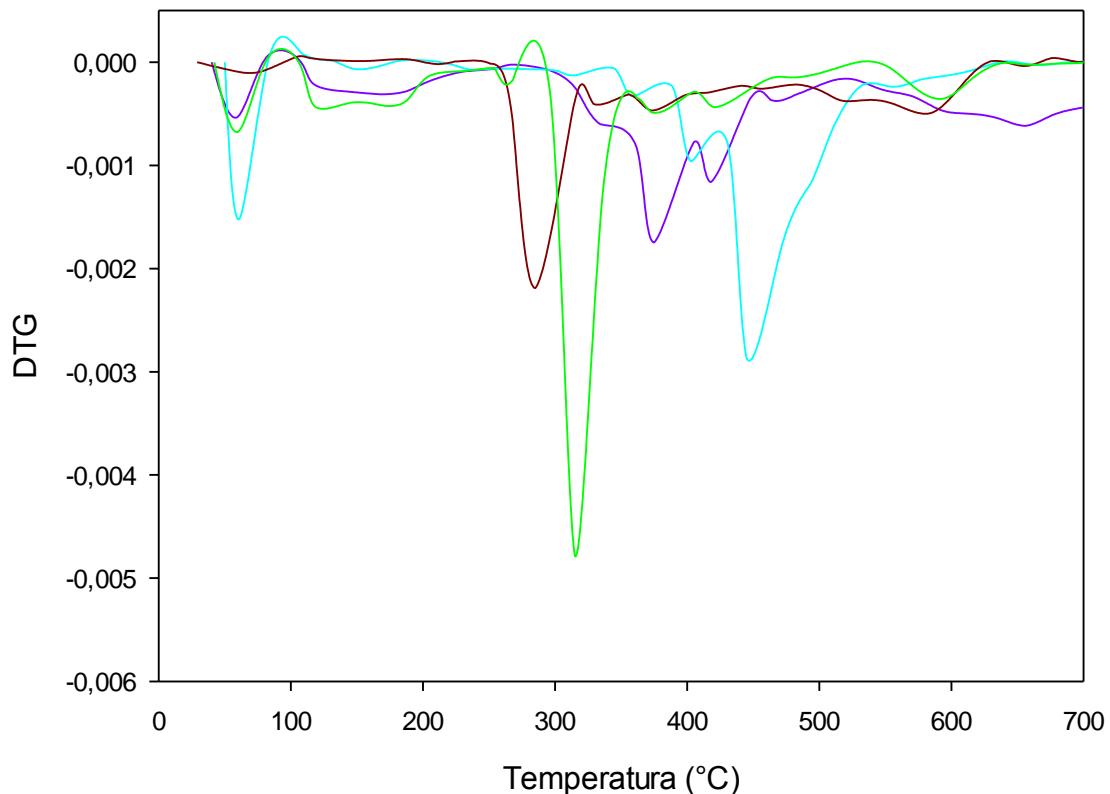


Figura 26: DTG para as microcápsulas de AA formadas pelo complexo coacervado entre GE e GX e padrões.

Legenda: GE: azul, AA: vermelho, GX: verde, MC_GE_GX: ciano

Os eventos térmicos de degradação ocorreram primeiramente para o AA puro, com pico em 285,92 °C seguido da GX pura, com pico em 316,93 °C; da GE-A pura com pico em 374,88 °C e finalmente das microcápsulas de AA, com pico em 447,37 °C. Observa-se que a GE-A apresentou melhor estabilidade térmica à degradação que o polissacarídeo empregado, assim como no estudo realizado por Devi et al., (2013), em que a GE-A também apresentou maior estabilidade térmica que o polissacarídeo empregado (alginato de sódio). Uma possível explicação para isso se deve à altíssima afinidade da GX pela água: alterações no teor de água promovem mudanças na rigidez, flexibilidade e alterações conformacionais da GX, o que pode ter desestabilizado o biopolímero à medida em que a água foi sendo removida conforme a temperatura aumentava (VALENTA et al., 2018, TORRES et al., 2012).

Na Figura 27 estão apresentados os resultados para o sistema MC_LF_GX, AA, LF e GX.

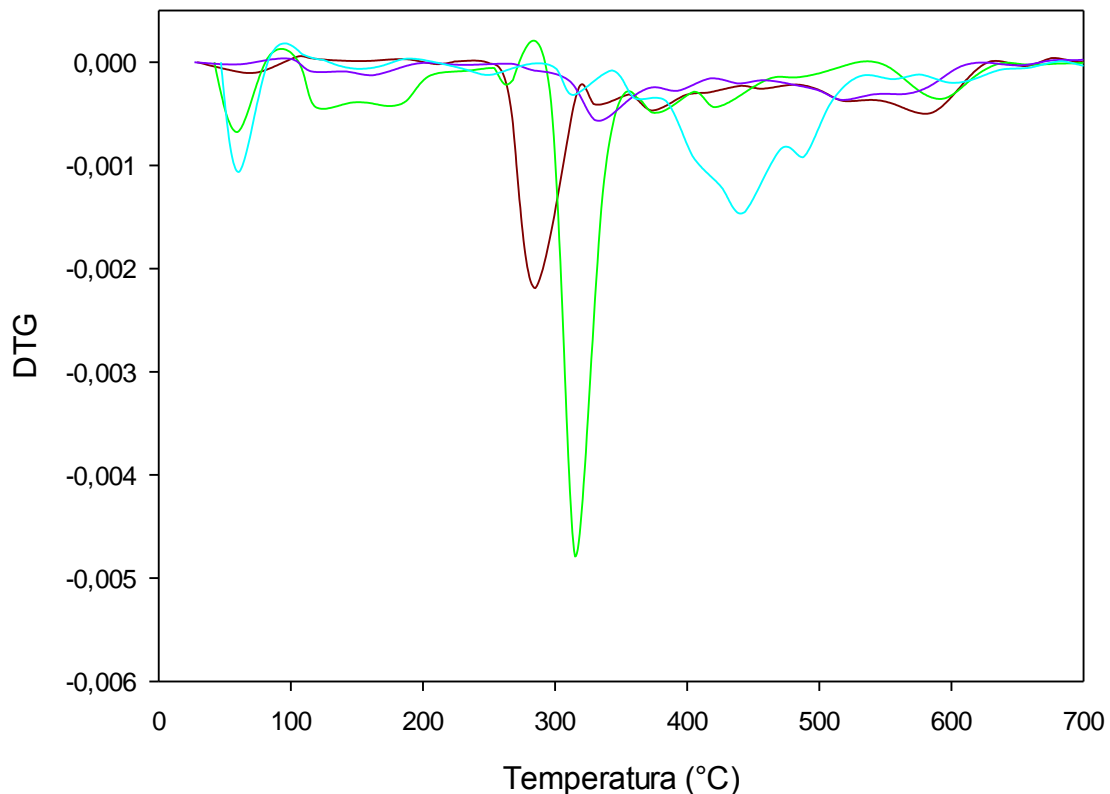


Figura 27: DTG para as microcápsulas de AA formadas pelo complexo coacervado entre LF e GX e padrões.

Legenda: LF: azul, AA: vermelho, GX: verde, MC_LF_GX: ciano

Os eventos térmicos de degradação ocorreram primeiramente para o AA puro, com pico em 285,92 °C, seguido da GX pura com pico em 316,93 °C, que se degradou juntamente com a proteína LF pura com pico em 333,29 °C. As MC_LF_GX se degradaram posteriormente, com pico em 439,97 °C.

Percebe-se tanto para as MC_GE_GX como para as MC_LF_GX um ganho da estabilidade térmica, em comparação ao AA não microencapsulado, visto que degradações e perdas de massa significativas ocorreram numa faixa de temperatura mais elevada. A interação da proteína com o polissacarídeo, ocorrida com a promoção da coacervação complexa, conferiu estabilidade térmica ao material de parede, protegendo as microcápsulas, por conta de mudanças estruturais causadas por interações intermoleculares entre os BPs, de igual modo ao relatado em outros estudos da literatura (GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2019, DA CRUZ et al., 2018, JIN et al., 2018).

5.7.2 DSC

Na Figura 28 são visualizados os resultados da análise de DSC do AA puro, da GX pura, da GE pura e da LF pura. Observando-se o espectro do AA puro tem-se um grande pico endotérmico em 194° C, temperatura correspondente à sua degradação, o que é um indicativo de sua cristalinidade (DE SOUZA et al., 2015, DEVI et al., 2013). A análise da GE-A revela um evento endotérmico com pico em 103°C, relacionado com a temperatura de desnaturação da proteína. Também há um grande evento endotérmico, com pico em torno de 200 °C, que pode estar associado à sua Tg (SOBRAL, HABITANTE, 2001). Observa-se que a LF pura tem-se um evento endotérmico entre

48 °C e 56 °C, com pico em 54 °C, correspondente à temperatura de desnaturação da LF nativa (BASTOS et al., 2018, BOKKHIM et al., 2013). No espectro da GX, foi observada a ocorrência de um evento endotérmico entre 40 °C e 47 °C, que pode estar relacionada a Tg desse polissacarídeo, que no estudo realizado por Bhat et al., (2014) foi de 45 °C. Já no estudo conduzido por Argin- Soysal et al. (2009), o estado de cristalinidade da GX justificou a sua Tg em 143 °C. Evidência da fusão da GX pôde ser visualizada por um evento endotérmico ocorrido em 170 °C e de degradação em pico exotérmico em torno de 230 °C (CADDEO et al., 2014).

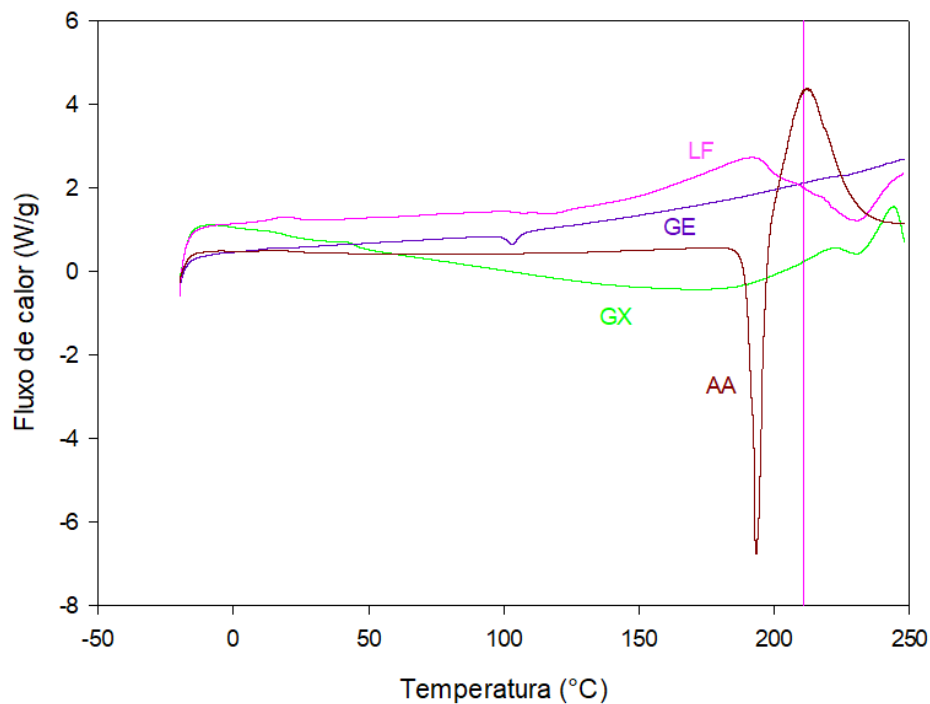


Figura 28: Análise de DSC para os padrões LF, GE-A, GX e AA.
Legenda: AA: vermelho, GE-A: roxo, LF: rosa, GX: verde.

Na Figura 29 são visualizados os espectros obtidos para os dois sistemas de AA microencapsulado: MC_GX_GE e MC_GX_LF. Tanto nas MC_GX_LF como nas MC_GE_GX observa-se a ausência de pico de fusão do AA, o que pode estar relacionada à perda de sua cristalinidade durante as condições de produção das microcápsulas, mas que também pode evidenciar o seu total revestimento pelo material de parede das microcápsulas (FROTA et al., 2018, DE SOUZA et al., 2015). Resultados similares foram alcançados por Devi et al. (2013), no estudo de microencapsulação do AA por coacervação complexa empregando GE-A e alginato de sódio como MP, na razão ótima de 3,5:1 e pH 3,75.

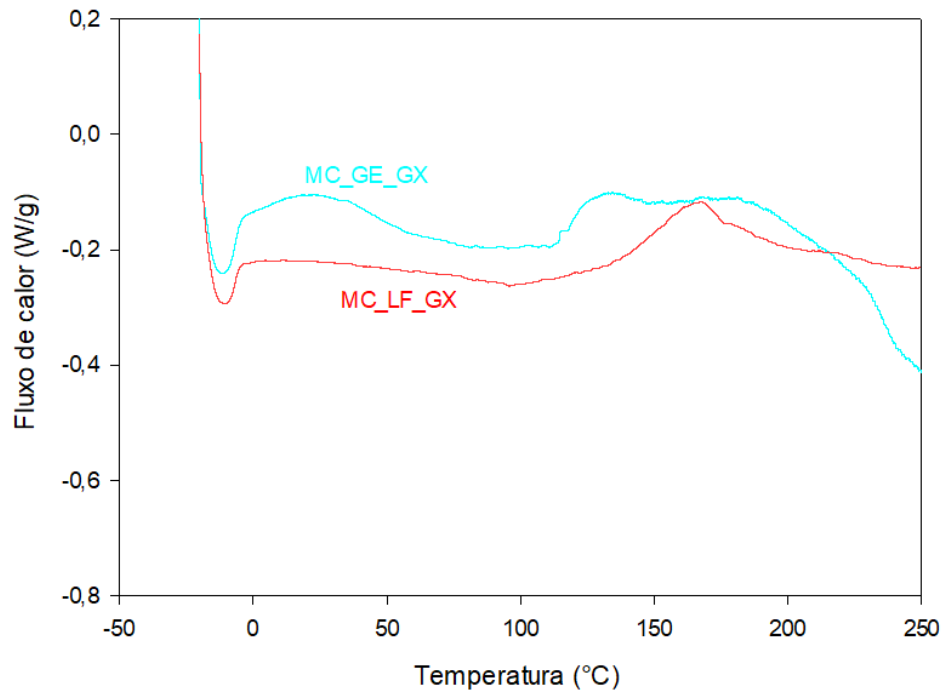


Figura 29: Análise de DSC para as microcápsulas formadas do complexo GX e proteínas (LF ou GE-A).
Legenda: MC_LF_GX vermelho, MC_GE_GX: ciano.

6 CONCLUSÃO

Foi possível a coacervação complexa entre a GX e as proteínas LF e GE-A, dado à capacidade de ionização dos BPs, empregados em condições adequadas para a coacervação. Complexos coacervados entre a GX e a LF demandaram um maior teor de proteína para a sua formação ótima, na razão de polissacarídeo para proteína de 1:6 em comparação com os complexos coacervados entre a GX e a GE-A, cuja formação ótima ocorreu na razão de polissacarídeo para proteína de 1:2. A diferença entre a MM das proteínas empregadas, bem como de suas capacidades de emulsificação certamente também influenciaram nas propriedades de formação e estabilização das cápsulas de AA formadas pela técnica de coacervação complexa precedida de dupla emulsificação. As análises de morfologia, FTIR e DSC proveram evidências da formação de microcápsulas. A coacervação complexa entre a GX e as proteínas conferiu prolongação da proteção ao oxigênio e aumento da estabilidade térmica, em comparação ao AA livre. Em ambos os sistemas de microcápsulas avaliados, houve aumento da estabilidade térmica, em comparação ao ácido ascórbico não encapsulado, através da coacervação complexa entre os biopolímeros, o que possibilitaria sua aplicação em produtos alimentícios.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, S.; WEI, C. D.; HAYAT, K.; XIAOMING, Z. Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends - A Review. **Food Reviews International**, v. 28, n. 4, p. 343–374, 2012.
- ACH, D.; BRIANÇON, S.; BROZE, G.; PUEL, F.; RIVOIRE, A.; GALVAN, J-M. Formation of microcapsules by complex coacervation. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v.93, p. 183-191, 2015.
- ADAL, E.; SADEGHPOUR, A.; CONNELL, S.; RAPPOLT, M.; IBANOGLU, E.; SARKAR, A. Heteroprotein complex formation of bovine lactoferrin and pea protein isolate: A multiscale structural analysis. **Biomacromolecules**, v.18, n° 2, p. 625–635, 2017.
- ADITYA, N. P.; ADITYA, S.; YANG, H.; KIM, H. W.; PARK, S. O.; KO, S. Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion. **Food Chemistry**, v. 173, p.7–13, 2015.
- ADITYA, N. P.; ESPINOSA, Y. G.; NORTON, I. T. Encapsulation systems for the delivery of hydrophilic nutraceuticals: Food application. **Biotechnology Advances**, v. 35, p.450-457, 2017.
- AGNIHOTRI, N.; MISHRA, R.; GODA, C.; ARORA, M. Microencapsulation – a novel approach in drug delivery: A review. **Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n° 1, p. 1- 20, 2012.
- ALOYS, H.; KORMA, S. A.; ALICE, T. M.; CHANTAL, N.; ALI, A. H.; ABED, S. M.; ILDEPHONSE, H. Microencapsulation by complex coacervation: methods, techniques, benefits, and applications – a review. **American Journal of Food Science and Nutrition Research**, v. 3, n° 6, p. 188 – 192, 2016.
- ALVIM, I. D.; STEIN, M. A.; KOURY, I. P.; DANTAS, F. B. H.; CRUZ, C. L. C. V. Comparison between the spray drying and spray chilling microparticles contain ascorbic acid in baked product application. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, p. 689 – 694, 2016.
- ANAL, A. K.; SHRESTHA, S.; SADIQ, M. B. Biopolymeric-based emulsions and their effects during processing, digestibility and bioaccessibility of bioactive compounds in food systems. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 691-702, 2019.
- AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**, Arlington, 16 th ed, v.2, p.3-5, 1984.
- ARGIN-SOYSAL, S.; KOFINAS, P.; LO, Y. M. Effect of complexation conditions on xanthan–chitosan polyelectrolyte complex gels. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n°1, p. 202 -209, 2009.
- BAMBA, B. S. B.; SHI, J.; TRANCHANT, C. C.; XUE, S. J.; FORNEY, C. F.; LIM, L. T.; XU, W.; XU, G. Coencapsulation of polyphenols and anthocyanins from blueberry pomace by double emulsion stabilized by whey proteins: Effect of homogenization parameters. **Molecules**, v. 23, p. 2525-2544, 2018.

- BASTOS, L. P. H.; DE CARVALHO, C. W. P.; GARCIA-ROJAS, E. E. Formation and characterization of the complex coacervates obtained between lactoferrin and sodium alginate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 332-338, 2018.
- BENASSI, M. D. T.; ANTUNES, A. J. A. A comparison of metaphosphoric and oxalic acids as extractants solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 31, n. 4, p. 507 – 513, 1988.
- BENGOECHEA, C.; JONES, O. G.; GUERRERO, A.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: Impact of composition, pH and thermal treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n°5, p. 1227-1232, 2011.
- BENICHO, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 294, p. 20-32, 2007.
- BHAT, V.; SHIVAKUMAR, H. R.; SHESHAPPA, R. K.; SANJEEV, G. Preparation and study on miscibility, thermal behavior of biocompatible polymer blends of xanthan gum-polyacrylamide. **International Journal of Plastic Technology**, v. 18, n° 2, p. 183 – 191, 2014.
- BOKKHIM, H.; BANSAL, N.; GRØNDAHL, L.; BHANDARI, B. Physico-chemical properties of different forms of bovine lactoferrin. **Food Chemistry**, v. 141, n°3, p. 3007-3013, 2013.
- BOSNEA, L. A.; MOSCHAKIS, T.; BILIADERIS, C. G. Microencapsulated cells of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in biopolymer complex coacervates and their function in a yogurt matrix. **Food & Function**, v. 8, p. 554-562, 2017.
- BOURBON, A. I.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Encapsulation and controlled release of bioactive compounds in lactoferrin-glycomacropptide nanohydrogels: Curcumin and caffeine as model compounds. **Journal of Food Engineering**, v. 180, p. 110-119, 2016.
- BOURGANIS, V.; KARAMANIDOU, T.; KAMMONA, O.; KIPARISSIDES, C. Polyelectrolyte complexes as prospective carriers for the oral delivery of protein therapeutics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 111, p. 44-60, 2017.
- BRUNCHI, C. E.; BERCEA, M.; MORARIU, S.; DASCALU, M. Some properties of xanthan gum in aqueous solutions: effect of temperature and pH. **Journal of Polymer Research**, v. 23:123, 2016.
- CADDEO, C.; NÁCHER, A.; DÍEZ-SALES, O.; MERINO-SANJUÁN, M.; FADDA, A. M.; MANCONI, M. Chitosan-xanthan gum microparticle-based oral tablet for colon-targeted and sustained delivery of quercetin. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, n° 7, p. 694 – 699, 2014.

CAI, X.; DU, X.; CUI, D.; WANG, X.; YANG, Z.; ZHU, G. Improvement of stability of blueberry anthocyanins by carboxymethyl starch/xanthan gum combinations microencapsulation. **Food Hydrocolloids**, v. 91, p. 238-245, 2019.

CALDERÓN-OLIVER, M.; PEDROZA-ISLAS, R.; ESCALONA-BUENDÍA, H. B.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; PONCE-ALQUICIRA, E. Comparative study of the microencapsulation by complex coacervation of nisin in combination with na avocado antioxidante extract. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 49-57, 2017.

CARNEIRO, H. C. F.; TONON, R. V.; GROSSO, C. R. F.; HUBINGER, M. D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using diferente combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 443-451, 2013.

CARVALHO, I. T.; ESTEVINHO, B. N.; SANTOS, L. Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products – a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, p. 109 – 119, 2016.

CARVALHO, J. D. S.; ORIANI, V. B.; OLIVEIRA, G. M.; HUBINGER, M. D. Characterization of ascorbic acid microencapsulated by the spray chilling technique using palm oil and fully hydrogenated palm oil. **LWT- Food Science and Technology**, v. 101, p. 306-314, 2019.

CASAS, J. A.; SANTOS, V. E.; GARCIA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n° 2 – 4, p. 282- 291, 2000.

CAZÓN, P.; VELAZQUEZ, G.; RAMÍREZ, J. A.; VAZQUEZ, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p.136-148, 2017.

CHAPEAU, A. L.; TAVARES, G. M.; HAMON, P.; CROGUENNEC, T. A, B, DENIS PONCELET, D.; BOUHALLAB, S. Spontaneous co-assembly of lactoferrin and b-lactoglobulin as a promising biocarrier for vitamin B9. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 280-290, 2016.

CHAWDA, P. J.; SHI, J.; XUE, S.; QUEK, S. Y. Co-encapsulation of bioactives for food applications. **Food Quality and Safety**, v. 1, n° 4, p. 302-309, 2017.

CHEN, H.; YUE, X.; LIU, S.; YIN, L. Complex coacervation of proteins and sugar beet pectin: stabilizing oil-in-water emulsions. **International Agricultural Engineering Journal**, v. 27, n° 1, p. 227- 236, 2018.

CHEN, X.; MCCLEMENTS, D. J.; WANG, J.; ZOU, L.; DENG, S.; LIU, W.; YAN, C.; ZHU, Y.; CHENG, C.; LIU, C. Co-encapsulation of (-)-Epigallocatechin-3-gallate and quercetin in particle-stabilized W/O/W emulsion gels: Controlled release and bioaccessibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n° 14, p. 3691-3699, 2018.

COMUNIAN, T. A.; NOGUEIRA, M.; SCOLARO, B.; THOMAZINI, M.; FERRO-FURTADO, R.; DE CASTRO, I. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Enhancing stability of echium seed oil and beta-sitosterol by their coencapsulation by complex coacervation

using diferente combinations of wall materials and crosslinkers. **Food Chemistry**, v. 252, p. 277-284, 2018.

COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. J. G.; DE MATOS JUNIOR, F. E.; BALIEIRO, J. C. C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52, p. 373–379, 2013.

COMUNIAN, T. A.; ABBASPOURRAD, A.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; WEITZ, D. A. Fabrication of solid lipid microcapsules containing ascorbic acid using a microfluidic technique. **Food Chemistry**, v.152, p. 271–275, 2014a

COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 442-457, 2016.

COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; GAMBAGORTE, V. F.; TRINDADE, M. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Effect of Incorporating Free or Encapsulated Ascorbic Acid in Chicken Frankfurters on Physicochemical and Sensory Stability. **Journal of Food Science and Engineering**, v. 4, p. 167-175, 2014b

COOK, M. T. ; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V.V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162 , p. 56–67, 2012.

DA CRUZ, M. C. R.; ANDREOTTI DAGOSTIN, J. L.; PERUSSELLO, C. A.; MASSON, M. L. Assessment of physicochemical characteristics, thermal stability and release profile of ascorbic acid microcapsules obtained by complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 71-82, 2019.

DA CRUZ, M. C. R.; PERUSSELLO, C. A.; MASSON, M. L. Microencapsulated ascorbic acid: Development, characterization, and release profile in simulated gastrointestinal fluids. **Journal of Food Process Engineering**, v. 41, e12922, 2018. <http://doi.org/10.1111/jfpe.12922>

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 900 p, 2010.

DA SILVA, T. M.; RODRIGUES, L. Z.; NUNES, G. L.; CODEVILLA, C. F.; DA SILVA, C. B.; DE MENEZES, C. R. Encapsulação de compostos bioativos por coacervação complexa. **Ciência e Natura, Santa Maria**, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos. Dez. v.37, p. 56 – 64, 2015

DE SOUZA, C. A. G.; SIQUEIRA, S. M. C.; AMORIM, A. F. V. ; MORAIS, S. M.; GONÇALVES, T.; GOMES, R. N.; CUNHA, A. P.; RICARDO, N. M. P. S. Encapsulação do ácido L-ascórbico no biopolímero natural galactomanana por *spray-drying*: preparação, caracterização e atividade antioxidante. **Química Nova**, v. 38, nº. 7, p. 877-883, 2015.

DE SOUZA, V. B.; THOMAZINI, M.; BARRIENTOS, M. A. E.; NALIN, C. M.; FERRO-FURTADO, R.; GENOVESE, M. I.; FAVARO-TRINDADE, C. M. Functional properties and encapsulation of a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (Cinnamon

zeylanicum) by complex coacervation using gelatina and different polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 297-306, 2018.

DEVI, N.; KAKATI, D. K. Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n° 2, p. 193-204, 2013.

DEVI, N.; SARMAH, M.; KHATUN, B.; MAJI, T. K. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 239, p.136–145, 2017.

DIARRASSOUBA, F.; REMONDETTO, G.; GARRAIT, G.; ALVAREZ, P.; BEYSSAC, E.; SUBIRADE, M. Self-assembly of b-lactoglobulin and egg white lysozyme as a potential carrier for nutraceuticals. **Food Chemistry**, v. 173 , p. 203–209, 2015.

DICKINSON, E. Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 24, n°1, p. 4-12, 2012.

DONHOWE, E. G.; FLORES, F. P.; KERR, W. L.; WICKER, L.;KONG, F. Characterization and in vitro bioavailability of b-carotene: Effects of microencapsulation method and food matrix. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, p. 42-48, 2014.

DOUBLIER, J. L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface** , v. 5, p. 202-214, 2000.

DRUSCH, S.; BERG, S.; SCAMPICCHIO, M.; SERFERT, Y.; SOMOZA, V.; MANNINO, S.; SCHWARZ, K. Role of glycated caseinate in stabilisation of microencapsulated lipophilic functional ingredients. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 942-948, 2009.

EGHBAL, N.; CHOUDHARY, R. Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. **LWT- Food Science and Technology**, v. 90, p. 254-264, 2018.

ERATTE, D.; DOWLING, K.; BARROW, C. J.; ADHIKARI, B. Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic bacteria through complex coacervation: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 121-131, 2018.

ERATTE, D.; MCKNIGHT, S.; GENGENBACH, T. R.; DOWLING, K.; BARROW, C. J.; ADHIKARI, B. P. Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate-gum arabic complex coacervates. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 882–892, 2015.

ESTÉVEZ, M.; GÜELL, C.; DE LAMO-CASTELLVÍ, S.; FERRANDO, M. Encapsulation of grape seed phenolic-rich extract within W/O/W emulsions stabilized with complexed biopolymers: Evaluation of their stability and release. **Food Chemistry**, v. 272, p. 478-487, 2019.

EVANS, M.; RATCIFFE, I.; WILLIAMS, P. A. Emulsion stabilization using polysaccharide-protein complexes. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.18, p. 272-282, 2013.

FAREEZ, I. M.; LIM, S. M.; MISHRA, R. K.; RAMASAMY, K. Chitosan coated alginate-xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1419-1428, 2015.

FARHANG, B.; KAKUDA, Y.; CORREDIG, M. Encapsulation of ascorbic acid in liposomes prepared with milk fat globule membrane-derived phospholipids. **Dairy Science & Technology**, v. 92, p. 353-366, 2012.

FARIAS, M. D. P.; ALBUQUERQUE, P. B. S.; SOARES, P. A.G.; DE SÁ, D. M. A. T.; VICENTE, A. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Xyloglucan from *Hymenaea courbaril* seeds as encapsulating agent of L-ascorbic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, parte B, p. 1559-1566, 2018.

FARIA, S.; PETKOWICZ, C. L. O.; DE MORAIS, S. A. L.; TERRONES, M. G. H.; DE REZENDE, M. M.; DE FRANÇA, F. P.; CARDOSO, V. L. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n° 2, p. 469 - 476, 2011.

FERRÁNDIZ, M.; CAPABLANCA, L.; FRANCO, E.; MIRA, E. Microencapsulation of L-ascorbic acid by spray drying using sodium alginate as wall material. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, v. 6, p.1-8, 2016.

FLANAGAN, S. E.; MALANOWSKI, A. J.; KIZILAY, E.; SEEMAN, D.; DUBIN, P. L.; DONATO-CAPEL, L.; BOVETTO, L.; SCHMITT, C. Complex equilibria, speciation, and heteroprotein coacervation of lactoferrin and β -lactoglobulin. **Langmuir**, v. 31, n° 5, p. 1776-1783, 2015.

FROTA, H. B. M. ; MENEZES, J. E. S. A.; SIQUEIRA, S. M. C. ; RICARDO, N. M. P.; ARAÚJO, T. G. ; SOUZA, C. A. G.; BANDEIRA, P. N.; DOS SANTOS, H. S. Preparação, caracterização físico-química e liberação controlada de micropartículas de galactomanana contendo alantoina. **Química Nova**, v. 41, n° 5, p. 544-549, 2018.

FU, D.; DENG, S.; MCCLEMENTS, D. J.; ZHOU, L.; ZOU, L.; YI, J.; LIU, C.; LIU, W. Encapsulation of β -carotene in wheat gluten nanoparticle-xanthan gum-stabilized Pickering emulsions: Enhancement of carotenoid stability and bioaccessibility. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p.80-89, 2019.

GHAYEMPOUR, S.; MONTAZER, M. Micro/nanoencapsulation of essential oils and fragrances: Focus on perfumed, antimicrobial, mosquito-repellent and medical textiles. **Journal of Microencapsulation**, v. 33, n° 6, p. 497- 510, 2016.

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

GHAYEMPOUR, S.; MONTAZER, M. Micro/nanoencapsulation of essential oils and fragrances: Focus on perfumed, antimicrobial, mosquito-repellent and medical textiles. **Journal of Microencapsulation**, v. 33, n° 6, p. 497- 510, 2016.

GIRARD, M.; TURGEON, S. L.; GAUTHIER, S. F. Thermodynamic parameters of β -lactoglobulin-pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4450 – 4455, 2003

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1813-1827, 2011.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; MARTÍNEZ-SANZ, M.; FABRA, M. J.; LÓPEZ-RUBIO, A. Development of gelatin-coated ι -carrageenan hydrogel capsules by electric field-aided extrusion. Impact of phenolic compounds on their performance. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 523 – 533, 2019.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, S. A.; ARÉVALO-GALLEGOS, S.; RASCÓN-CRUZ, Q. Lactoferrin: structure, function and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.33, n. 4, p. 301.e1–301.e8, 2009.

GOSWAMI, S.; NAIK, S. Natural gums and its pharmaceutical application. **Journal of Scientific and Innovative Research**, v. 3, n° 1, p. 112-121, 2014.

GUILLEN, C.; MCINNES, I. B.; VAUGHAN, D.; SPEEKENBRINK, A. B. J.; BROCK, J. H. The effects of local administration of lactoferrin on inflammation in murine autoimmune and infectious arthritis. **Arthritis & rheumatism**, v. 43, n° 9, p. 2073–2080, 2000.

GULÃO, E. S.; SOUZA, C. J. F.; DA COSTA, A. R.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; GARCIA-ROJAS, E. E. Stability and rheological behavior of coconut oil-in-water emulsions formed by biopolymers. **Polímeros**, v. 28, n° 5, p. 413-421, 2018.

GULÃO, E. D. S.; SOUZA, C. J. F.; DA SILVA, F. A. S.; COIMBRA, J.S. R. , GARCIA-ROJAS, E. E. Complex coacervates obtained from lactoferrin and gum arabic: Formation and characterization. **Food Research International**, v. 65, p 367-374, 2014.

GULÃO, E. D. S.; SOUZA, C. J. F.; ANDRADE, C. T.; GARCIA-ROJAS, E. E. Complex coacervates obtained from peptide leucine and gum arabic: Formation and characterization. **Food Chemistry**, v. 194, p 680-686, 2016.

HASANVAND, E.; RAFE, A. Development of vanillin/ β -cyclodextrin inclusion microcapsules using flax seed gum-rice bran protein complex coacervates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 60-66, 2019.

HATTREM, M. N.; DILLE, M. J.; SETERNES, T.; DRAGET, K. I. Macro- vs. micromolecular stabilisation of W/O/W-emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 77-85, 2014.

HO, L. Y.; LIM, Y. Y.; TAN, C. P.; SIOW, L. F. Comparison of physicochemical properties and aqueous solubility of xanthone prepared via oil-in-water emulsion and complex coacervation techniques. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n° 1, p. 784-798, 2018.

- HOLKEM, A. T.; RADDATZ, G. C.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M.; MULLER, E. I.; CODEVILLA, C. F.; JACOB-LOPES, E.; GROSSO, C. R. F.; DE MENEZES, C. R. Production of microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 by emulsification/internal gelation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 216-222, 2017.
- HOYOS-LEYVA, J. D. ; CHAVEZ-SALAZAR, A.; CASTELLANOS-GALEANO, F.; BELLO-PEREZ, L. A.; ALVAREZ-RAMIREZ, J. Physical and chemical stability of l-ascorbic acid microencapsulated into taro starch spherical aggregates by spray drying. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 143-152, 2018.
- HU, Y.-T.; TING, Y.; HU, J.-Y.; HSIEH, S.-C. Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, p.16-26, 2017.
- IGE, O. O.; UMORU, L. E.; ARIBO, S. Natural Products: A minefield of biomaterials. **International Scholarly Research Network Materials Science**, v. 2012, p.1-20, 2012.
- JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and the food industry. **Lebensmittelwissenschaft und Technologie**, v. 24, p. 289-297, 1991.
- JAIN, A.; THAKUR, D.; GHOSHAL, G.; KATARE, O. P.; SHIVHARE, U. S. 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.
- JAMEKHORSHID, A.; SADRAMELI, S. M.; FARID, M. A review of microencapsulation methods of phase change materials (PCMs) as a thermal energy storage (TES) medium. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.31, p. 531-542, 2014.
- JANNASARI, N.; FATHI, M.; MOSHTAGHIAN, S. J.; ABBASPOURRAD, A. Microencapsulation of vitamin D using gelatin and cress seed mucilage: Production, characterization and in vivo study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 972- 979, 2019.
- JIMÉNEZ-ALVARADO, R.; BERISTAIN, C. I.; MEDINA-TORRES, L.; ROMÁN-GUERRERO, A.; VERNON-CARTER, E. J. Ferrous bisglycinate content and release in W1/O/W2 emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2425-2433, 2009.
- JIMÉNES-COLMENERO, F. Emulsiones multiples; compostos bioactivos y alimentos funcionales. **Nutricion Hospitalaria**, v. 28, n.5, p.1413-1421, 2013.
- JIN, R.; YIN, H.; WANG, H.; ZHANG, D.; CAO, K.; YUAN, C. Preparation and characterization of squalene microcapsules by complex coacervation. **Journal of Food Process Engineering**, v. 41, n°6, e12847, 2018.
- JOYE, I. J.; MCCLEMETS, D. J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 19, n° 5, p. 417- 427, 2014.

- KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KIRIAKIDIS, D. A.; SKARACIS, G. N. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 249 -256, 2003.
- KARIM, A. A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 563-576, 2009.
- KARIM, F. T.; GHAFOR, K.; FERDOSH, S.; AL-JUHAIMI, F.; ALI, E.; YUNUS, K. B.; HAMED, M. H.; ISLAM, A.; ASIF, M.; SARKER, M. Z. I.; Microencapsulation using supercritical antisolvent process. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, p. 654 - 666, 2017.
- KATOZIAN, I.; JAFARI, S. M. Nano-encapsulation as promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 34-48, 2016.
- KHAN, B. A.; AKHTAR, N.; KHAN, H. M. S.; WASEEM, K.; MAHMOOD, T.; IQBAL, M.; KHAN, H. Basics of pharmaceutical emulsions: A review. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n° 25, p. 2715-2725, 2011.
- KOUPANTIS, T.; PAVLIDOU, E.; PARASKEVOPOULOU, A. Glycerol and tannic acid as applied in the preparation of milk proteins – CMC complex coacervates for flavor encapsulation. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 62-71, 2016.
- KUROIWA, T.; · HORIKOSHI, K.; SUZUKI, A.; NEVES, M. A.; KOBAYASHI, I.; UEMURA, K.; NAKAJIMA, M.; KANAZAWA, A.; ICHIKAWA, S. Efficient encapsulation of a water-soluble molecule into lipid vesicles using W/O/W multiple emulsions via solvent evaporation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, p. 421- 430, 2016.
- KIM, Y. D.; MORR, C. V.; SCHENZ, T. V. Microencapsulation properties of gum Arabic and several food proteins: Liquid orange oil emulsion particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1308-1313, 1996.
- KOIDA, Y.; KOBAYASHI, M.; HIRATA, G. Studies on Microcapsules. III. Influence of molecular weight of polyisobutylene in the microencapsulation of ascorbic acid, **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n°12, p. 4971 - 4978, 1984.
- KUMAR, A.; RAO, K. M.; HAN, S. S. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 180, p. 128-144, 2018.
- LAM, P.-L.; KOK, S. H.-L.; BIAN, Z.-X.; LAM, K.-H.; GAMBARI, R.; LEE, K. K.-H.; CHUI, C.-H. Microencapsulaion-protected L-ascorbic acid for the application of human epithelial HaCaT cell proliferation. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, n° 8, p. 754 – 758, 2014.
- LANEUVILLE, S. I.; PAQUIN, P.; TURGEON, S. L.. Effect of preparation conditions on the characteristics of whey protein-xanthan gum complexes. **Food Hydrocolloids**, v.14, p. 305–314, 2000.
- LESMES, U.; SANDRA, S.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Impact of surface deposition of lactoferrin on physical and chemical stability of ω -3 rich lipid droplets stabilised by caseinate. **Food Chemistry**, v. 123, n°1, p. 99-106, 2010.

- LII, C. Y.; LIAW, S. C.; LAI, V. M. F.; TOMASIK, P. Xanthan gum–gelatin complexes. **European Polymer Journal**, v. 38, n7, p. 1377-1381, 2002.
- LIU, W.; WANG, J.; MCCLEMENTS, D. J.; ZOU, L. Encapsulation of β -carotene-loaded oil droplets in caseinate/alginate microparticles: Enhancement of carotenoid stability and bioaccessibility. **Journal of Functional Foods**, v.40, p. 527-535, 2018.
- LIU, F.; ZHANG, S.; LI, J.; MCCLEMENTS, D. J.; LIU, X. Recent development of lactoferrin-based vehicles for the delivery of bioactive compounds: Complexes, emulsions, and nanoparticles. **Trends in Food Science & Technology**, v.79, p. 67–77, 2018.
- LU, W.; KELLY, A. L.; MIAO, S. Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. **Trends in Food Science & Technology**, v.47, p. 1-9, 2016.
- MA, T.; ZHAO, H.; WANG, J.; SUN, B. Effect of processing conditions on the morphology and oxidative stability of lipid microcapsules during complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 637-643, 2019.
- MADHAMUTHANALLI, C. V.; BANGALORE, S. A. Rheological and physico-chemical properties of GE extracted from the skin of a few species of freshwater carp. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, p. 1758 – 1764, 2014.
- MAJI, T. K.; HOUSSAIN, R. Microencapsulation of Zanthoxylum limonella oil (ZLO) in genipin crosslinked chitosan–gelatin complex for mosquito repellent application. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, n° 2, p. 779-785, 2009.
- MANELA-AZULAY, M.; LACERDA, C. A. M.; PEREZ, M. A.; FILGUEIRA, A. L.; CUZZI, T. Vitamin C. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 265-274, maio/jun. 2003.
- MARIOD, A. A.; ADAM, H. F. Review: Gelatin, source, extraction and industrial applications. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 12, n° 2, p. 135 -147, 2013.
- MARTINS, I. M.; RODRIGUES, S. N.; BARREIRO, F.; RODRIGUES, A. E. Microencapsulation of thyme oil by coacervation. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, p. 667 - 675, 2009.
- MARK, J. E. Polymer Data Handbook. **Gelatin**. Oxford University Press, p. 120- 129, 1 Edição, 1999.
- MARSANASCO, M.; MÁRQUEZ, A. L.; WAGNER, J. R.; ALONSO, S. V., CHIARAMONI, N. S. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. **Food Research International**, v. 44, p. 3039–3046, 2011.
- MARSHALL, K. Therapeutic Applications of Whey Protein. **Alternative Medicine Review**, v. 9, n. 2, 2004.
- MATOS-JR, F. E.; COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Effect of feed preparation on the properties and stability of ascorbic acid microparticles produced by spray chilling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 251-260, 2017.

MATOS-JR, F. E.; DI SABATINO, M.; PASSERINI, N., CARMEN SÍLVIA FAVARO-TRINDADE, C. S.; ALBERTINI, B. Development and characterization of solid lipid microparticles loaded with ascorbic acid and produced by spray congealing. **Food Research International**, v.67, p.52–59, 2015.

MASUELLI, M. A. Mark-Houwink parameters for aqueous-soluble polymers and biopolymers at various temperatures. **Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry**, v. 2, n° 2, p. 37- 43, 2014.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science R: Concise Reviews/Hypotheses in Food Science**, v. 72, n° 8, p. 109- 124, 2007.

MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle systems: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 253, p. 1-22, 2018.

MENDANHA, D. V. ; ORTIZ, S. E. M. ; FAVARO-TRINDADE, C. S. ; MAURI, A. ; MONTERREY-QUINTERO, E. S. ; THOMAZINI, M. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. **Food Research International**, v.42, n°8, p.1099-1104, 2009.

MOSCHAKIS, T.; BILIADERIS, C. G. Biopolymer-based coacervates: Structures, functionality and applications in food products. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 28, p. 96-109, 2017.

MUHOZA, B.; XIA, S.; CAI, J.; ZHANG, X.; DUHORANIMANA, E., SU, J. Gelatin and pectin complex coacervates as carriers for cinnamaldehyde: Effect of pectin esterification degree on coacervate formation, and enhanced thermal stability. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 712-722, 2019.

MUN, S.; CHO, Y.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS; D. J. Utilization of polysaccharide coatings to improve freeze-thaw and freeze-dry stability of protein-coated lipid droplets. **Food Engineering**, v. 86, p. 508- 518, 2007.

MUTALIYEVA, B.; GRIGORIEV, D.; MADYBEKOVA, G.; SHARIPOVA, A. AIDAROVA, S.; SAPARBEKOVA, A.; MILLER, R. Microencapsulation of insulin and its release using w/o/w double emulsion method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 521, p. 147-152, 2017.

MUYONGA, J. H.; COLE, C. G. B.; DUODU, K. G. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, v. 85, p. 81–89, 2004.

NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 182–186, 2012.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 469 - 479, 2013.

- NEUMANN, S. M.; VAN DER SCHAAF, U. S.; KARBSTEIN, H. P. Investigations on the relationship between interfacial and single droplet experiments to describe instability mechanisms in double emulsions. **Colloids and Surfaces A**, v. 553, p. 464-471, 2018.
- OUTUKI, P. M.; DE FRANCISCO, L. M. B.; HOSCHEID, J.; BONIFÁCIO, K. L.; BARBOSA, D. S.; CARDOSO, M. L. C. Development of arabic and xanthan gum microparticles loaded with an extract of *Eschweilera nana* Miers leaves with antioxidant capacity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 499, n° 20, p. 103-112, 2016.
- OZKAN, G.; FRANCO, P.; DE MARCO, I.; XIAO, J.; CAPANOGLU, E. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. **Food Chemistry**, v. 272, p. 494 – 506, 2019.
- PALMA-RODRIGUEZ, H. M.; AGAMA-ACEVEDO, E.; GONZALEZ-SOTO, R. A.; VERNON-CARTER, E.J.; ALVAREZ-RAMIREZ, J.; BELLO-PEREZ, L. A. Ascorbic acid microencapsulation by spray-drying in native and acid-modified starches from diferente botanical sources. **Starch/Stärke**, v. 65, p. 584 – 592, 2013.
- PARTHASARATHI, S.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Enhancement of oral bioavailability of vitamin E by spray-freeze drying of whey protein microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, v.100, p. 469–476, 2016.
- PAULO, F.; SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 1327 – 1340, 2017.
- PAWAR, H. A.; KAMAT, S. R.; CHOUDHARY, P. D. An overview of natural polysaccharides as biological macromolecules: Their chemical modifications and pharmaceutical applications. **Biology and Medicine (Aligarh)** 6: 224, v. 7, 2015. doi: 10.4172/0974-8369.1000224
- PEINADO, I.; LESMES, U.; ANDRÉS, A.; MCCLEMENTS, J. D. Fabrication and morphological characterization of biopolymer particles formed by electrostatic complexation of heat treated lactoferrin and anionic polysaccharides. **Langmuir**, v. 26, n. 12, p. 9827-9834, 2010.
- PEREIRA, L. J. B.; GARCIA-ROJAS, E. E. Multiple emulsions: formation and application in microencapsulation of bioactive components. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 45, n.1, p.155-162, 2015.
- PRAMANIK, D.; GANGULY, M. Formulation and evaluation of a pectin based controlled drug delivery system containing metronidazole. **Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 3, n. 4, p 16-25, 2017.
- PUDDU, P.; VALENTI, P.; GESSANI, S. Immunomodulatory effects of lactoferrin on antigen presenting cells. **Biochimie**, v. 91, n° 1, p. 11-18, 2009.
- QIAN, C.; DECKER, E. A.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Comparison of Biopolymer Emulsifier Performance in Formation and Stabilization of Orange Oil-in-Water Emulsions. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 88, p. 47-55, 2011.

- QIU, C.; ZHAO, M.; MCCLEMENTS, D. J. Improving the stability of wheat protein-stabilized emulsions: Effect of pectin and xanthan gum addition. **Food Hydrocolloids** v. 43, p. 377-387, 2015.
- RAEI, M.; SHAHIDI, F.; FARHOODI, M.; JAFARI, S. M.; RAFE, A. Application of whey protein-pectin nano-complex carriers for loading of lactoferrin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 281-291, 2017.
- RAHAYU, P. P.; PURWADI; RADIATI, L. E.; MANAB, A. Physico chemical properties of whey protein and gelatine biopolymer using tea leaf extract as crosslink materials. **Current Research in Nutrition and Food Science**. v.3, n°3, p. 224-236, 2015.
- RAOUFI, N.; KADKHODAEI, R.; PHILLIPS, G. O.; FANG, Y.; NAJAFI, M. N. Characterisation of whey protein isolate–gum tragacanth electrostatic interactions in aqueous solutions. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 1220–1227, 2016.
- RAO, M. G.; BHARATHI, P.; AKILA, R. M. A comprehensive review on biopolymers. **Scientific Reviews & Chemical Communication**. v.4, n.2, p. 61-68, 2014.
- RAWDKUEN, S.; THITIPRAMOTE, N.; BENJAKUL, S. Preparation and functional characterization of fish skin gelatin and comparison with commercial gelatin. **International Journal of Food science and Technology**, v. 48, p. 1093-1102, 2013.
- ROCHA-SELMI, G. A.; BOZZA, F. T., THOMAZINI, M.; BOLINI, H. M. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness. **Food Chemistry**, v. 139, p. 72–78, 2013.
- ROKKA, S.; RANTAMÄKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. **European Food Research and Technology**, v. 231, p. 1–12, 2010.
- RUTZ, J. K.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; CRIZEL-CARDOZO, M. M.; KUCK, L. S.; NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. **Food Chemistry**, v. 220, p. 59-66, 2017.
- SABERIAN, H.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; ABBASI, S. Effect of pasteurization and storage on bioactive components of aloe vera gel. **Nutrition & Food Science**, vol. 43, n° 2, p.175-183, 2013.
- SACHAN, N. K.; SINGH, B.; RAO, K. R. Controlled drug delivery through microencapsulation. **Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n° 1, p. 65 -81, 2006.
- SANTOS, M. G.; BOZZA, F. T. B.; THOMAZINI, M.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 171, p. 32-39, 2015.
- SANTOS, M. G.; CARPINTEIRO, D. A.; THOMAZINI, M.; ROCHA-SELMI, G. A.; DA CRUZ, A. G.; RODRIGUES, C. E. C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Coencapsulation of xylitol and menthol by double emulsion followed by complex

coacervation and microcapsule application in chewing gum. **Food Research International**, v. 66, p. 454-462, 2014.

SANTOS, M. B.; DA COSTA, N. R.; GARCIA-ROJAS, E. E. Interpolymeric complexes formed between whey proteins and biopolymers: Delivery systems of bioactive ingredients. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.17, p. 792-805, 2018a.

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

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

SANTOS, M. B.; SANTOS, C. H. C.; DE CARVALHO, M. G.; DE CARVALHO, C. W. P.; GARCIA-ROJAS, E. E. Physicochemical, thermal and rheological properties of synthesized carboxymethyl tara gum (*Caesalpinia spinosa*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 595-603, 2019.

SARBON, N. M.; BADI, F.; HOWELL, N. K. Preparation and characterization of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 143-151, 2013.

SARTORI, T.; CONSOLI, L.; HUBINGER, M. D.; MENEGALLI, F. C. Ascorbic acid microencapsulation by spray chilling: Production and characterization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 353 – 360, 2015.

SERVAT, L.; SPINDOLA, H. M.; RODRIGUES, R. A. F.; FOGLIO, M. A. Microencapsulation: a Promising Alternative for Preserving, **Natural Products**, v. 5, n.02, Junho, 2010.

SAXENA, A.; SACHIN, K.; BOHIDAR, H. B.; VERMA, A. K. Effect of molecular weight heterogeneity on drug encapsulation efficiency of gelatin nano-particles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, p. 42 – 48, 2005.

SHAO, H.; HAN, G.; LING, P.; ZHU, X.; LIU, F.; JIN, Y.; ZHAO, L.; ZHANG, T. Intra-articular injection of xanthan gum: A potential therapy for osteoarthritis. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 3, p.449-453, 2012.

SHADDEL, R.; HESARI, J.; AZADMARD-DAMIRCHI, S.; HAMISHEHKAR, H.; FATHI-ACHACHLOUEI, B.; HUANG, Q. Double emulsion followed by complex coacervation as a promising method for protection of black raspberry anthocyanins. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 803-816, 2018.

SHISHIR, M. R. I.; XIE, L.; SUN, C.; ZHENG, X.; CHEN, W. 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.

SHIT, S. C.; SHAH, P. M. Edible polymers: Challenges and opportunities. **Journal of Polymers**, v. 2014, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/427259>

SILVA, D. F.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; ROCHA, G. A.; THOMAZINI, M. Microencapsulation of lycopene by gelatina-pectin complex coacervation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, p. 185-190, 2012.

SOBRAL, P. J. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Phase transitions of pigskin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v.15, n° 4–6, p. 377-382, 2001.

SOUZA, C. A. G. ; SIQUEIRA, S. M. C.; AMORIM, A. F. V.; MORAIS, S. M.; GONÇALVES, T.; GOMES, R. N.; CUNHA, A. P.; RICARDO, N. M. P. S. Encapsulação do ácido l-ascórbico no biopolímero natural galactomanana por spray-drying: preparação, caracterização e atividade antioxidante. **Química Nova**, v.38 n°7, p. 877- 883, 2015.

SOUZA, C. J. F.; GARCIA-ROJAS, E. 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.

SOUZA, C. J. F.; SOUZA, C. S. F.; BASTOS, L. P. H.; GARCIA-ROJAS, E. E. Interpolymer complexation of egg white proteins and carrageenan: Phase behavior, thermodynamics and rheological properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 467-475, 2018a.

SOUZA, C. J. F.; GARCIA-ROJAS, E. E.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Lactase (β -galactosidase) immobilization by complex formation: Impact o biopolymers on enzyme activity. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 88-96, 2018b

SOUZA, C. J. F.; COMUNIAN, T. A.; KASEMODEL, M. G. C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. 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.1, p. 1-11, 2018c.

SOUZA, C. J. F.; GARCIA-ROJAS, E. E.; SOUZA, C. S. F.; VRIESMANN, L. C.; VICENTE, J.; DE CARVALHO, M. G.; PETKOWICZ, C. L. O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Immobilization of β -galactosidase by complex coacervation: Effect of interaction on the properties of the enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 594-602, 2019.

STONE, A. K.; NICKERSON, M. T. Formation and functionality of whey protein isolate-(kappa-, iota-, and lambda-type) carrageenan electrostatic complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 271-277, 2012.

TAMNAK, S.; MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P.; AMID, B. T.; KAZEMI, M.; HEDAYATNIA, S. Encapsulation properties, release behavior and physicochemical characteristics of water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion stabilized with pectine -pea protein isolate conjugate and Tween 80. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 599-608, 2016.

TAVARES, G. M.; CROGUENNEC, T.; HAMON, P.; CARVALHO, A. F.; BOUHALLAB, S. Selective coacervation between lactoferrin and the two isoforms of β -lactoglobulin. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 238-247, 2015.

TAVARES, L.; NOREÑA, C. P. Z. Encapsulation of garlic extract using complex coacervation with whey protein isolate and chitosan as wall materials followed by spray drying. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 360-369, 2019.

TIMILSENA, Y. P.; ADHIKARI, R. ; BARROW, C. J.; ADHIKARI, B. 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.

TIMILSENA, Y. P.; AKANBI, T. O.; KHALID, N.; ADHIKARI, B.; BARROW, C. J. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.121, p.1276–1286, 2019.

TIMILSENA, Y. P.; WANG, B.; ADHIKARI, R.; ADHIKARI, B. Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 369-381, 2017.

TOKLE, T.; LESMES, U.; MCCLEMENTS, D. J. Impact of electrostatic deposition of anionic polysaccharides on the stability of oil droplets coated by lactoferrin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n° 17, p. 9825-9832, 2010.

TORRES, M. D.; MOREIRA, R.; CHENLO, F., VÁZQUEZ, M. J. Water adsorption isotherms of carboxymethyl cellulose, guar, locust bean, tragacanth and xanthan gums. **Carbohydrate Polymers**, v.89, n.2, p. 592-598, 2012.

TURGEON, S. L.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, p. 166 – 178, 2007.

TRIFKOVIĆ, K.; TADIĆ, G.; BUGARSKI, B. Short overview of encapsulation technologies for delivery of bioactives to food. **Journal of Engineering & Processing Management**, v. 8, n. 1, p.103 – 111; 2016.

USHIKUBO, F. Y.; CUNHA, R. L. Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p. 145-153, 2014.

VALENTA, T.; LAPČÍKOVÁ, B.; LAPČÍK, L. Determination of kinetic and thermodynamic parameters of food hydrocolloids/water interactions by means of thermal analysis and viscometry. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.555, p. 270-279, 2018.

VICENTE, J.; PEREIRA, L. J. B.; BASTOS, L. P. H.; CARVALHO, M. G.; GARCIA-ROJAS, E. E. Effect of xanthan gum or pectin addition on Sacha Inchi oil-in-water emulsions stabilized by ovoalbumin or tween 80: Droplet size distribution, rheological behavior and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 339-345, 2018.

WANG, B.; ADHIKARI, B.; BARROW, C. J. Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin–sodium hexametaphosphate using complex coacervation. **Food Chemistry**, v.158, p. 358–365, 2014.

WANG, Y., KIMURA, K., DUBIN, P.L. & JAEGER, W. Polyelectrolyte- micelle coacervation: effects of micelle surface charge density, polymer molecular weight: and polymer/surfactant ratio. **Macromolecules**, v. 33, p. 3324–3331, 2000.

WANG, L.; YANG, S.; CAO, J.; ZHAO, S.; WANG, W. Microencapsulation of Ginger Volatile Oil Based on Gelatin/Sodium Alginate Polyelectrolyte Complex. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 64, p. 21–26, 2016.

WANG, C-S.; VIRGILIO, N.; WOOD-ADAMS, P.; HEUZEY, M-C. A mechanism for the synergistic gelation properties of gelatin B and xanthan gum aqueous mixtures. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 484-492, 2017.

WANG, B.; VONGSVIVUT, J.; ADHIKARI, B.; BARROW, C. J. Microencapsulation of tuna oil fortified with the multiple lipophilic ingredients vitamins A, D3, E, K2, curcumin and coenzyme Q10. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 893-901, 2015.

WEINBRECK, F. ; DE VRIES, R. ; SCHROOYEN, P. ; DE KRUIF, C. G. Complex coacervation of whey proteins and gum Arabic. **Biomacromolecules**, v.4, n°2, p.293-303, 2003.

WEINBRECK, F.; MINOR, M.; DE KRUIF, C. G. Microencapsulation of oils using whey protein/gum Arabic coacervates. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n° 6, p. 667-679, 2004.

WEI, Z.; HUANG, Q. Assembly of protein-polysaccharide complexes for delivery of bioactive ingredients: A perspective paper. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2019. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b06063

WILSON, N.; SHAH, N.P. Microencapsulation of Vitamins. **ASEAN Food Journal**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2007.

XIAO, Z.; LIU, W.; ZHU, G.; ZHOU, R.; NIU, Y. A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 1482-1494, 2014.

XING, F.; CHENG, G.; YANG, B.; MA, L. Microencapsulation of capsaicin by complex coacervation of gelatin, acacia and tannins. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 91, n° 4, p. 2669-2675, 2004.

XU, X.; LUO, L.; LIU, C.; MCCLEMENTS, D. J. Utilization of anionic polysaccharides to improve the stability of rice glutelin emulsions: Impact of polysaccharide type, pH, salt and temperature. **Food Hydrocolloids**, v.64, p. 112-122, 2017.

YAN, Y.; KIZILAY, E.; SEEMAN, D.; FLANAGAN, S.; DUBIN, P. L.; BOVETTO, L.; DONATO, L.; SCHMITT, C. Heteroprotein complex coacervation: Bovine β -lactoglobulin and lactoferrin. **Langmuir**, 2013, v. 29, n° 50, p. 15614–15623, 2013.

YE, Q.; GEORGES, N.; SELOMULYA, C. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 167–179, 2018.

YE, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications—a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n° 3, p. 406 – 415, 2008.

YOUNG, S. L.; SARDA, X.; ROSEMBERG, M. Microencapsulating properties of whey proteins. 2. Combination of whey proteins with carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n° 10, p. 2878-2885, 1993.

YUAN, Y.; KONG, Z-Y.; SUN, Y-E.; ZENG, Q-Z.; YANG, X-Q. Complex coacervation of soy protein with chitosan: Constructing antioxidant microcapsule for algal oil delivery. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 171-179, 2017.

ZHANG, Y.; LIMA, C. F.; RODRIGUES, L. R. Anticancer effects of lactoferrin: underlying mechanisms and future trends in cancer therapy. **Nutrition Reviews**, v.72, n°12, p. 763–773, 2014.

ZHAO, M.; WANG, Y.; HUANG, X.; GAENZLE, M.; WU, Z.; NISHINARI, K.; YANG, N.; FANG, Y. Ambient storage of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* ST-III by complex coacervation of type-A gelatin and gum Arabic. **Food & Function**, v. 9, p. 1000-1008, 2018.