UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

VOLNEI BRITO DE SOUZA

**Extração e encapsulação por coacervação complexa das proantocianidinas
da canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume)**

Pirassununga

2016

VOLNEI BRITO DE SOUZA

**Extração e encapsulação por coacervação complexa das proantocianidinas
da canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume)**

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade

Pirassununga

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo autor

B729e Brito de Souza, Volnei
Extração e encapsulação por coacervação complexa das proantocianidinas da canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) / Volnei Brito de Souza ; orientadora Carmen Sílvia Fávares Trindade. -- Pirassununga, 2016.
184 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. canela do Ceilão. 2. extrato. 3. fenólicos. 4. microencapsulação. 5. produto funcional. I. Fávares Trindade, Carmen Sílvia, orient. II. Título.

VOLNEI BRITO DE SOUZA

**Extração e encapsulação por coacervação complexa das proantocianidinas
da canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume)**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Data de aprovação: 19/08/2016

Banca Examinadora:

Carmen Sílvia Fávaro Trindade – Presidente da Banca Examinadora
Prof^a Dr^a da FZEA/USP – Orientadora

Maria Inés Genovese Rodriguez – Membro
Prof^a Dr^a da FCF/USP

Ana Sílvia Prata Soares – Membro
Prof^a Dr^a da FEA/Unicamp

Samantha Cristina de Pinho – Membro
Prof^a Dr^a da FZEA/USP

Christianne Elisabete da Costa Rodrigues – Membro
Prof^a Dr^a da FZEA/USP

Dedico esse trabalho aos meus pais, minhas irmãs, meus sobrinhos e minha orientadora. Sem eles, nada disso seria possível.

Biografia

Volnei Brito de Souza, filho de José Vilas Boas de Souza e Zorildes Brito de Souza, nasceu na cidade de Mutuípe, Bahia, em 15 de março de 1985, mas cresceu no município de Ubaíra, também no Estado da Bahia.

Começou a frequentar a escola no ano de 1989 aos 4 anos de idade.

Graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Feira de Santana no ano de 2010. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica por dois anos, adquirindo experiência na área de microbiologia, enzimologia e cinética enzimática.

Obteve o título de Mestre em Ciências, no Programa de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP). Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e adquiriu experiência na área de microencapsulação, secagem por *spray drying*, antocianinas, atividade antioxidante e antimicrobiana.

No doutorado, também realizado na FZEA/USP, adquiriu experiência com extração sólido-líquido, análises por cromatografia líquida (CLAE), espectrometria de massas, microencapsulação por coacervação complexa, proantocianidinas e atividade antidiabetes.

Recentemente foi aprovado em primeiro lugar no concurso para docente do magistério superior, classe Adjunto A, regime de dedicação exclusiva na Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), onde começará a atuar em breve na área de Nutrição/Tecnologia de Alimentos.

AGRADECIMENTOS

É com grande alegria que chego ao final dessa etapa com a sensação de dever cumprido. Olho para trás e vejo que tudo valeu a pena. Esse, porém, não é nem de longe um trabalho a duas mãos. São muitas mãos, cabeças e corações envolvidos aqui. Por isso gostaria de agradecer imensamente a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, espero ser justo e lembrar de todos.

Agradeço a Deus por sempre escutar as minhas preces e pela oportunidade que tem me dado de aprender e evoluir um pouco a cada dia.

À minha família querida, meus pais, minhas irmãs e meus sobrinhos por sempre serem o motivo que me move a continuar lutando e crescendo. Obrigado por todo apoio e carinho.

À Professora Carmen, minha orientadora, por ser exemplo de profissional e ser humano. Obrigado pela confiança, pelos ensinamentos e por toda a ajuda sempre.

Às Professoras Christianne e Maria Inés pela co-orientação nas etapas de extração e e atividades do extrato da canela.

Ao meu cunhado Guilherme e sua família por sempre me apoiarem e torcerem tanto por mim.

Aos meus irmãos de Pirassununga, aqueles que escolhi e me escolheram e seguimos nessa caminhada desde o início. Adja, Thaysa, Hugo e Keila. Obrigado pelo apoio e carinho e saibam que sempre torço por vocês e estou aqui para o que precisarem, mesmo que estiver longe.

Aos queridos amigos do Laprof. Aos de agora e aos que já passaram: Talitinha, Paulinha, Fernando, as Marianas (todas as 1000 que já passaram por lá rsrs), em especial à Mariana Echalar pela execução dos testes de atividade antimicrobiana, Milla, Andressa, Riana, Lívia, Fernanda, Marcela, Ana Julia Marluci, Julia, Fabricio, Augusto, Junior, Orfa, Julio. Desejo muito sucesso sempre para vocês.

Ao Marcelo, especialista de laboratório, amigo e salvador de todas as horas e análises. Obrigado por dividir um pouco dos seus conhecimentos com a gente todos os dias.

As estagiárias Camila e Isabela, obrigado por toda a ajuda mesmo que por pouco tempo.

Aos amigos e colegas que fiz nesses anos aqui em Pirassununga. Obrigado pelas horas de descontração, diversão, oração e conversas. Torço sempre pelo sucesso de todos. Tiara, Lucas, Débora, Luciana, Taíse, Vitor, Mayra, Camila, Gisele, Josi, Naty, Daniel, Carol, Diane, Grazi, Mirelle, Paola.

Ao pessoal da limpeza do ZEA, sempre com aquele “bom dia” animador todas as manhãs.

À D. Sônia e o café sagrado de todos os dias.

Aos professores da FZEA com quem tive a sorte de conviver e aprender, principalmente nas disciplinas da pós-graduação e nos estágios de docência. Chris, Tonhão, Samantha, Rose, Judite, Julio, Cíntia Bernardo, Petrus, Giovanna, Eliana, Sobral, Tereza, Alessandra e todos os outros que tive o prazer de conhecer.

À Professora Maria Inés Genovese da FCF/USP por ter gentilmente aberto o espaço em seu laboratório para a realização das análises do potencial bioativo dos extratos. E à Rosa e ao pessoal do laboratório pelo suporte nessas análises.

Aos técnicos, auxiliares e especialistas de laboratório pela disponibilidade e ajuda: Nilson, Guilherme, Keila, Carla, Rodrigo, Camilla, Fabinho, Tatiana.

Ao pessoal da Seção de Pós-Graduação.

À Fundação André Tosello por ter gentilmente doado os micro-organismos usados na atividade antimicrobiana.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP) por toda a estrutura para o desenvolvimento do trabalho.

À Capes pelos primeiros meses de bolsa (cota - demanda social).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Doutorado (Processo: 2013/09090-2).

Muito obrigado a todos!! 😊

“Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais

Hoje me sinto mais forte
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei
Ou nada sei...”

(Tocando em Frente – Almir Sater e Renato Teixeira)

RESUMO

SOUZA, V. B. **Extração e encapsulação por coacervação complexa das proantocianidinas da canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume).** 2016. 184 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

As proantocianidinas da canela são compostos fenólicos responsáveis por diversos efeitos benéficos à saúde atribuídos a essa planta. No entanto, para usufruir desses efeitos, seria necessário consumir grande quantidade da especiaria, que apresenta algumas características sensoriais indesejáveis, como sabor forte e também causam sensação de adstringência. Pensando em resolver esses problemas, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção do extrato de canela rico em proantocianidinas, sua encapsulação pela técnica de coacervação complexa e aplicação em sorvete. Inicialmente foram otimizadas as condições de processo para a obtenção do extrato com o maior teor de proantocianidinas. Utilizando-se canela em casca triturada, etanol 50% e variando-se condições de temperatura, razão sólido:solvente e tempo, as condições foram otimizadas em: temperatura (60 °C), razão sólido:solvente (1:7,5) e tempo de extração (30 min). Os principais compostos presentes nesse extrato foram isolados em sistema de CLAE e identificados como sendo uma mistura de proantocianidinas com graus de polimerização de 2-4, ácido cinâmico e cinamaldeído. A capacidade antioxidante dessas frações também foi determinada mostrando que as proantocianidinas são as que mais contribuem para esse potencial. O extrato foi seco por atomização e liofilização sendo avaliadas as seguintes propriedades: capacidade antioxidante, atividade inibidora da α -amilase e α -glicosidase e atividade antimicrobiana. Os extratos secos, principalmente o atomizado, apresentaram alta capacidade antioxidante e alto potencial de inibir as enzimas digestivas, porém perderam a capacidade antimicrobiana em relação ao extrato líquido. O extrato atomizado foi encapsulado pela técnica de coacervação complexa utilizando gelatina como polímero anfótero e diferentes polissacarídeos (goma arábica, pectina, goma de cajueiro, carboximetilcelulose e κ -carragena) como polímeros aniônicos. As micropartículas foram caracterizadas em relação a: teor de umidade, atividade de água, higroscopicidade, solubilidade, morfologia, tamanho e distribuição. Houve diferença entre as amostras em todos esses parâmetros avaliados. Foram estudados os espectros de infravermelho dos ingredientes e das partículas obtidas por coacervação, onde foi observada claramente a interação entre a

proteína e o polissacarídeo na formação das partículas. As micropartículas foram submetidas a condições de stress em meios aquosos e se mostraram resistentes em diversos valores de pH, temperatura, concentração de sal e sacarose. Durante a estocagem as partículas perderam parte dos fenólicos e proantocianidinas totais e a amostra produzida com gelatina/κ-carragena, foi a que mais preservou esses compostos. Essa amostra também mostrou potencial para ser utilizada como sistema para liberação controlada de compostos fenólicos no intestino. A análise sensorial das amostras de extrato livre e encapsulado comprovou que o processo de encapsulação foi eficiente em mascarar o sabor forte e a sensação de adstringência do extrato de canela. As amostras do extrato de canela encapsulado, aplicadas em sorvete, obtiveram maior aceitação global, foram melhor avaliadas quanto ao sabor e também apresentaram maior intenção de compra pelos provadores em comparação à amostra de sorvete contendo o extrato livre.

Palavras-chave: canela do Ceilão, extrato, fenólicos, microencapsulação, produto funcional.

ABSTRACT

SOUZA, V. B. **Extraction and encapsulation by complex coacervation of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) proanthocyanidins.** 2016. 184 f. PhD. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Proanthocyanidins from cinnamon are phenolic compounds responsible for many beneficial health effects attributed to this plant. However, to take advantage of these effects, it would be necessary to consume large amount of the spice, which presents some undesirable sensory characteristics such as strong flavor and also cause sensation of astringency. Thinking of solving these problems, this study aimed to obtain a cinnamon extract rich in proanthocyanidins, its encapsulation by complex coacervation technique and application in ice cream. Initially, the conditions were optimized to obtain the extract with higher proanthocyanidins content. Using crushed cinnamon bark, 50% ethanol and varying temperature, solid to solvent ratio and time, the conditions were optimized in: temperature (60 °C) solid:solvent ratio (1:7.5), and time extraction (30 min). The main compound present in this extract were isolated on an HPLC system and identified as a mixture of proanthocyanidins with degrees of polymerisation of 2-4, cinnamaldehyde and cinnamic acid. The antioxidant capacity of these fractions was also determined showing that the proanthocyanidins are the main responsible for this potential. The extract was spray-dried and freeze-dried being evaluated the following properties: antioxidant capacity, inhibition of α -amylase and α -glucosidase and antimicrobial activity. Dried extracts, particularly the atomized one, showed high antioxidant capacity and high potential to inhibit digestive enzymes, but lost antimicrobial capacity in relation to the liquid extract. The atomized extract was encapsulated by the complex coacervation technique using gelatin as a amphoteric polymer and different polysaccharides (gum arabic, pectin, cashew gum, carboxymethylcellulose and κ -carrageenan) as the anionic polymers. The microparticles were characterized in relation to: moisture content, water activity, hygroscopicity, solubility, morphology, size and distribution. There were differences between the samples in all of these parameters evaluated. Were studied the infrared spectra of ingredients and particles obtained by coacervation, where it was clearly observed interaction between the protein and the polysaccharide in particle formation. The microparticles were submitted to stress conditions

in aqueous media and were resistant to various pH values, temperature, salt concentration and sucrose. During storage, the particles have lost part of phenolics and total proanthocyanidins, and in the sample produced with gelatin/ κ -carrageenan, these compounds were more preserved. This sample also showed potential to be used as a system for controlled release of phenolic compounds in the intestine. Sensory analysis of free and encapsulated extract samples proved that the encapsulation process was effective at masking the strong taste and the sensation of astringency of the cinnamon extract. Samples of the encapsulated cinnamon extract, added in ice cream, obtained a greater global acceptance, were further evaluated for flavor and also had a higher purchase intent by the consumers compared to the ice cream containing free extract.

Keywords: Ceylon cinnamon, extract, phenolics, microencapsulation, functional product.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto visual da canela em casca..	27
Figura 2 – Estruturas mais importantes de unidades de flavan-3-ols encontradas em proantocianidinas.....	29
Figura 3 - Exemplos de estruturas das proantocianidinas.	31
Figura 4 - Esquema das estruturas de micropartículas produzidas por encapsulação.	41
Figura 5 - Esquema simplificado da produção de microcápsulas por coacervação complexa..	42
Figura 6 – Canela do Ceilão (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>) em casca.....	52
Figura 7 – Canela do Ceilão em casca após trituração.	53
Figura 8 - Esquema do aparato utilizado na realização dos experimentos de extração das proantocianidinas da canela, em batelada.....	55
Figura 9 – Fluxograma para a produção do sorvete de creme contendo extrato de canela livre e encapsulado.....	75
Figura 10 – Dados experimentais para a concentração de proantocianidinas totais nos extratos da canela, obtidos com etanol 50% em diferentes condições de temperatura e razão sólido:solvente.....	81
Figura 11 – Cinética de extração das proantocianidinas.	83
Figura 12 – Cromatograma do extrato etanólico de canela do Ceilão obtido por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD) em 280 nm.....	86
Figura 13 – Capacidade antioxidante dos principais compostos presentes no extrato de canela do Ceilão (<i>C. zeylanicum</i>).	92
Figura 14 – Extratos de canela do Ceilão desidratados.	94
Figura 15 - Morfologia das partículas e separação de fases nos sistemas para a encapsulação do extrato de canela por coacervação complexa nos pH selecionados.....	101
Figura 16 – Extrato de canela do Ceilão livre e micropartículas do extrato encapsulado.....	111
Figura 17 – Microscopias óptica e eletrônica de varredura (MEV) do extrato atomizado e das micropartículas contendo extrato de canela encapsulado por coacervação complexa.	117
Figura 18 – Distribuição do tamanho de partículas para os extratos de canela livre e encapsulados por coacervação complexa com diferentes encapsulantes.	121
Figura 19 – Espectros de infravermelho do extrato de canela do Ceilão atomizado e dos materiais encapsulantes..	125

Figura 20 – Espectros de infravermelho para as amostras das partículas de extrato de canela encapsulado por coacervação complexa, utilizando diferentes pares poliméricos.....	126
Figura 21 – Morfologia das partículas antes e após 5 minutos de contato com soluções em pH 1, 6 e 8..	129
Figura 22 – Morfologia das partículas após congelamento/descongelamento em meio aquoso, e após contato com meios aquosos nas temperaturas de 25, 50 e 80 °C..	132
Figura 23 – Morfologia das partículas após contato com meios aquosos contendo 0, 1, 3 e 5% de cloreto de sódio (NaCl).....	134
Figura 24 – Concentração total de proantocianidinas e fenólicos durante estocagem das partículas contendo extrato de canela encapsulado.	137
Figura 25 – Porcentagem remanescente de proantocianidinas e fenólicos totais após 120 dias de estocagem.....	138
Figura 26 – Porcentagem liberada de proantocianidinas das partículas de extrato de canela encapsulado, em fluidos gástrico e intestinal simulados..	139
Figura 27 - Porcentagem liberada de fenólicos das partículas de extrato de canela encapsulado, em fluidos gástrico e intestinal simulados.	141
Figura 28 – Amostras de sorvete de creme contendo extrato de canela livre e encapsulado e microscopias ópticas das amostras correspondentes..	144
Figura 29 – Intenção de compra dos provadores em relação as amostras de sorvete contendo extrato de canela livre e encapsulado.	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção mundial de canela no ano de 2013.....	26
Tabela 2 – Trabalhos recentes sobre microencapsulação por coacervação complexa.	44
Tabela 3 - Parâmetros cinéticos calculados pelo modelo de Perez et al. (2011) e coeficientes de difusividade, para a extração de proantocianidinas da canela utilizando etanol e diferentes condições de temperatura e razão sólido: solvente.....	85
Tabela 4 - Identificação dos principais compostos presentes no extrato de canela do Ceilão (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>).....	89
Tabela 5 – Teor total de proantocianidinas e capacidade antioxidante dos extratos de canela do Ceilão líquidos e secos.	96
Tabela 6 – Atividade inibitória das enzimas α -amilase e α -glicosidase pelos extratos de canela do Ceilão líquidos e secos.	97
Tabela 7 – Porcentagem de contribuição das principais frações do extrato de canela em relação ao total de picos (CLAE) nas amostras dos extratos líquidos (etanólico e concentrado) e secos (atomizado e liofilizado).	98
Tabela 8 – Atividade antimicrobiana medida pela zona de inibição (ZI), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), para os extratos de canela do Ceilão líquidos e secos.	99
Tabela 9 - Morfologia, separação de fases e concentração de proantocianidinas totais na água de coacervação das cápsulas contendo extrato de canela em diferentes concentrações, produzidas com GELATINA E GOMA ARÁBICA.	105
Tabela 10 - Morfologia, separação de fases e concentração de proantocianidinas totais na água de coacervação das cápsulas contendo extrato de canela em diferentes concentrações, produzidas com GELATINA E PECTINA.	106
Tabela 11 - Morfologia, separação de fases e concentração de proantocianidinas totais na água de coacervação das cápsulas contendo extrato de canela em diferentes concentrações, produzidas com GELATINA E GOMA DE CAJUEIRO.	107
Tabela 12 - Morfologia, separação de fases e concentração de proantocianidinas totais na água de coacervação das cápsulas contendo extrato de canela em diferentes concentrações, produzidas com GELATINA E CMC.	108

Tabela 13 - Morfologia, separação de fases e concentração de proantocianidinas totais na água de coacervação das cápsulas contendo extrato de canela em diferentes concentrações, produzidas com GELATINA E CARRAGENA.	109
Tabela 14 – Parâmetros determinados para a produção das micropartículas contendo extrato de canela do Ceilão, por coacervação complexa utilizando diferentes materiais encapsulantes.	110
Tabela 15 – Teores de fenólicos e proantocianidinas totais, eficiência e rendimento de encapsulação para cada amostra de micropartículas do extrato de canela do Ceilão encapsulado por coacervação complexa utilizando diferentes materiais encapsulantes.	112
Tabela 16 – Atividade de água, teor de umidade, higroscopicidade e solubilidade do extrato de canela atomizado (extrato livre) e das partículas contendo extrato de canela encapsulado por coacervação complexa utilizando diferentes materiais encapsulantes.	114
Tabela 17 – Higroscopicidade dos materiais de parede utilizados para a encapsulação do extrato de canela por coacervação complexa.	115
Tabela 18 – Tamanho médio das partículas do extrato de canela atomizado e do extrato encapsulado por coacervação complexa com diferentes encapsulantes.	119
Tabela 19 – Avaliação sensorial das amostras de sorvete contendo extrato de canela livre e encapsulado por coacervação complexa utilizando gelatina/goma arábica (GEL/GA) e gelatina κ-carragena (GEL/CARR).	146
Tabela 20 – Aceitação sensorial do sorvete contendo extrato de canela livre e as partículas do extrato encapsulado por coacervação complexa utilizando os pares gelatina/goma arábica e gelatina/κ-carragena.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SÍMBOLOS

ác	Ácido	v/v	Proporção volume/volume
b.s.	Base seca	ZI	Zona de inibição
C.	Cinnamomum	°C	Graus Celsius
CARR	κ-carragena	%	Porcentagem, gramas/100 gramas ou gramas/100mL
CBM	Concentração bactericida mínima	µm	Micrômetros
CIM	Concentração inibitória mínima	ZI	Zona de inibição
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	°C	Graus Celsius
cm	Centímetros	ZI	Zona de inibição
CMC	Carboximetilcelulose	°C	Graus Celsius
DAD	Diode Array Detector	%	Porcentagem, gramas/100 gramas ou gramas/100mL
DMAC	4-Dimetilaminocinamaldeído		
DPPH	Radical (1,1-difenil-2-picril-hidrazila)		
eq	Equivalente		
ESI	Electrospray Ionization		
FRAP	Ferric reducing antioxidant power		
FTIR	Fourier Transform Infrared		
g	Gramas		
g	Gravidade		
GA	Goma arábica		
GC	Goma de cajueiro		
GEL	Gelatina		
h	Horas		
HPLC	High Performance Liquid Chromatography		
kg	Quilogramas		
L	Litros		
Ltda	Limitada		
mAU	Milliabsorbance units		
MEV	Microscopia eletrônica de varredura		
mg	Miligramas		
min	Minutos		
mL	Mililitros		
MS	Mass Spectrometry		
NaCl	Cloreto de Sódio		
nm	Nanômetros		
PEC	Pectina		
pH	Potencial hidrogeniônico		
rpm	Rotações por minuto		
T	Temperatura		
TE	Trolox equivalente		
U	Unidade de atividade enzimática		

SUMÁRIO

1	Introdução.....	22
2	Revisão bibliográfica.....	25
2.1	Canela	25
2.2	Proantocianidinas.....	28
2.2.1	<i>Aspectos gerais</i>	28
2.2.2	<i>Extração</i>	31
2.2.3	<i>Métodos de detecção</i>	33
2.2.4	<i>Efeitos benéficos</i>	36
2.3	Microencapsulação	38
2.3.1	<i>Aspectos gerais</i>	38
2.3.2	<i>Encapsulação por coacervação complexa</i>	41
2.3.3	<i>Materiais encapsulantes</i>	44
2.3.3.1	Gelatina.....	44
2.3.3.2	Goma arábica	46
2.3.3.3	Pectina.....	47
2.3.3.4	Carboximetilcelulose (CMC).....	48
2.3.3.5	K-Carragena.....	48
2.3.3.6	Goma do cajueiro.....	49
2.3.4	<i>Microencapsulação de compostos fenólicos</i>	51
3	Material e métodos.....	52
3.1	Materiais	52
3.1.1	<i>Matéria-Prima</i>	52
3.1.2	<i>Materiais encapsulantes</i>	52
3.2	Extração das proantocianidinas.....	53
3.2.1	<i>Preparo da matéria-prima</i>	53
3.2.2	<i>Preparo do solvente</i>	54
3.2.3	<i>Experimentos de extração</i>	54
3.3	Quantificação das proantocianidinas	55
3.4	Cinética de extração.....	56
3.4.1	<i>Modelo cinético</i>	56

3.5	Análise do extrato bruto por CLAE-DAD	57
3.6	Análise das frações por espectrometria de massas ESI-MS/MS	58
3.7	Capacidade antioxidante das frações obtidas do extrato de canela.....	59
3.7.1	Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (<i>Fenólicos totais</i>)	59
3.7.2	Capacidade de sequestro dos radicais DPPH	59
3.7.3	Capacidade redutora do ferro (FRAP)	60
3.8	Obtenção do extrato seco de canela	60
3.8.1	Secagem do extrato por spray drying	60
3.8.2	Secagem do extrato por liofilização	61
3.9	Propriedades funcionais dos extratos líquidos e secos	61
3.9.1	Capacidade antioxidante	61
3.9.2	Atividade inibidora da α -amilase	62
3.9.3	Atividade inibidora da α -glicosidase.....	63
3.9.4	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	64
3.9.4.1	Micro-organismos testados	64
3.9.4.2	Determinação da atividade antimicrobiana.....	64
3.9.4.3	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)	65
3.10	Encapsulação do extrato seco por coacervação complexa.....	65
3.10.1	Determinação do pH de coacervação	67
3.10.2	Determinação da concentração de núcleo	67
3.10.3	Secagem das micropartículas	67
3.11	Caracterização das partículas	68
3.11.1	Eficiência e rendimento de encapsulação	68
3.11.2	Teor de umidade	69
3.11.3	Atividade de água	69
3.11.4	Higroscopicidade.....	69
3.11.5	Solubilidade	70
3.11.6	Morfologia	70
3.11.7	Tamanho médio e distribuição do tamanho de partículas	71
3.12	Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	71
3.13	Estabilidade das cápsulas sob condições de stress.....	72
3.14	Estabilidade das micropartículas durante a estocagem	72

3.14.1	<i>Extração dos compostos</i>	72
3.14.2	<i>Estabilidade das proantocianidinas e compostos fenólicos</i>	73
3.15	Liberação dos compostos encapsulados	73
3.16	Aplicação das partículas em sorvete	74
3.17	Avaliação sensorial	76
3.17.1	<i>Recrutamento e seleção dos provadores</i>	77
3.17.2	<i>Teste de comparação pareada (provadores selecionados)</i>	77
3.17.3	<i>Teste de aceitação do sorvete</i>	78
3.18	Análise estatística	79
4	Resultados e discussão	80
4.1	Cinética de extração	80
4.2	Efeito da temperatura e da razão sólido:solvente	81
4.3	Análise por CLAE do extrato de canela obtido através das condições otimizadas	86
4.4	Capacidade antioxidante das frações do extrato de canela do Ceilão	91
4.5	Obtenção dos extratos secos	93
4.6	Potencial bioativo dos extratos líquidos e secos	94
4.6.1	<i>Proantocianidinas totais e capacidade antioxidante</i>	95
4.6.2	<i>Atividades inibitórias da α-amilase e α-glicosidase</i>	96
4.6.3	<i>Atividade antimicrobiana</i>	99
4.7	Obtenção das micropartículas por coacervação complexa	100
4.7.1	<i>Determinação do pH de coacervação</i>	100
4.7.2	<i>Determinação da concentração de núcleo</i>	102
4.8	Secagem das partículas por liofilização	110
4.9	Caracterização das micropartículas contendo extrato de canela	111
4.9.1	<i>Eficiência e rendimento de encapsulação</i>	111
4.9.2	<i>Teor de umidade, atividade de água, higroscopicidade e solubilidade</i>	113
4.9.3	<i>Morfologia das partículas</i>	116
4.9.4	<i>Tamanho e distribuição do tamanho das partículas</i>	119
4.10	Análise por espectroscopia de infravermelho	122
4.11	Estabilidade das cápsulas sob condições de stress	127
4.11.1	<i>Variação de pH</i>	127
4.11.2	<i>Variação de temperatura</i>	130
4.11.3	<i>Concentração de sal</i>	133

4.11.4	<i>Concentração de açúcar.....</i>	135
4.12	Estabilidade das proantocianidinas e fenólicos durante a estocagem	136
4.13	Liberação dos compostos encapsulados.....	138
4.14	Aplicação das partículas em sorvete	143
4.15	Avaliação sensorial	145
5	Conclusões	150
	Sugestões para trabalhos futuros	151
	Referências	152
	APÊNDICES	166
	ANEXO	183

1 Introdução

A canela, planta do gênero *Cinnamomum*, é utilizada no mundo desde a antiguidade seja como especiaria ou na medicina popular (DAO, 2004; RAVINDRAN; BABU, 2004). O gênero compreende número grande de espécies, das quais a canela do Ceilão (*Cinnamomum zeylanicum*) e a canela da China (*Cinnamomum cassia*) são as mais conhecidas e comercializadas, principalmente em forma de casca, em pó, óleo essencial das cascas ou folhas etc (DAYANANDA; SENANAYAKE; WIJESEKERA, 2004; RAVINDRAN; BABU, 2004). O uso da canela na medicina tradicional se deve principalmente a alguns efeitos terapêuticos, tais como: efeito estimulante, anti-espasmódico, anti-diabetes entre outros (KHAN et al. 2003; KRISHNAMOORTHY; REMA, 2004). E muitas das propriedades benéficas da canela têm sido atribuídas à classe de compostos fenólicos chamados de proantocianidinas (ANDERSON et al. 2004; JIAO et al. 2013).

As proantocianidinas são oligômeros e polímeros de flavan-3-ols, uma classe de flavonóides, sendo formadas principalmente pelas subunidades de (+)-catequina e seu isômero (-)-epicatequina (HO; RAFI; GHAI, 2010). Quando essas subunidades estão envolvidas, as moléculas são conhecidas como procianidinas, sendo as mais comuns. No entanto, outras subunidades são possíveis, dando origem a moléculas diferentes. Podem apresentar diferença no grau de polimerização, indo de dímero, trímero e assim por diante até proantocianidinas altamente polimerizadas. Havendo ainda diferença nos tipos de ligações entre as subunidades de flavan-3-ols, podendo ser ligação simples tipo-B ou ligação dupla tipo-A, essa última menos comum (GU et al. 2004; KHANAL; HOWARD; PRIOR, 2009). As proantocianidinas da canela são conhecidas por apresentarem maior número de ligações do tipo A do que outras fontes. E essas moléculas tem se mostrado potentes agentes terapêuticos (ANDERSON et al. 2004).

A esses compostos, têm sido atribuídas diversas capacidades, tais como: anti-diabetes tipo-2, anti-obesidade, antioxidante, antimicrobiana entre outras (ANDERSON et al. 2004; BEECHER, 2004; SHAN et al. 2007; KIMURA et al. 2011). Tais propriedades estão ligadas especialmente às estruturas das proantocianidinas que possuem facilidade de doar prótons e quelar metais, o que implica em alta capacidade antioxidante e também possuem a propriedade de se ligar a proteínas o que permite a modulação da atividade de diversas enzimas, sejam digestivas, ou do metabolismo microbiano (BEECHER, 2004; GRUENWALD; FREDER; ARMBRUESTER, 2010). No entanto essas moléculas apresentam alguns inconvenientes, como alta suscetibilidade à oxidação, sendo também sensíveis às altas temperaturas e variações de pH (ROHR; MEIER; STICHER, 2000; MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011). Além disso, a propriedade de se ligar com proteínas salivares, precipitando-as, faz com que essas moléculas sejam as responsáveis pela sensação de adstringência que é sentida quando se ingere produtos nos quais estejam presentes (BENNICK, 2002; HOFMANN et al. 2006).

A tecnologia de microencapsulação tem sido utilizada durante anos a fim de proteger compostos sensíveis contra as condições adversas do meio. Além disso, a encapsulação pode promover a liberação controlada e mascarar aspectos sensoriais indesejados que alguns compostos apresentam. Diversas técnicas de encapsulação são utilizadas para diferentes compostos, entre elas, o *spray drying*, *spray chilling*, a gelificação inônica e a coacervação complexa são alguns exemplos. E a depender da técnica, diferentes tipos de partículas podem ser obtidos (ARSHADY, 1993; FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2007; AUGUSTIN; HEMAR, 2008).

A coacervação complexa é uma técnica de encapsulação baseada na interação, em meio aquoso, entre dois polieletrólitos com cargas opostas, onde o complexo entre esses materiais (normalmente proteínas e polisacarídeos) é formado ao redor de gotículas ou

partículas do material ativo que se deseja encapsular (BURGESS, 1989; DE KRUIF; WEINBRECK; DE VRIES, 2004; WEINBRECK; MINOR; DE KRUIF, 2004). Essa técnica permite a obtenção de partículas do tipo reservatório, onde o núcleo é envolto por uma camada dos materiais encapsulantes (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2007). É bastante utilizada para encapsulação de aromas e compostos hidrofóbicos, no entanto apresenta potencial para encapsular outros tipos de compostos, como por exemplo, vitaminas hidrossolúveis, edulcorantes e compostos fenólicos (ALVIM; GROSSO, 2010; NORI et al. 2011; COMUNIAN et al. 2013; ROCHA-SELMÍ et al. 2013). A encapsulação de compostos fenólicos por coacervação complexa é muito pouco descrita na literatura, porém essa é uma combinação interessante principalmente se valendo da propriedade que alguns fenólicos possuem de se ligar com proteínas (STRAUSS; GIBSON, 2004; NORI et al. 2011).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo obter extrato de canela do Ceilão rico em proantocianidinas, caracterizá-lo e encapsulá-lo pela técnica de coacervação complexa utilizando gelatina e diferentes polissacarídeos. Além disso, foi realizado o estudo da composição do extrato e seus potenciais efeitos benéficos; a caracterização das micropartículas de extrato encapsulado; o estudo da estabilidade das micropartículas sob condições de stress; o estudo da estabilidade das proantocianidinas e fenólicos totais durante a estocagem das partículas; a liberação dos compostos encapsulados e aplicação das partículas em sorvete como sistema modelo.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Canela

A canela está entre as especiarias mais antigas utilizadas pela humanidade, havendo referências a ela em textos pré e pós-bíblicos. Foi uma das especiarias mais procuradas por exploradores durante as grandes navegações nos séculos XV e XVI (DAO, 2004; RAVINDRAN; BABU, 2004). Essa planta pertence ao gênero *Cinnamomum*, cuja origem da palavra vem do Grego *kinnamon* ou *kinnamomon*, que significa “madeira doce” (RAVINDRAN; BABU, 2004).

O gênero *Cinnamomum* compreende um número grande de espécies. No entanto, apenas algumas apresentam importância comercial como especiaria. A canela comercial é obtida da casca interna seca da árvore de *Cinnamomum verum* (sinonímia *C. zeylanicum*) pertencente à família Lauraceae, nativa do Sri Lanka, onde é cultivada em larga escala e exportada, sendo conhecida mundialmente como canela do Ceilão ou canela do Sri Lanka (RAVINDRAN; BABU, 2004). Outras variedades importantes comercialmente são a canela da China (*Cinnamomum cassia*) e a canela de Java (*Cinnamomum burmannii*). Algumas outras espécies originárias da Índia também são utilizadas, porém as três citadas acima são as mais conhecidas (BARUAH; NATH, 2004; RAVINDRAN; BABU, 2004). As formas de comercialização da canela são principalmente em casca e em pó. Mas outros produtos tais como o óleo essencial da casca e das folhas, e alguns compostos isolados, também são importantes (DAYANANDA; SENANAYAKE; WIJESEKERA, 2004). Segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação FAO (Tabela 1), os maiores produtores mundiais de canela em 2013 foram a Indonésia, China, Vietnã e Sri Lanka (FAO, 2016).

Tabela 1 – Produção mundial de canela no ano de 2013.

País	Produção (toneladas)
Indonésia	89.500
China	69.500
Vietnam	22.000
Sri Lanka	15.865
Madagascar	2.400
Timor-Leste	108
Granada	100
Seychelles	60
São Tomé e Príncipe	55
Dominica	50
Comores	9

Fonte: Adaptado de FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>. Acesso em jun. 2016.

A canela do Ceilão (*C. zeylanicum* Blume sinonímia *C. verum* J. Presl) é também conhecida como canela verdadeira. Essa variedade de canela é a mais apreciada no mundo, possuindo maior valor no mercado. Ela difere da variedade *C. cassia* (também chamada de falsa canela), tanto visualmente quanto em aspectos sensoriais e composição química (RANASINGHE et al. 2013). Visualmente, a canela do Ceilão em casca se apresenta em forma de cilindros enrolados igualmente à canela da China. No entanto, apresentam cor marrom clara enquanto que a canela da China é castanho-avermelhada. Possuem menor espessura, sendo mais quebradiça que a canela da China (Figura 1). Apresenta ainda aroma suave quando comparada com a *C. cassia* (KRISHNAMOORTHY; REMA, 2004). Outra diferença importante entre *C. zeylanicum* e *C. cassia* é o conteúdo de cumarinas (1,2-benzopironas) que é mais alto na canela da China o que pode oferecer riscos à saúde se consumidas regularmente e em grandes quantidades, devido aos seus efeitos tóxicos (SENANAYAKE; WIJESEKERA, 2004; ABRAHAN et al. 2010; RANASINGHE et al. 2013).

Figura 1 - Aspecto visual da canela em casca. **(a)** canela do Ceilão (*Cinnamomum zeylanicum*) e **(b)** canela da China (*Cinnamomum cassia*).

Fonte: Própria autoria.

Além do uso como especiaria, a canela, seja a *C. zeylanicum* ou outra espécie, é também bastante utilizada na medicina tradicional, desde a antiguidade e com diferentes finalidades (KRISHNAMOORTHY; REMA, 2004). Alguns de seus efeitos são descritos como carminativo (contra gases intestinais), anti-espasmódico, estimulante, anti-diabetes, dentre outros (KHAN et al. 2003; KRISHNAMOORTHY; BEECHER, 2004; REMA, 2004), sendo usada também como antimicrobiana e antioxidante. Esses efeitos terapêuticos são atribuídos muitas vezes, ao seu óleo essencial ou também aos seus extratos aquosos, obtidos com ou sem adição de algum solvente orgânico (KHAN et al. 2003; KRISHNAMOORTHY; REMA, 2004).

Os extratos de canela obtidos com água, etanol aquoso ou acetona têm sido estudados, e suas propriedades, principalmente anti-diabetes tipo 2, antioxidante, antimicrobiana, entre outras, têm sido destacadas (ANDERSON et al. 2004; CHEN et al. 2012; CHENG et al. 2012;

JIAO et al. 2013). Essas propriedades têm sido atribuídas a um grupo de moléculas presentes nesses extratos, e que tem recebido atenção especial em diversos estudos. Trata-se das proantocianidinas (ANDERSON et al. 2004; JIAO et al. 2013).

2.2 Proantocianidinas

2.2.1 Aspectos gerais

As proantocianidinas, também chamadas de taninos condensados, são um grupo de moléculas formadas por duas ou mais unidades de flavan-3-ols (Figura 2), principalmente (+)-catequina e (-)-epicatequina (HO; RAFI; GHAI, 2010). Esses oligômeros e polímeros de flavonóides diferem entre si pela unidade monomérica envolvida. Por exemplo, proantocianidinas contendo exclusivamente catequina/epicatequina como subunidade, são procianidinas e as que contem epiafzelequina e epigalocatequina são chamadas de propelargonidinas e prodelfinidinas, respectivamente, porém são menos comuns do que as procianidinas (GU et al. 2004; KHANAL; HOWARD; PRIOR, 2009). Diferem também pelo grau de polimerização, podendo ser dímeros, trímeros, tetrâmeros e assim por diante (Figura 3 (a) e (b)), até proantocianidinas poliméricas. Pode também haver diferença nas ligações que unem as subunidades de flavan-3-ols, sendo possível encontrar ligações simples tipo B, principalmente entre os carbonos C₄ e C₈ ou também entre os carbonos C₄ e C₆ de duas subunidades; ou ligações duplas tipo A, formadas por uma ligação entre os carbonos C₄ e C₈ entre duas subunidades e uma ligação éter adicional entre os carbonos C₂ e C₇ como mostrado na Figura 3 (c) e (d) (ROHR; MEIER; STICHER, 2000; HO; RAFI; GHAI, 2010).

Figura 2 – Estruturas mais importantes de unidades de flavan-3-ols encontradas em proantocianidinas.

Fonte: Adaptado de MATEOS-MARTÍN, M. L. et al. New identification of proanthocyanidins in cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, p. 1327-1336, 2012a.

As proantocianidinas apresentam alguns aspectos sensoriais peculiares, como gosto amargo e também causam a sensação de adstringência, devido a sua capacidade de se ligar e precipitar proteínas salivares (BENNICK, 2002; HOFMANN et al. 2006). O que por um lado serve como mecanismo de defesa de algumas plantas, contra predadores, por outro lado, acaba limitando o consumo dos produtos ricos nessas substâncias (BEECHER, 2004). Com relação à estabilidade, essas moléculas são sensíveis às altas temperaturas, meios ácidos e básicos e reações de oxidação, podendo ser oxidação enzimática catalisada pelas polifenoloxidasas ou também auto-oxidação (ROHR; MEIER; STICHER, 2000; MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011).

As proantocianidinas podem ser encontradas em frutas como uvas, romã, maçã e *cranberry*, por exemplo, bem como em cereais, grãos, nozes, bebidas, como chá, cerveja, vinho e sucos, e também em algumas especiarias como a canela (GU et al. 2004). Entre as fontes estudadas para a obtenção comercial de proantocianidinas, a semente de uva se destaca (ZHANG; MOU; DU, 2007; JAKSON, 2008). No entanto, a semente de cacau e a canela são as fontes alimentícias mais ricas nesses compostos, possuindo quantidades médias de proantocianidinas totais em torno de 9,5 e 8,1 g/100 g, respectivamente (GU, et al. 2004; USDA, 2004; KRUGER, et al. 2014).

Na canela do Ceilão (*Cinnamomum zeylanicum*) já foram identificadas proantocianidinas com graus diferentes de polimerização, de dímero a undecâmero (2-11 subunidades) (MATEOS-MARTÍN et al. 2012a). Além de procianidinas, também já foram identificadas nessa planta as prodelfinidinas e propelargonidinas, devido à presença de diferentes subunidades de flavan-3-ols. Outra característica da canela é a de possuir tanto proantocianidinas do tipo-B como do tipo-A (Figuras 3 c e d), estando estas últimas, presentes em grande quantidade nessa fonte, diferente de outras, como a semente de uva, onde predominam as ligações tipo-B (GU et al. 2004; MATEOS-MARTÍN et al. 2012a).

Figura 3 - Exemplos de estruturas das proantocianidinas. (a) e (b): diferentes graus de polimerização, sendo (a) um trímero e (b) um tetrâmero. (c) e (d): diferentes tipos de ligações entre subunidades, sendo (c) um dímero com ligação simples tipo-B e (d) um dímero com ligação dupla tipo-A.

Fonte: Adaptado de MATEOS-MARTÍN, M. L. et al. New identification of proanthocyanidins in cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, p. 1327-1336, 2012a.

2.2.2 Extração

A extração das proantocianidinas a partir de matrizes vegetais é feita principalmente pelo processo de extração sólido-líquido, utilizando solvente adequado (ROHR; MEIER; STICHER, 2000; GUYOT, 2012). No entanto, outras técnicas como a extração utilizando fluido supercrítico e assistida por micro-ondas também já foram relatadas (YILMAZ; OZVURAL; VURAL, 2011; LIU et al. 2012; YANG; LI; CHUANG, 2012). Proantocianidinas são solúveis em água e soluções aquosas de metanol, etanol e acetona (GUYOT, 2012). O uso de solventes orgânicos aquosos permite a extração dos monômeros de flavan-3-ols, dos oligômeros e também das proantocianidinas de maior peso molecular, o que

não acontece quando esses solventes não estão hidratados (ROHR; MEIER; STICHER, 2000).

Entre os solventes utilizados, os álcoois (metanol e etanol) não são muito eficientes na extração das proantocianidinas poliméricas. Essas moléculas se associam com compostos insolúveis da parede celular, quando o tecido vegetal é rompido na preparação da amostra. Para esse fim, soluções aquosas de acetona são as mais utilizadas, pois são capazes de desfazer eficientemente essas interações e consequentemente extrair as moléculas poliméricas (GUYOT, 2012). Por esse motivo, o método clássico de extração de proantocianidinas utiliza normalmente como solvente uma solução aquosa contendo de 60 a 70% de acetona, podendo ser encontradas variações como diferentes quantidades de acetona e acidificação do meio (ROHR; MEIER; STICHER, 2000; GU et al. 2002). Todavia, a acetona e o metanol, por serem solventes que possuem alta toxicidade, não são os mais adequados, quando o objetivo é a aplicação do extrato em produtos alimentícios, por exemplo. Neste caso, o uso da água e soluções aquosas de etanol é mais indicado (SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007; KARVELA et al. 2009; MELLO; HUBINGER et al. 2012).

Na extração sólido-líquido de proantocianidinas, alguns parâmetros são importantes e têm sido estudados a fim de otimizar a obtenção desses compostos. Além do tipo de solvente, a proporção sólido-solvente, o tamanho das partículas do sólido, a temperatura, o pH e o tempo de extração apresentam papel importante para aumentar a eficiência na extração das proantocianidinas, além de minimizar sua degradação durante o processo de extração (JEREZ et al. 2006; SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007; KARVELA et al. 2009; RAJHA et al. 2014).

Outro aspecto importante é que muitas vezes a extração exaustiva a partir de uma matriz vegetal nem sempre é possível. Isso é devido ao fato das formas mais polimerizadas

estarem fortemente associadas com a matriz insolúvel, podendo levar a subestimação da concentração desses compostos (ROHR; MEIER; STICHER, 2000; GUYOT, 2012).

Um dos principais focos dos estudos envolvendo extratos de canela está relacionado com a obtenção e estudo dos seus óleos essenciais (RANASINGHE et al. 2013). Além disso, os trabalhos que tem como foco o estudo das proantocianidinas possuem objetivos principalmente analíticos (KHAN et al. 2003; ANDERSON et al. 2004; TANAKA et al. 2008; JIAO et al. 2013). Não há trabalhos publicados cujo foco tenha sido a extração e concentração das proantocianidinas, para posterior aplicação.

2.2.3 Métodos de detecção

O interesse crescente nas proantocianidinas vem acompanhado da busca por métodos eficientes de identificação e quantificação dessas moléculas obtidas a partir de matrizes complexas (PAYNE et al. 2010). Para esse fim, os métodos disponíveis podem ser divididos principalmente entre os colorimétricos e cromatográficos. Existem também métodos mais modernos, que utilizam a combinação de técnicas como o uso da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (MS); a técnica de *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) *time-of-flight* (TOF) também acoplada à espectrometria de massas, além da análise por ressonância magnética nuclear (RMN) que tem contribuído para elucidar a estrutura desses compostos (ROHR; MEIER; STICHER, 2000; GUYOT, 2012; ANDERSON et al. 2004; MATEOS-MARTÍN et al. 2012a).

Existem diversos métodos colorimétricos disponíveis para a análise de catequinas e proantocianidinas. Os métodos colorimétricos baseiam-se em diferentes mecanismos e princípios e podem ser muito ou pouco específicos (ROHR; MEIER; STICHER, 2000; GUYOT, 2012). Esses métodos podem ser separados em três grupos principais: aqueles baseados em reações não específicas de grupos fenólicos, como o Folin-Ciocalteu

(SINGLETON et al. 1999); aqueles baseados na reação com aldeídos aromáticos, como a vanilina (SARKAR; HOWARTH, 1976) ou o 4-dimetilaminocinamaldeído (DMAC) (PAYNE et al. 2010); e também os que se baseiam na despolimerização de proantocianidinas em meio alcoólico acidificado (PORTER; HRSTICH; CHAN, 1986).

O método do Folin-Ciocalteu é muito utilizado para quantificação de compostos fenólicos totais. No entanto não é muito específico para proantocianidinas e até mesmo pode quantificar compostos não fenólicos, como o ácido ascórbico, o que não o torna um dos métodos preferidos para esse tipo de análise (GUYOT, 2012; PAYNE et al. 2010).

Entre os métodos baseados em reação com aldeídos, o método de reação com o DMAC é preferido, pois é mais sensível e específico, quando comparado com a vanilina (ROHR; MEIER; STICHER, 2000; GUYOT, 2012). A reação de despolimerização de proantocianidinas é também bastante específica, pois libera antocianidinas coloridas em meio contendo n-butanol acidificado, podendo ser lidas a 540 nm e quantificadas comparando-se com substâncias padrão. Apesar de ser um método mais demorado e menos simples do que o DMAC, ainda é bastante utilizado (PORTER; HRSTICH; CHAN, 1986; ROHR; MEIER; STICHER, 2000; GUYOT, 2012).

O método de reação de amostras contendo proantocianidinas com o 4-dimetilaminocinamaldeído (DMAC) baseia-se no princípio de que compostos fenólicos reagem com aldeídos aromáticos em condições ácidas, se esses fenólicos possuírem anéis aromáticos, contendo duas ou três hidroxilas meta-orientadas, como é o caso das catequinas e proantocianidinas, por exemplo. Essa reação, no caso do DMAC, gera produtos de coloração verde-azulada que podem ser lidos a 640 nm e quantificados pela comparação com substâncias padrão. As principais vantagens desse método são a rapidez, a simplicidade e a especificidade, o que o torna um dos mais utilizados atualmente (PAYNE et al. 2010; GUYOT, 2012; KANG et al. 2014).

Apesar dos métodos colorimétricos oferecerem medida satisfatória quando se deseja determinar o teor total de proantocianidinas em determinada amostra, eles não são capazes de identificar e determinar os compostos individuais, além de serem limitados quando a amostra contém proantocianidinas altamente polimerizadas (ROHR; MEIER; STICHER, 2000; GUYOT, 2012). Para o propósito de separação e identificação dos compostos individualmente, métodos cromatográficos são mais indicados e utilizados. Para utilização desses métodos, se faz necessário normalmente o fracionamento dos extratos, a fim de se eliminar interferentes também extraídos, como ácidos, açúcares e sais, obtendo-se apenas a fração contendo os fenólicos. A adsorção em resinas sólidas como C18, poliamida e principalmente Sephadex LH-20, tem sido utilizada para realizar esse fracionamento quando se trata da análise de proantocianidinas (GUYOT, 2012; ADERSON et al. 2004).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) é uma das mais utilizadas em análise de proantocianidinas (ROHR; MEIER; STICHER, 2000; GUYOT, 2012). Essa técnica tem sido aplicada utilizando configuração em fase normal (LARARUS et al. 1999) ou fase reversa (GUYOT, 2012), realizando-se a detecção em comprimento de onda de 280 nm (região do ultravioleta UV) (SPRANGER et al. 2008; GUYOT, 2012) e também com detector de fluorescência, que tem mostrado ser mais sensível para esses compostos (GU et al. 2002; GUYOT, 2012). A análise em HPLC não permite a separação de moléculas individuais de proantocianidinas com grau de polimerização maior que 5, devido à presença de grande quantidade de isômeros. O que é feito normalmente é a separação desses compostos por grau de polimerização (GU et al. 2003; 2004; HURST et al. 2009; KHANAL; HOWARD; PRIOR, 2009). Além disso, a quantificação desses compostos se torna difícil, pois a variedade de padrões, que seriam necessários para todo o grupo de proantocianidinas, que pode estar presente na amostra, ainda não é encontrada (KHANAL; HOWARD; PRIOR, 2009).

Quando se faz necessário análises mais precisas, para além de separar as proantocianidinas por grau de polimerização, identificar o tipo de subunidade, o tipo de ligação inter-flavan e elucidar estruturas, é necessário a utilização de análises mais sofisticadas. Tem sido bastante utilizada a espectrometria de massas (MS) acoplada à cromatografia líquida (HPLC-MS/MS), a fim de principalmente identificar o grau de polimerização das proantocianidinas e quantificar cada porção (GU et al. 2004). As técnicas de MALDI-TOF/MS e MALDI-TOF/TOF também acoplada à espectrometria de massas, têm se mostrado bastante eficientes em identificar estruturas de proantocianidinas oligoméricas e poliméricas, identificar os tipos de subunidades e ligações inter-flavan envolvidas (REED; KRUEGER; VESTLING, 2005; MATEOS-MARTÍN et al. 2012a). Além disso, o uso da ressonância magnética nuclear tem sido útil na elucidação da estrutura dessas moléculas (ANDERSON et al. 2004; TANAKA et al. 2008).

2.2.4 Efeitos benéficos

Existem diversas formas de se utilizar as proantocianidinas industrialmente. Elas podem ser aplicadas como agentes tanantes em curtumes, ou conferir naturalmente, aspectos sensoriais desejados em algumas bebidas, como certa adstringência no chá e no vinho, entre outras aplicações (BEECHER, 2004; JAKSON, 2008). No entanto, o interesse crescente no estudo dessas moléculas se deve em grande parte aos benefícios à saúde que a elas têm sido atribuídos (GU et al. 2004).

As proantocianidinas têm sido identificadas em diferentes matérias-primas como responsáveis pela atividade anti-diabetes tipo-2 (ANDERSON et al. 2004; CAO; POLANSKY; ANDERSON, 2007; CHENG et al. 2012; JIAO et al. 2013; KANG et al. 2014). Estudos revelam que as proantocianidinas presentes em diferentes espécies de canela, são as principais responsáveis por estimular o metabolismo da glicose, a síntese de glicogênio

e liberação de insulina *in vitro* (ANDERSON, 2004; JIAO et al. 2013). Em modelos animais, essas moléculas têm trazido benefícios, como a atenuação da perda de peso associada a diabetes, redução da glicose sanguínea e regulação dos níveis de insulina no sangue (CHEN et al. 2012; JIAO et al. 2013). Khan et al. (2003) mostraram que a ingestão diária de 1, 3 ou 6 g de canela em pó reduz os níveis de glicose, triacilgliceróis, colesterol LDL e colesterol total no sangue de pessoas com diabetes tipo-2. A canela tem sido bastante estudada para esse tipo de atividade, devido, principalmente, aos tipos de proantocianidinas que contém. Já é sabido que as proantocianidinas oligoméricas com ligação do tipo A entre as subunidades, são as mais potentes contra o diabetes tipo-2 (ANDERSON et al. 2004).

A atividade anti-obesidade também tem sido atribuída a esses compostos (YUN, 2010; KIMURA et al. 2011; SERGENT et al. 2012). Uma estratégia para prevenção da obesidade se baseia na inibição da lipase pancreática e as proantocianidinas tem mostrado que são capazes dessa inibição. Kimura et al. (2011), estudando as proantocianidinas presentes em mirtilo e *cranberry*, mostraram que as que possuem maior peso molecular e contém ligações do tipo A, apresentaram maior capacidade de inibir a lipase pancreática.

Proantocianidinas apresentam grande capacidade de sequestrar radicais e de se ligar com íons divalentes, como ferro e cobre, o que contribui para sua capacidade antioxidante. Isso se deve principalmente à estrutura química desses compostos que apresentam grupos fenólicos poli-hidroxilados, o que resulta em uma configuração que torna relativamente fácil a liberação de prótons. Essa estrutura química também é a responsável pela capacidade que possuem de quelar íons metálicos (BEECHER, 2004). Proantocianidinas tipo-A, extraídas das folhas de *Ixora coccinea*, por exemplo, são capazes de sequestrar radicais DPPH, inibir a peroxidação lipídica e inibir o óxido nítrico (IDOWU et al. 2010). E segundo Iglesias et al. (2012), procianidinas de sementes de uva são capazes de prevenir a oxidação em músculo de

peixe, enquanto atuam sinergeticamente com os antioxidantes naturais presentes, reparando o α -tocoferol oxidado e minimizando a perda do ácido ascórbico.

O potencial de inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos também tem sido testado e observado nas proantocianidinas, porém esse estudo não é muito frequente (SHAN et al. 2007; IDOWU et al. 2010). Shan et al. (2007) observaram que as proantocianidinas do extrato de canela de Java (*C. burmannii*) são capazes de inibir o crescimento de 5 linhagens comuns de bactérias patogênicas (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, e *Salmonella anatum*). Já Idowu et al. (2010) observaram essa atividade principalmente contra *Bacillus cereus*, por parte das proantocianidinas extraídas de folhas de *Ixora coccinea*.

Outros efeitos benéficos produzidos pelas proantocianidinas têm sido relatados, como redução do risco de doenças cardiovasculares, de alguns tipos de câncer e de infecções do trato urinário, além da capacidade de regeneração celular da pele, entre outros (FOO et al. 2000; DETERS et al. 2001; BEECHER, 2004; HOWELL et al. 2005). No entanto, a sensação de adstringência causada por essas moléculas gera um desafio tecnológico a ser vencido caso se queira produzir um suplemento ou alimento contendo níveis substanciais de proantocianidinas (BEECHER, 2004). Uma das tecnologias disponíveis e que poderia resolver tal problema é a microencapsulação.

2.3 Microencapsulação

2.3.1 Aspectos gerais

A microencapsulação é uma tecnologia utilizada com o objetivo de recobrir materiais sólidos, líquidos ou gasosos (ativos ou núcleos), normalmente utilizando materiais poliméricos (encapsulantes), produzindo partículas pequenas da ordem de micrômetros (micropartículas), que podem liberar o conteúdo de forma controlada e em condições

específicas (ARSHADY, 1993; FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; AUGUSTIN; HEMAR, 2008).

Diversas indústrias, tais como a de alimentos, a farmacêutica, de cosméticos e a de higiene e limpeza, utilizam técnicas de encapsulação em seus produtos, sendo diversas as finalidades que justificam o emprego dessas tecnologias. A encapsulação pode garantir proteção aos compostos sensíveis contra condições adversas do ambiente (pH, temperatura, luz, oxigênio, enzimas etc.), seja durante a estocagem, ou no próprio organismo de quem ingerir, garantindo maior estabilidade do composto do que se ele estivesse livre (SOUZA et al. 2014). A microencapsulação pode permitir a liberação controlada de ativos em condições específicas, o que permite, por exemplo, que um ingrediente resista às condições adversas do estômago e seja liberado apenas no intestino (DE VOS et al. 2010); ou ainda a liberação prolongada de algum ingrediente, o qual se deseje aumentar a sensação, como o dulçor em gomas de mascar, por exemplo (ROCHA-SELMÍ et al. 2013). A encapsulação possibilita a obtenção de materiais com desempenho melhorado permitindo novas aplicações, como por exemplo, na melhora da solubilidade em água de compostos hidrofóbicos (SILVA et al. 2013). Além disso, é possível mascarar aspectos sensoriais indesejados de alguns ingredientes e também transformar líquidos em pó, facilitando a manipulação, estocagem, transporte e aplicação de ingredientes em formulações (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

Em alimentos, diversos ingredientes são encapsulados, sendo muitos deles tradicionais como: aromas, vitaminas, pigmentos, minerais, e também outros, como os micro-organismos probióticos, peptídeos bioativos, fitoesteróis e compostos fenólicos (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; FANG; BHANDARI, 2010; ONWULATA, 2012). Como materiais encapsulantes são normalmente utilizados, para aplicação em alimentos, os polissacarídeos (maltodextrinas, goma arábica, pectina, amidos, alginato etc.), proteínas (glúten, caseína, gelatina, albumina, hidrolisados proteicos etc.) e também alguns lipídeos (mono e

diacilgliceróis, óleos e gorduras) (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; AUGUSTIN; HEMAR, 2008).

Os mecanismos de liberação dos ativos ou núcleos encapsulados são diversos e variam de acordo com a natureza do material encapsulante, podendo-se destacar: variação de temperatura e do pH, ruptura mecânica, biodegradação, solubilidade do meio, permeabilidade seletiva e gradiente de concentração em relação ao meio de liberação (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008). Tal fato pode tornar a microencapsulação interessante, pois, no projeto de microcápsulas deve-se pensar primeiro, no que se vai encapsular e qual o resultado esperado e só então decidir quais os melhores materiais encapsulantes e técnicas de encapsulação.

São diversas as técnicas utilizadas na microencapsulação de ingredientes. Dentre elas podem ser citadas, o *spray-drying* e *spray-chilling*, a gelificação iônica, as coacervações simples e complexa, a emulsificação, os lipossomas, a inclusão molecular, a encapsulação em células e mais recentemente a encapsulação utilizando CO₂ supercrítico (GOUIN, 2004; FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; FANG; BHANDARI, 2010). As características físico-químicas (morfologia, tamanho das partículas etc.) e de desempenho (estabilidade, liberação etc.) das microcápsulas podem variar enormemente a depender do material encapsulante utilizado e da técnica de encapsulação escolhida (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

As partículas obtidas no processo de encapsulação, dependendo de todas as condições envolvidas, podem ser classificadas como microcápsulas ou microesferas (Figura 4). Microcápsulas são partículas do tipo reservatório, onde o material ativo é recoberto por uma capa do material encapsulante. Já microesferas são partículas do tipo matriz, onde o ativo e o encapsulante estão distribuídos por todo o volume da partícula inclusive na superfície (DESAI; PARK, 2005). Além disso, as partículas podem ter diferentes formatos, como uma

simples membrana de cobertura esférica ou irregular, podem ter estruturas de multiparedes de composições diferentes ou numerosos núcleos em uma mesma estrutura (GIBBS et al. 1999).

Figura 4 - Esquema das estruturas de micropartículas produzidas por encapsulação.

Fonte: Própria autoria.

2.3.2 Encapsulação por coacervação complexa

O termo coacervação foi utilizado primeiramente por Bungenberg de Jong e Kruyt no ano de 1929 e é utilizado para descrever o fenômeno de separação de fases que ocorre quando soluções aquosas de polieletrólitos são misturadas (DE KRUIF; WEINBRECK; DE VRIES, 2004; WEINBRECK; MINOR; DE KRUIF, 2004). O termo coacervação vem do latim “co” e “acervus” que significa união e agregação de partículas. A coacervação pode ser simples, obtida através da adição de agente extremamente hidrofílico à solução coloidal ou pela diminuição da temperatura; ou complexa, onde a separação de fases ocorre pela mistura de dois polieletrólitos de cargas opostas (WEINBRECK; MINOR; DE KRUIF, 2004).

A mistura de dois polieletrólitos de cargas opostas, no entanto, nem sempre garante a formação de coacervados e nem todo coacervado pode ser considerado microcápsula. Para que haja a microencapsulação por coacervação complexa, deve-se garantir que os complexos se formem ao redor do material ativo que se deseja encapsular (SINGH; BURGESS, 1989).

Esse método de encapsulação é conhecido por produzir micropartículas do tipo reservatório (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2007). As etapas para produção de microcápsulas por coacervação complexa podem ser exemplificadas simplificadaamente como mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Esquema simplificado da produção de microcápsulas por coacervação complexa. **(a)** dispersão ou emulsificação do ativo na solução polieletrólítica. **(b)** adição da solução do polieletrólito de carga oposta, sob agitação. **(c)** formação das microcápsulas após aquecimento, ajuste do pH e resfriamento, sob agitação. **(d)** precipitação das microcápsulas formadas, após repouso.

Fonte: Própria autoria.

Basicamente o processo pode ser resumido como: primeiramente o material ativo é disperso, ou emulsionado em solução aquosa contendo um dos polímeros encapsulantes (uma proteína, por exemplo); em seguida é adicionada outra solução contendo o segundo polímero (por exemplo, um polissacarídeo). Essa mistura pode ser aquecida quando necessário e seu pH é ajustado até determinado valor onde os polímeros possuam cargas opostas, a fim de que ocorra atração eletrostática e consequentemente haja a deposição dos complexos poliméricos sobre as gotas ou partículas do material ativo presente; por fim o sistema é resfriado (normalmente até 10 °C) a fim de promover a solidificação da cobertura polimérica e após certo tempo em repouso, as microcápsulas decantam e podem ser recolhidas e secas, obtendo-se um pó (GOUIN, 2004; DESAI; PARK, 2005).

Alguns parâmetros influenciam na formação do complexo e coacervado entre os polímeros utilizados, e consequentemente, influenciam o processo de encapsulação por coacervação complexa. Entre as características que podem ser influenciadas estão o rendimento, morfologia das partículas, eficiência de encapsulação, o tipo de estrutura (coacervado ou precipitado) etc. Entre os parâmetros podem ser destacados: o pH, a força iônica, a proporção entre os polímeros, a proporção entre a quantidade de núcleo e encapsulantes, entre outros (DANIELS; MITTERMAIER, 1995; LAMPRECHT; SCHÄFER; LEHR, 2001; YE, 2008; SCHMITT; TURGEON, 2011). Esses parâmetros irão variar a depender do tipo de par polimérico escolhido como material encapsulante (DE KRUIF; WEINBRECK; DE VRIES, 2004).

A coacervação complexa é utilizada como técnica de encapsulação principalmente para compostos hidrofóbicos (ALVIM; GROSSO, 2010). No entanto alguns estudos envolvendo compostos hidrofílicos são encontrados, porém para esse tipo de material ativo é necessária a produção de uma emulsão do material ativo em óleo ou emulsões múltiplas, antes da coacervação, dessa forma a emulsão produzida é encapsulada como ativo hidrofóbico (COMUNIAN et al. 2013; ROCHA-SELMÍ et al. 2013). Há ainda a possibilidade de se encapsular compostos com alta solubilidade em água, mas que consigam se ligar a um dos polímeros formadores da cápsula, como por exemplo, alguns compostos fenólicos que podem se ligar a proteínas (STRAUSS; GIBSON, 2004; NORI et al. 2011).

Existem diversos materiais poliméricos utilizados como encapsulantes no processo de coacervação complexa, sendo que um dos pares poliméricos mais comuns é composto por proteínas e polissacarídeos (DE KRUIF; WEINBRECK; DE VRIES, 2004; SCHMITT; TURGEON, 2011). O sistema mais utilizado para microencapsulação com essa técnica é formado pelo par polimérico gelatina-goma arábica. No entanto outros materiais têm sido estudados. Entre as proteínas podem ser citadas, a caseína, albumina, proteínas do soro, entre

outras. Entre os carboidratos, pectinas com alto e baixo teor de metoxilação, goma xantana, quitosana, carragena, entre outros, têm sido também pesquisados. E para cada par polimérico escolhido, as condições de processo devem ser estudadas e estabelecidas (DE KRUIF; WEINBRECK; DE VRIES, 2004).

Na Tabela 2 estão apresentados alguns trabalhos recentes onde se obtiveram microcápsulas através da técnica de coacervação complexa.

Tabela 2 – Trabalhos recentes sobre microencapsulação por coacervação complexa.

Materiais encapsulantes (par polimérico)	Núcleo	Referência
Isolado proteico de chia/goma da semente de chia	Óleo da semente de chia	TIMILSENA et al. 2016
Gelatina/goma Arábica e gelatina/pectina	Sulforafano de sementes de brócolis	GARCÍA-SALDAÑA et al. 2016
Gelatina/goma de cajueiro	Astaxantina de camarão	GOMEZ-ESTACA et al. 2016
Caseína/goma tragacanto	β -caroteno	JAIN et al. 2016
Gelatina/goma Arábica e gelatina/goma de cajueiro	Óleo de Echium	COMUNIAN et al. 2016
Albumina/goma Arábica	Curcumina	SHAHGHOLIAN; RAJABZADEH, 2016
Proteínas do leite/carboximetilcelulose	β -pineno	KOUPANTSIS et al. 2016

Fonte: Própria autoria.

2.3.3 *Materiais encapsulantes*

2.3.3.1 Gelatina

A gelatina é uma proteína solúvel em água (em temperatura entre 38 e 40 °C), obtida da hidrólise parcial do colágeno que é a principal proteína constituinte da pele, ossos, couro e tecidos conectivos dos animais (KEENAN, 1998; KALMAN, 2004; GHOSHAL; MATTEA; STAPF, 2010). Comercialmente encontram-se as gelatinas do tipo A, que é obtida através do processamento ácido do colágeno bruto e a do tipo B que é obtida através de processamento

alcalino. É considerada uma proteína derivada, pois é obtida a partir de outra proteína, não sendo encontrada naturalmente (KEENAN, 1998).

A gelatina é composta dos aminoácidos glicina (33%), prolina/hidroxiprolina (22%) e os 45% restantes são correspondentes a 17 aminoácidos, dos quais a alanina é o mais abundante (KALMAN, 2004).

A gelatina obtida por tratamento ácido apresenta ponto isoelétrico de aproximadamente 9,4 enquanto a que é obtida com tratamento alcalino apresenta ponto isoelétrico na faixa ácida de 4,8 a 5,2 (POPPE, 1997). Essa proteína apresenta caráter anfótero devido aos grupos funcionais dos aminoácidos e também aos grupos amino e carboxi-terminais criados durante a hidrólise. Por isso, em meios fortemente ácidos a gelatina é positivamente carregada, agindo como cátion e em meios fortemente alcalinos apresenta carga negativa, atuando como ânion (KEENAN, 1997). Essa característica da gelatina bem como outras propriedades como a capacidade de formar géis e filmes torna esse material interessante para a obtenção de micropartículas por coacervação complexa.

O fenômeno de coacervação foi primeiramente estudado utilizando a gelatina como polímero catiônico (DE KRUIF; WEINBRECK; DE VRIES, 2004; WEINBRECK; MINOR; DE KRUIF, 2004). Essa proteína é também uma das mais utilizadas na microencapsulação de diversos compostos pela técnica de coacervação complexa, como na encapsulação de fármacos utilizando gelatina/goma arábica como encapsulantes (TIRKKONEN; TURAKKAS; PARONEN, 1994), licopeno encapsulado no sistema gelatina/pectina (SILVA et al. 2012), astaxantina de camarão utilizando gelatina/goma de cajueiro (GOMEZ ESTACA et al. 2016) entre outros trabalhos.

2.3.3.2 Goma arábica

A goma arábica ou goma acácia é obtida da secreção (exsudato) de árvores de acácia, das quais existem várias espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais, sendo alguns países africanos, como Sudão e Nigéria, produtores importantes desse material (BEMILLER; HUBER, 2010).

Quanto a sua composição, a goma arábica apresenta-se de forma heterogênea, embora em geral, consista de duas frações primárias. Uma das frações correspondente a 70% é composta de uma cadeia de polissacarídeos, principalmente D-galactose, L-arabinose, L-ramnose, D-glicose e ácido D-glicurônico. A outra fração contém moléculas de maior massa molecular contendo proteínas, sendo o conteúdo proteico total de cerca de 2%. Esse polissacarídeo possui alta solubilidade em água, diferente de outras gomas, sendo capaz de formar soluções de baixa viscosidade, mesmo em altas concentrações de até 50%. A capacidade emulsificante também é uma propriedade importante e se deve justamente à fração proteica que está ligada aos blocos de carboidratos hidrofílicos. Essas cadeias de proteínas são capazes de adsorver fortemente na interface óleo/água (BUFFO; REINECCIUS; OEHLERT, 2001; WILLIAMS; PHILLIPS, 2001; BEMILLER; HUBER, 2010). Essa goma é o hidrocoloide emulsificante mais conhecido e utilizado na indústria principalmente para emulsificar óleos aromatizantes.

Sabe-se que a goma arábica apresenta carga negativa quando em soluções ácidas (SANCHEZ et al. 2002). Isso torna esse material interessante para ser utilizado no processo de coacervação complexa com outro polímero catiônico. Não por acaso, a goma arábica forma juntamente com a gelatina, o par polimérico clássico, no qual iniciaram-se os estudos a respeito do fenômeno de coacervação complexa (DE KRUIF; WEINBRECK; DE VRIES, 2004; WEINBRECK; MINOR; DE KRUIF, 2004). E também forma o par mais utilizado para o processo de encapsulação de diferentes substâncias por essa técnica, tais como fármacos

(TIRKKONEN; TURAKKAS; PARONEN, 1994), oleoresina de páprica (ALVIM; GROSSO, 2010), ácido ascórbico (COMUNIAN et al. 2013), edulcorantes, como aspartame e sucralose (ROCHA-SELMÍ et al. 2013a; 2013b), óleo de Echium (COMUNIAN et al. 2016), entre outros.

2.3.3.3 Pectina

As pectinas são um grupo complexo de polissacarídeos presentes na parede celular de vegetais, podendo ser extraídas com ácidos dando origem às pectinas comerciais. Quimicamente, as pectinas comerciais são galacturonoglicanos ou ácidos poli[α -D-galactopiranosilurônico] com conteúdo variado de grupos de éster metílico (SILVA; RAO, 2006; BEMILLER; HUBER, 2010). Dependendo do número de grupos metílicos esterificados nos grupos carboxila da molécula de ácido galacturônico, as pectinas podem ser classificadas como de alto ou baixo grau de metoxilação (BEMILLER; HUBER, 2010).

Pectinas possuem propriedade gelificante o que torna esse material um ingrediente bastante utilizado na indústria de alimentos, principalmente na produção de geleias de fruta e doces (SILVA; RAO, 2006). Pectinas com alto grau de metoxilação gelificam em meio ácido e na presença de açúcar, sendo muito utilizado na produção de geleias comuns de frutas. Já as pectinas com baixo grau de metoxilação formam géis na presença de íons divalentes como o cálcio, podendo ser aplicadas para produção de géis em produtos com teor reduzido de açúcar (SILVA; RAO, 2006; BEMILLER; HUBER, 2010).

Esse polissacarídeo também desperta interesse pela possibilidade de formar complexos com diferentes proteínas (LI, ZHAO; HUANG, 2014). Esses complexos podem ter diferentes aplicações, por exemplo, usados como emulsificante (FERNANDEZ, 2001) e também podem ser utilizados na encapsulação de diferentes substâncias, tais como, hidrolisado proteico

(MENDANHA et al. 2009), fármacos (SARAVANAN; RAO, 2010), licopeno (SILVA et al. 2012), sulforafano de sementes de brócolis (GARCÍA-SALDAÑA et al. 2016).

2.3.3.4 Carboximetilcelulose (CMC)

É um polissacarídeo carregado, solúvel em água, derivado da celulose obtida de plantas (DAVIS, 2005), sendo amplamente utilizada na indústria de alimentos como goma (BEMILLER; HUBER, 2010).

A CMC consiste de uma molécula longa, relativamente rígida e com carga negativa devido ao número grande de grupos carboxílicos ionizados que estão esterificados na molécula. Isso gera repulsão eletrostática em solução, fazendo com que essas moléculas fiquem estendidas e ocorra repulsão entre as cadeias adjacentes, o que torna as soluções de CMC bastante viscosas (BEMILLER; HUBER, 2010).

Além do uso como espessante e estabilizante na indústria de alimentos, a carboximetilcelulose, devido a sua carga negativa, pode formar complexos com outros materiais que sejam carregados positivamente em solução, dessa forma podendo ser utilizada na encapsulação por coacervação complexa. Lv et al. (2012) propuseram o uso de gelatina e CMC como uma nova combinação de material de parede na obtenção de cápsulas por coacervação complexa. Koupantsis, Pavlidou e Paraskevopoulou (2016) utilizaram a combinação de caseinato de sódio ou isolado proteico de soro com carboximetilcelulose para encapsular aromas.

2.3.3.5 K-Carragena

As carragenas consistem em um grupo da família das galactanas sulfatadas extraídas de algas vermelhas. São bastante utilizadas em indústrias de alimentos, têxteis e de papel

devido suas propriedades de formar soluções viscosas e géis firmes (STORTZ, 2005; BEMILLER; HUBER, 2010).

As principais estruturas que compõem esse grupo são as carragenas kappa (κ), iota (ι) e lambda (λ), diferindo no número e posição dos grupos sulfatados que estão esterificados no grupo hidroxila da cadeia de carboidrato. Em solução, os grupos semiéster sulfato estão sempre ionizados, o que torna a viscosidade das soluções relativamente estável em ampla faixa de valores de pH, além de conferir carga negativa à molécula (BEMILLER; HUBER, 2010).

Uma propriedade interessante da κ -carragena é sua capacidade de reagir com proteínas, especialmente as do leite, formando gel fraco que pode ser vertido. Isso faz com que esse polissacarídeo seja aplicado em diversos produtos lácteos como estabilizante (BEMILLER; HUBER, 2010).

As cargas negativas da κ -carragena em solução também podem ser aproveitadas para formação de complexos com materiais positivamente carregados, como soluções de algumas proteínas ou outros polissacarídeos, sendo que esses complexos podem ser utilizados para encapsulação. Devi e Maji (2010) utilizaram o complexo formado entre gelatina e κ -carragena para encapsular óleo de semente de nim (*Azadirachta Indica*). Já Dima et al. (2014) investigaram a encapsulação do óleo essencial de pimenta-da-Jamaica (*Pimenta dioica*) utilizando a técnica de coacervação complexa entre quitosana e κ -carragena.

2.3.3.6 Goma do cajueiro

Trata-se de um polissacarídeo heterogêneo, solúvel em água, que é produzido e exsudado naturalmente após fermento no caule e ramos de árvores do cajueiro (*Anacardium occidentale*). Contém em sua composição principalmente D-galactose (61%), L-arabinose (14%), D-glicose (8%), L-ramnose (7%), ácido D-glicurônico (5%). Também apresentam

quantidades pequenas de D-manose, D-xilose e ácido 4-*O*-metil-D-glicurônico (RODRIGUES; DE PAULA; COSTA, 1993; DE PAULA; HEATLEY; BUDD, 1998; SARUBBO et al. 2007).

A goma de cajueiro apresenta características semelhantes às aquelas apresentadas pela goma arábica, podendo, portanto, ser utilizada na substituição dessa goma como cola líquida para papel, além de diversos usos nas indústrias farmacêutica, de cosméticos e de alimentos (SARUBBO et al. 2007). Além disso, por apresentar baixa viscosidade em solução, pode ser utilizada como agente carreador na encapsulação por *spray drying*. Rodrigues e Grosso (2008) utilizaram a goma de cajueiro para encapsular extrato de café rico em compostos aromáticos, pela técnica de *spray drying* conseguindo proteção ao aroma similar à goma arábica. Essa goma também já foi combinada com alginato e utilizada na encapsulação de óleo essencial por *spray drying* obtendo boa eficiência de encapsulação (OLIVEIRA; PAULA; DE PAULA, 2014).

Devido à presença de ácido glicurônico em sua composição, a goma de cajueiro apresenta certa carga negativa em solução. No entanto, essa carga não é totalmente apropriada para formação de complexos polieletrólíticos. Algumas reações de modificação, tais como a carboximetilação, sulfatação e oxidação podem incorporar carga iônica ou aumentar a quantidade de carga existente, melhorando essa propriedade no material (KUMAR et al. 2012). Apesar disso, Gómez-Estaca et al. (2016) obtiveram micropartículas formadas do par polimérico gelatina/goma de cajueiro encapsulando astaxantina de camarão pela técnica de coacervação complexa. Os autores observaram que as micropartículas obtidas melhoraram a estabilidade do pigmento e sua capacidade corante em comparação ao mesmo material não encapsulado. No entanto, obtiveram partículas com formato bastante irregular e tamanhos diversos. Resultado semelhante foi observado por Comunian et al. (2016) em micropartículas de óleo de *Echium* encapsulado com gelatina/goma de cajueiro.

2.3.4 *Microencapsulação de compostos fenólicos*

A utilização de tecnologias de microencapsulação em compostos fenólicos tem o objetivo de manter a bioatividade e aumentar a estabilidade e biodisponibilidade dessas moléculas, garantindo seus efeitos benéficos (FANG; BHANDARI, 2010). Além da proteção aos compostos, a encapsulação pode mascarar aspectos sensoriais indesejáveis e também promover liberação controlada dos ativos em seus sítios de ação (FANG; BHANDARI, 2010; ARES et al. 2009).

Diferentes técnicas têm sido utilizadas na encapsulação de compostos fenólicos visando as mais diversas aplicações. E diversos tipos de moléculas são encapsulados, podendo-se citar as catequinas, antocianinas e proantocianidinas entre outros tipos (FANG; BHANDARI, 2010; MUNIN; EDWARDS-LÉVY et al. 2011; GADKARI; BALARAMAN, 2015; PINHO et al. 2014).

A encapsulação de proantocianidinas já foi relatada, no entanto, poucos estudos a esse respeito são encontrados. E as procianidinas de extrato de uva são as mais estudadas em sua forma encapsulada (ANDRY et al. 1998; ZHANG; MOU; DU, 2007). Além disso, o uso da técnica de coacervação complexa na encapsulação dessas moléculas não foi relatado. Aliás, poucos estudos utilizam essa técnica para encapsulação de compostos fenólicos ou de extratos ricos em fenólicos (DELADINO et al. 2008; NORI et al. 2011).

O estudo da encapsulação de proantocianidinas da canela é interessante, tendo em vista a possibilidade de obtenção de um produto rico nesses compostos, no qual o ativo seja protegido garantindo sua estabilidade. Além disso, a encapsulação poderá mascarar a sensação de adstringência causada pelas proantocianidinas, permitindo a aplicação das micropartículas em sistemas alimentícios, onde o aporte necessário dessas moléculas possa ser fornecido, sem a necessidade de consumo excessivo da especiaria.

3 Material e métodos

3.1 Materiais

3.1.1 *Matéria-Prima*

Foi utilizada a canela do Ceilão (*C. zeylanicum*) em casca (Figura 6), obtida da empresa WG Products (Waskaduwa, Sri Lanka). A matéria-prima foi armazenada em local seco e arejado até momento do uso. A canela do Ceilão foi escolhida devido ao seu baixo ou nenhum conteúdo de cumarina em comparação com a canela da China (*C. cassia*). Foi avaliado o perfil químico das duas variedades de canela através de cromatografia líquida como descrito no item 3.5, para a identificação da cumarina. O resultado dessa análise é apresentado no Apêndice B.

Figura 6 – Canela do Ceilão (*Cinnamomum zeylanicum*) em casca.

Fonte: Própria autoria.

3.1.2 *Materiais encapsulantes*

Como materiais encapsulantes foram utilizados a gelatina suína tipo A, como polímero catiônico (Gelnex, Itá, Santa Catarina, Brasil), como polímeros aniônicos foram utilizados a goma Arábica (Nexira Brasil, São Paulo, Brasil), pectina cítrica com alto grau de metoxilação (Vetec-Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), carboximetilcelulose (Arcólor, São

Lourenço, São Paulo, Brasil), k-carragena (gentilmente doada pela Kerry, Três Corações, Minas Gerais, Brasil) e goma de cajueiro (Gentilmente doada pela Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará, Brasil). A seleção dos materiais encapsulantes foi feita em ensaio preliminar que está apresentado no Apêndice C.

3.2 Extração das proantocianidinas

3.2.1 *Preparo da matéria-prima*

A canela em casca foi triturada em liquidificador (modelo RI 2008, Walita, Varginha, Brasil) obtendo-se um pó (Figura 7) com diâmetro médio de partícula de $0,42 \pm 0,01$ mm. O diâmetro médio das partículas de canela foi determinado após separação em um sistema vibratório (Bertel, 1868, Caieiras, Brasil) com peneiras (Tyler series, Wheeling, Estados Unidos).

Figura 7 – Canela do Ceilão em casca após trituração.

Fonte: Própria autoria.

3.2.2 *Preparo do solvente*

Foi preparado etanol aquoso 50% em massa através da diluição de etanol absoluto (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, Brasil) com água deionizada (Millipore, Milli-Q, Bedford, MA, Estados Unidos). A concentração de etanol foi definida em ensaios preliminares apresentados no Apêndice A.

3.2.3 *Experimentos de extração*

Foram realizados experimentos de extração em batelada, utilizando-se célula de equilíbrio construída em vidro *pyrex*, similar às utilizadas por Rodrigues e Oliveira (2010). A célula era encamisada e foi conectada a um banho termostático e selada, com o intuito de evitar perdas de massa por evaporação. Quantidades exatamente conhecidas de canela em casca moída e solvente (etanol aquoso a 50% m/m) foram colocadas em contato, em razões mássicas sólido:solvente de 1:7,5 e 1:10, a temperaturas de 25, 40 e 60 °C, sob agitação constante de 650 rpm. Foram executados um total de 6 experimentos com duas repetições. O tempo total de extração foi de 60 minutos, sendo que alíquotas do extrato foram retiradas nos intervalos de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 min, com o auxílio de seringas. As alíquotas foram centrifugadas a 5752 g, 4 °C durante 2 min em uma centrífuga modelo 5430 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e o sobrenadante (extrato) foi submetido à análise para determinação do conteúdo total de proantocianidinas, conforme descrito no item 3.3. O esquema do aparato utilizado nos experimentos de extração está apresentado na Figura 8. A escolha dos valores de temperatura foi baseada no trabalho de Cacace e Mazza (2003) e também Bucic-Kojic et al. (2013) que avaliaram a extração de compostos fenólicos em matrizes vegetais. A escolha das razões sólido:solvente foi baseada no trabalho Jerez et al. (2006) com a extração de compostos fenólicos da casca de pinheiro. Foi levada em consideração também a necessidade de agitação constante no sistema.

Figura 8 - Esquema do aparato utilizado na realização dos experimentos de extração das proantocianidinas da canela, em batelada.

Fonte: Própria autoria.

3.3 Quantificação das proantocianidinas

O teor de proantocianidinas totais, nas amostras de extrato, foi determinado pelo método do 4-dimetilaminocinamaldeído (DMAC) de acordo com Payne et al. (2010) com modificações no volume total de reação, tempo de reação e diluições para os pontos da curva padrão, como descrito a seguir. Para essa determinação, foram adicionados em tubos de vidro com rosca 0,5 mL dos extratos diluídos em etanol absoluto e da solução padrão estoque (0,2 mg de procianidina B2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) por mL preparada em metanol aquoso 50% em volume) diluída 100, 50, 20, 12,5, 10, 8,3 e 6,7 vezes. No momento da análise, foram adicionados em cada tubo 2,5 mL da solução reagente de DMAC (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) (0,001 g/mL em etanol absoluto acidificado com 10% v/v de HCl concentrado). O tubo foi rapidamente agitado e imediatamente foi acompanhada a leitura da absorbância a 640 nm durante 5 minutos com intervalos de 10 segundos, em espectrofotômetro modelo DR 2800 (HACH, Loveland, Estados Unidos). Foi anotada a absorbância máxima atingida durante a reação. O branco, utilizado para zerar o

espectrofotômetro foi composto de 0,5 mL de etanol absoluto e 2,5 mL da solução reagente de DMAC. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de procianidina B2/g de extrato líquido.

3.4 Cinética de extração

3.4.1 Modelo cinético

Os dados experimentais dos teores totais de proantocianidinas, extraídos no decorrer do tempo, foram descritos pelo modelo cinético (Equação 1), para extração em batelada, proposto por Perez, Carelli e Crapiste, (2011), que é uma modificação da Lei de Fick da difusão em estado não estacionário, aplicado em partículas com formato esférico suspensas em meio homogêneo com uma concentração constante e sem restrição de volume.

$$\frac{C_t}{C_\infty} = 1 - A \cdot \exp(-B_1 t) \quad (1)$$

Onde:

C_t = concentração de proantocianidinas no extrato em qualquer tempo t durante o processo de extração, mg equivalentes de procianidina B2/g de extrato líquido;

C_∞ = concentração final de proantocianidinas no equilíbrio, mg equivalentes de procianidina B2/g de extrato líquido;

t = tempo de difusão em segundos.

A e B_1 são coeficientes do modelo, onde para uma geometria esférica do sólido, podem ser expressos como:

$$A = \left(1 - \frac{C_0}{C_\infty}\right) \cdot \frac{6}{\pi^2} \cdot \exp(B_1 t_0) \quad (2)$$

$$B_1 = \frac{De \cdot \pi^2}{R^2} \quad (3)$$

O parâmetro B_l é de especial interesse, pois permite o cálculo do coeficiente de difusividade efetiva (De), baseado no raio R da partícula de sólido.

Os parâmetros cinéticos foram estimados através do ajuste do modelo aos dados experimentais. O ajuste não linear de Marquardt foi utilizado para o cálculo da estimativa dos parâmetros ao nível de 95% de significância. Todos os cálculos foram realizados utilizando o pacote estatístico SAS (versão 9.2., SAS Institute Inc., Cary, NC, Estados Unidos). A qualidade de ajuste do modelo foi avaliada através do coeficiente de determinação (R^2) e do desvio relativo médio (DR) através da Equação 4.

$$DR = \frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \left| \frac{V_{exp\ i} - V_{calc\ i}}{V_{exp\ i}} \right| \quad (4)$$

Onde n é o número de observações $V_{exp\ i}$ é cada valor da concentração de proantocianidinas observado experimentalmente e $V_{calc\ i}$ é cada valor da concentração de proantocianidinas predito pelo modelo ajustado.

3.5 Análise do extrato bruto por CLAE-DAD

As condições da cromatografia líquida descritas por Shan et al. (2007) foram usadas com algumas modificações no que se refere ao gradiente da fase móvel e tempo total de corrida, para obter o perfil químico do extrato da canela selecionado na etapa anterior. O extrato foi analisado por meio de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, modelo Prominence, Kyoto, Japão) com detector de arranjos diodos e coluna analítica em fase reversa (Shim-Pack VO ODS, 250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m). A fase móvel, com fluxo de 1 mL/min, foi composta de água com ácido fórmico a pH 3,0 (A) e Acetonitrila LC-MS (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) (B), com gradiente em B feito da seguinte forma: início em 5%, de 0-30 min (rampa até 30%), de 30-40 min

(30%), de 40-45 min (60%), de 45-50 min (100%), de 50-60 min (5%). O forno da coluna foi mantido a 35 °C com injeção de 10 µl da amostra. Os cromatogramas foram adquiridos em 280 nm e os dados coletados no software LC Solution, versão 1.21.

As principais frações do extrato, ou seja, aquelas que apresentaram os maiores picos nos cromatogramas foram coletadas no coletor de frações (Shimadzu, FRC 10-A).

3.6 Análise das frações por espectrometria de massas ESI-MS/MS

As frações do extrato de canela obtidas como descrito no item 3.5 foram injetadas diretamente por infusão (10 µL/min) em espectrômetro de massas, modelo Waters Xevo® TQ-S (Waters, Milford, MA, Estados Unidos). A fase móvel de infusão foi composta por 50% acetonitrila e 50% ácido fórmico aquoso (0,01%) e o fluxo foi mantido em 0,5 mL/min. O espectrômetro de massas foi operado usando ionização de eletrospray nos modos positivo e negativo, com uma voltagem de capilar de 3,0 KV, temperatura da fonte de 150 °C e temperatura de dessolvatação de 500 °C. Os fluxos do gás de dessolvatação e do gás de cone foram mantidos a 800 L/h e 150 L/h, respectivamente. A energia de colisão foi otimizada entre 10 e 30 V. Os espectros de massa foram adquiridos no modo de varredura de íons produzidos de m/z 100 a 2000. A coleta e o processamento de dados foram realizados utilizando o software MassLynx versão 4.1.

Os compostos presentes nas frações coletadas a partir do extrato de canela foram identificados por comparação com os padrões externos: epicatequina, ácido *trans*-cinâmico, cumarina e *trans*-cinamaldeído (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos). Além disso, os respectivos íons moleculares e os principais fragmentos obtidos na análise por espectrometria de massas foram comparados com os dados disponíveis na literatura.

3.7 Capacidade antioxidante das frações obtidas do extrato de canela

3.7.1 Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (*Fenólicos totais*)

A capacidade de redução do reagente de Folin-Ciocalteu das frações do extrato foi medida pelo método sugerido por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999) com modificações nos volumes dos reagentes e no comprimento de onda de leitura. Em tubos de vidro com rosca, uma alíquota de 250 μL de cada fração coletada no cromatógrafo, sem diluição, foi misturada com 250 μL do reagente de Folin-Ciocalteu (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, Brasil) e 2 mL de água destilada. Após 3 min à temperatura ambiente, foi adicionado 250 μL de uma solução de carbonato de sódio saturada (30 g/100 mL) e a mistura foi mantida a 37°C em banho maria por 30 min. A absorbância foi medida a 750 nm usando um espectrofotômetro (model DR 2800 HACH, Loveland, USA). Foi utilizado ácido gálico como padrão de referência e os resultados foram expressos em μg equivalente de ácido gálico/mL da fração.

3.7.2 Capacidade de sequestro do radical DPPH

A capacidade de sequestro do DPPH[•] (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila) foi verificada de acordo com Brand-Williams, Cuvelier and Berset (1995), com modificação no volume total de reação onde houve adaptação para uma leitora de microplacas. Inicialmente, alíquotas de 50 μL das frações coletadas no cromatógrafo, sem diluição, ou da solução estoque padrão (Trolox 0,25 mg/mL ~ 1000 $\mu\text{mol/L}$) nas concentrações de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 $\mu\text{mol/L}$, foram misturados em microplaca de 96 poços com 250 μL de uma solução metanólica de DPPH[•] (0.5 mmol/L). A mistura foi agitada e após 25 minutos a 25°C a absorbância foi medida a 517 nm usando um Espectrofotômetro de microplaca (Benchmark Plus, Biorad, Hercules, CA, USA). A capacidade sequestrante de radicais DPPH foi expressa como μmol equivalentes de Trolox/mL da fração.

3.7.3 Capacidade redutora do ferro (FRAP)

Esse ensaio foi realizado de acordo com Benzie e Strain (1996). Foram utilizados 20 µL das frações do extrato de canela coletadas no cromatógrafo, sem diluição, além do mesmo volume de uma solução estoque padrão de Trolox (0,25 mg/mL ~ 1000 µmol/L) nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 400 µmol/L. A absorbância foi medida a 593 nm usando um Espectrofotômetro de microplaca (Benchmark Plus, Biorad, Hercules, CA, USA) e os resultados foram expressos como µmol equivalentes de Trolox/mL da fração.

3.8 Obtenção do extrato seco de canela

Com o objetivo de concentrar o conteúdo de proantocianidinas no extrato da canela do Ceilão, além de se obter um material mais estável e de fácil manipulação e estocagem, o extrato etanólico obtido nas condições otimizadas como descrito no item 3.2.3 foi seco por dois métodos: *spray drying* e liofilização.

3.8.1 Secagem do extrato por *spray drying*

O extrato etanólico obtido foi filtrado em tecido de algodão, para separação das partículas grosseiras de canela em pó e centrifugado durante 5 min, a 25 °C e 6603 g em uma centrífuga modelo 5430 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) para separação de partículas finas da canela. O sobrenadante foi então desidratado por atomização em *spray dryer* modelo MSD 1.0 (Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, Brasil), utilizada temperatura do ar na entrada de 150 °C com velocidade do ar de secagem de 2,5 m/s, vazão de alimentação de 16 mL/min garantida através de bomba peristáltica modelo Labmaq OS-1 (Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, Brasil). Foi utilizado o bico atomizador duplo fluido de 1,2 mm e fluxo de ar

comprimido de 40 L/min. O pó obtido foi armazenado em frasco de polietileno recoberto com papel alumínio e estocado em freezer à temperatura de -20 °C até o momento do uso.

3.8.2 *Secagem do extrato por liofilização*

O extrato etanólico obtido foi filtrado em tecido de algodão, para separação das partículas grosseiras de canela em pó e centrifugado durante 5 min, a 25 °C e 6603 g em uma centrífuga modelo 5430 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) para separação de partículas finas da canela. O etanol presente no sobrenadante foi removido através da concentração em rota-evaporador modelo TE-211 (Tecnal, Piracicaba, Brasil), à temperatura de 40 °C até ser reduzido à metade do volume inicial. O extrato concentrado foi congelado a -20°C sendo desidratado em liofilizador modelo LC 1500 (Terroni, São Carlos, Brasil) durante 24 h. A amostra obtida foi armazenada a -20°C em frasco de polietileno recoberto com papel alumínio.

3.9 Propriedades funcionais dos extratos líquidos e secos

3.9.1 *Capacidade antioxidante*

A capacidade redutora do reagente de Folin-Ciocalteu, capacidade de sequestro dos radicais DPPH e a capacidade redutora do ferro (FRAP) foram medidas nos extratos líquidos (etanólico e concentrado) e nos extratos secos por *spray drying* e liofilização da mesma forma como descrito nos itens 3.7.1, 3.7.2 e 3.7.3, respectivamente. Os extratos foram diluídos em etanol aquoso 50% da seguinte forma: extratos líquidos (aproximadamente 0,25 g em 100 mL de etanol); extrato atomizado (aproximadamente 0,1 g em 10 mL de etanol e desses 0,125 mL em 50 mL de etanol) e o extrato liofilizado foi diluído da mesma forma que o atomizado. Os resultados foram expressos por grama de extrato em base seca.

3.9.2 *Atividade inibidora da α -amilase*

A capacidade dos extratos da canela do Ceilão em inibir a enzima α -amilase foi avaliada de acordo com o método cromogênico modificado do Whorthington Enzyme Manual (WHORTHINGTON BIOCHEMICAL CORP., 1993). Alíquotas dos extratos previamente diluídos foram adicionadas em tubos de ensaio nos volumes de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 μ L, sendo o volume de cada tubo completado para 250 μ L com tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,9 contendo 0,006 M de NaCl. Em cada tubo foram adicionados 250 μ L da solução (1 U/mL) da enzima α -amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1, tipo VI-A, Sigma Chemical Co., Saint Louis, Estados Unidos) e foram incubadas a 25 °C durante 10 min. Em seguida foram adicionados 250 μ L da solução de amido de batata (1%) pipetada sob agitação. Novamente os tubos foram incubados a 25 °C durante 10 min. A reação foi paralisada pela adição de 250 μ L de uma solução de ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS). Então, os tubos foram levados ao banho de ebulição a 100 °C durante 10 min e em seguida resfriados até a temperatura ambiente em banho de gelo. Foram adicionados 4 mL de água destilada em cada tubo e em seguida a absorbância foi lida a 540 nm em espectrofotômetro modelo U-1100 (Hitachi, Japão). Foi preparado um tubo para zerar o espectrofotômetro contendo 500 μ L do tampão fosfato e 250 μ L da solução de amido (branco amido). Também foram preparados tubos controle, em triplicata, contendo 250 μ L de tampão fosfato, 250 μ L da enzima e 250 μ L da solução de amido. Além disso, tubos contendo 250 μ L das amostras diluídas, 250 μ L de tampão fosfato e 250 μ L da solução de amido (branco amostra), também foram utilizados. Todos esses tubos foram submetidas ao mesmo procedimento descrito. A porcentagem de inibição da enzima para cada concentração de amostra foi calculada de acordo com a Equação 5 e os resultados foram expressos em concentração de amostra (μ g de extrato b.s/mL de reação) necessária para inibir 50% da atividade da enzima (IC 50).

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{(Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco amostra}))}{Abs_{controle}} \right) \times 100 \quad (5)$$

3.9.3 Atividade inibidora da α -glicosidase

A inibição da enzima α -glicosidase pelos extratos da canela foi medida de acordo com o método proposto por McCue, Kwon e Shetty (2005). Alíquotas dos extratos previamente diluídos foram adicionadas em microplaca de 96 poços nos volumes de 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 μ L, sendo o volume de cada poço completado para 50 μ L com tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,9. A microplaca foi levada até a leitora modelo Synergy H1 (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, Estados Unidos) onde a reação foi realizada da seguinte forma: Em cada poço contendo as amostras foram adicionados 100 μ L da solução (1 U/mL) de enzima α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.20, Sigma Chemical Co., Saint Louis, Estados Unidos) preparada em tampão fosfato. A placa foi incubada a 25 °C durante 10 min e em seguida foram adicionados 50 μ L da solução do substrato p-nitrofenil- α -glicopiranosídeo (p-NPG, Sigma Chemical Co., Saint Louis, Estados Unidos) a 1,5 mg/mL em tampão fosfato. Foi realizada a 1ª leitura da absorbância (tempo 0) a 405 nm e a placa foi novamente incubada a 25 °C durante 5 min. Em seguida foi realizada a 2ª leitura da absorbância (tempo 5) a 405 nm. Foi preparado controle em triplicata contendo 50 μ L de tampão fosfato no lugar dos extratos diluídos. A porcentagem de inibição da enzima para cada concentração de amostra foi calculada de acordo com a Equação 6 e os resultados foram expressos em concentração de amostra (μ g de extrato b.s/mL de reação) necessária pra inibir 50% da atividade da enzima (IC 50).

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{(Abs_{controle 5min} - Abs_{controle 0min}) - (Abs_{extrato 5min} - Abs_{extrato 0min})}{(Abs_{controle 5min} - Abs_{controle 0min})} \right) \times 100 \quad (6)$$

3.9.4 Atividade antimicrobiana *in vitro*

3.9.4.1 Micro-organismos testados

Para a atividade antimicrobiana *in vitro* foram testadas as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCT 5591 e *Listeria monocytogenes* CCT 7408 e as bactérias Gram-negativas *Salmonella enteritidis* CCT 4475 e *Escherichia coli* CCT 0548. Todas as culturas foram gentilmente doadas pela Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (Campinas, Brasil).

3.9.4.2 Determinação da atividade antimicrobiana

O *screening* da atividade antimicrobiana das amostras foi realizado por meio da técnica de difusão em ágar de acordo com Souza et al (2014), com modificações no inóculo do micro-organismo na placa e na forma de colocar as amostras de extrato. Volumes de 150 microlitros do inóculo padronizado ($1,5 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹) de cada micro-organismo foram transferidos para a superfície do ágar nutriente (Oxoid, Inglaterra) solidificado em placas de Petri de 150 mm e espalhados com alça de drigalski. Alíquotas de 10 µL dos extratos etanólico e concentrado (diretamente) e dos extratos secos por atomização e liofilização (20% em etanol aquoso 50%), em triplicata, foram colocadas na superfície do ágar contendo o micro-organismo inoculado. As placas foram mantidas em repouso por 1 hora à temperatura ambiente para permitir a difusão dos extratos no meio. Como controle negativo, foram utilizados 10 µL de uma solução de etanol aquoso 50% e como controle positivo 10 µL de uma solução de Tetraciclina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos) na concentração de 100 mg.mL⁻¹.

3.9.4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)

Para determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo, de acordo com Souza et al. (2014), em microplacas de 96 poços, com modificações no controle negativo e forma de avaliação do resultado da CIM. As concentrações das amostras do extrato de canela foram obtidas por diluição seriada na própria microplaca, resultando em concentrações variando de 25 mg.mL^{-1} a $0,78 \text{ mg.mL}^{-1}$, após a adição de caldo BHI (Oxoid, Inglaterra) inoculado com cada micro-organismo ($1-2 \times 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$). O volume final para cada poço foi de 200 μL . Os controles foram compostos por: controle positivo (200 μL de BHI acrescido de tetraciclina 0,12% m/v) e controle negativo (200 μL de BHI acrescidos de etanol aquoso 50%). Após incubação a 37 °C por 24 h foram adicionados 30 μL de uma solução de resazurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) a 0,01% m/v em água estéril, a fim de verificar visualmente o crescimento bacteriano. A mudança de coloração de roxo para rosa após 10 min em repouso, indicou que houve crescimento bacteriano. Para determinação da CBM, 5 μL de cada poço, que não apresentou mudança de coloração, foram semeados em placas de Petri contendo ágar nutriente, que foram incubadas a 37°C por 24 h. A CBM foi considerada como a menor concentração na qual não houve desenvolvimento de colônias na superfície do meio de cultura (CABRAL et al. 2009). Os experimentos foram realizados em triplicata para cada amostra.

3.10 Encapsulação do extrato seco por coacervação complexa

As cápsulas contendo o extrato de canela do Ceilão foram obtidas através da técnica de coacervação complexa, como descrito por Nori et al. (2011), com algumas modificações. Inicialmente foram preparadas soluções aquosas dos materiais encapsulantes nas seguintes concentrações: gelatina (GEL - 5 g/100 mL), goma arábica (GA - 5 g/100 mL), goma de

cajueiro (GC - 5 g/100 mL), pectina (PEC - 2,5 g/100 mL), κ -carragena (CARR - 2,5 g/100 mL) e carboximetilcelulose (CMC - 1 g/100 mL). Os pares poliméricos avaliados na encapsulação foram compostos da gelatina e de um dos polissacarídeos citados nas proporções de 1:1 (GEL:GA), 2:1 (GEL:PEC), 1:2,5 (GEL:GC), 4:1 (GEL:CARR), 7:1 (GEL:CMC). As proporções determinadas para os sistemas contendo pectina e carragena foram definidas em ensaios preliminares onde foram avaliadas a formação de precipitado e morfologia do precipitado ao se misturar os polímeros em diferentes proporções (dados não apresentados). Para o sistema com goma Arábica foi utilizada a proporção baseada em trabalhos anteriores do grupo (COMUNIAN et al. 2013; ROCHA-SELMÍ et al. 2013), assim como para a goma de cajueiro (GOMEZ-ESTACA et al. 2016; COMUNIAN et al. 2016). E para o sistema com CMC, foi utilizada a proporção definida por Lv et al. (2012).

Para promover a encapsulação, de forma geral, uma massa do extrato de canela seco no *spray dryer*, obtido como no item 3.8.1, foi dispersa em água destilada (o dobro de volume do total das soluções dos polímeros) usando um Ultra Turrax modelo T25 Digital (IKA, Staufen, Alemanha) a 6000 rpm e 40 °C durante 2 min. A dispersão de gelatina foi adicionada e a rotação foi aumentada para 12000 rpm por mais 2 min. Então foi adicionada a solução do polissacarídeo na respectiva proporção citada acima, em relação à gelatina, agitando por mais 2 min na mesma rotação. O sistema foi então mantido sob agitação magnética a 40 °C onde o pH foi ajustado com uma solução de HCl 1N. Em seguida o sistema foi resfriado até 10 °C em banho de gelo. Nesse ponto, uma alíquota foi imediatamente analisada por microscopia ótica (BEL Photonics, Milão, Itália) e foram coletadas imagens com a câmera acoplada ao microscópio e com auxílio do software BELView (BEL Photonics, Milão, Itália). As cápsulas foram deixadas decantar *overnight* a fim de observar também a separação de fases. Para o sistema contendo o par polimérico gelatina/carragena, as soluções foram mantidas a 60 °C e o procedimento realizado a 50 °C, a fim de manter a solução de carragena líquida.

3.10.1 Determinação do pH de coacervação

Para determinação do pH que deverá ser utilizado na coacervação, as cápsulas foram produzidas como descrito no item 3.10. Foi utilizada a concentração de núcleo de 30% em relação à massa total de polímeros. Para cada um dos sistemas, foram avaliados diferentes faixas de pH na etapa de formação do complexo, como se segue: GEL-GA (de 3,5 a 4,5), GEL-PEC (de 2,6 a 3,5), GEL-GC (de 3,0 a 5,5), GEL-CMC (de 3,5 a 4,6) e GEL-CARR (de 3,9 a 4,6). A morfologia das partículas foi avaliada por microscopia ótica e a separação de fases nos sistemas também foi avaliada.

3.10.2 Determinação da concentração de núcleo

Para determinação da concentração de núcleo (extrato de canela), as cápsulas também foram produzidas como descrito no item 3.10 e o pH do sistema foi sempre ajustado para valor determinado na etapa anterior (item 3.10.1). Para todos os pares poliméricos testados, foram avaliadas as concentrações de núcleo de 25, 30, 35 e 40 % em relação à massa total de polímeros. A morfologia das partículas e a separação de fases nos sistemas foram avaliadas. Além disso, foi feita a quantificação do teor total de proantocianidinas na água de coacervação após a decantação das cápsulas, a fim de determinar o quanto desses compostos não foram encapsulados.

3.10.3 Secagem das micropartículas

Após a definição das condições de encapsulação (pares poliméricos, pH de coacervação e concentração de núcleo) as cápsulas foram novamente produzidas como descrito no item 3.10 e desidratadas. Para isso, o sobrenadante foi retirado após decantação *overnight* e as partículas foram acomodadas em placas de Petri, congeladas a -20 °C e secas

em liofilizador modelo LC 1500 (Terroni, São Carlos, Brasil) durante 24 h. As amostras obtidas foram acondicionadas em sacos de polietileno de alta densidade e armazenadas a -20°C para as análises posteriores.

3.11 Caracterização das partículas

3.11.1 Eficiência e rendimento de encapsulação

Para determinação da eficiência e rendimento de encapsulação, 0,1 g das partículas secas foram pesadas em tubos e foram adicionados 2,5 µL de uma solução de NaOH 0,1 M. Os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex modelo AV-2 (Gehaka, São Paulo, Brasil) até a dissolução do complexo e obtenção de solução homogênea. A solução foi então transferida para balão de 25 mL e o volume foi completado com água destilada. Essa solução final, quando necessário, foi diluída e em seguida foi utilizada para a quantificação de compostos fenólicos totais pelo método de redução do reagente de Folin-Ciocalteu como descrito no item 3.7.1. Para determinação dos compostos fenólicos na superfície das partículas, 0,1 g das amostras foram pesadas em tubos e foram adicionados 5 mL de água destilada. Os tubos foram agitados rapidamente em vórtex e posteriormente centrifugados durante 5 min, 10 °C e 6603 g em centrífuga modelo 5430 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi recolhido em balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água destilada. Essa água de lavagem foi utilizada para quantificar o teor de fenólicos totais, presente na superfície das partículas. A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada baseada na quantidade de fenólicos totais presentes nas partículas descontando o valor presente na superfície e em relação ao total teórico adicionado inicialmente de acordo com a Equação 7. O rendimento de encapsulação (RE) foi obtido pela quantidade total de fenólicos presente nas partículas em relação ao total teórico adicionado inicialmente, de acordo com a Equação 8. Esses parâmetros foram calculados apenas em função do teor total

de fenólicos, pois para a quantificação das proantocianidinas é necessário que o meio seja composto por etanol ou acetona (deve ter o mínimo de água). Nesse caso, não é possível extrair exaustivamente das partículas e sempre restará certa quantidade no pellet após precipitação e centrifugação.

$$EE(\%) = \left(\frac{Fenólicos_{total\ experimental} - Fenólicos_{superfície}}{Fenólicos_{teórico}} \right) \times 100 \quad (7)$$

$$RE(\%) = \left(\frac{Fenólicos_{total\ experimental}}{Fenólicos_{teórico}} \right) \times 100 \quad (8)$$

3.11.2 Teor de umidade

Para essa análise, 0,5 g das partículas dos extratos de canela livre (seco em spray dryer) e encapsulados foram avaliados em triplicata em analisador de umidade modelo MB35 (Ohaus, Switzerland) utilizando radiação infravermelha de fonte de halogênio. Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.11.3 Atividade de água

A atividade de água nas amostras dos extratos de canela livre (seco em spray dryer) e encapsulados foi determinada utilizando-se o equipamento AQUALAB (Decagon Devices, Pullman, WA).

3.11.4 Higroscopicidade

A higroscopicidade nas amostras dos extratos de canela livre (seco em *spray dryer*) e encapsulados, bem como nos materiais encapsulantes separadamente, foi medida de acordo com o procedimento proposto por Cai e Corke (2000) com algumas modificações. Alíquotas

de 0,2 g das amostras foram dispostas em pesa-filtros e posteriormente acondicionadas por uma semana em dessecador contendo solução saturada de NaCl (UR de 75,3%). A higroscopicidade foi medida através da massa de água absorvida pela amostra e expressa em gramas de água absorvida/100 gramas da matéria seca.

3.11.5 Solubilidade

A determinação da solubilidade foi realizada pelo método gravimétrico, de acordo com Eastman e Moore (1984). O método consistiu na adição de 0,50 g das amostras dos extratos de canela livre (seco em *spray dryer*) e encapsulados, em um erlenmeyer contendo 50 mL de água destilada. Para a homogeneização, foi utilizada a mesa agitadora orbital tipo shaker (modelo TE-420, TECNAL, Piracicaba, Brasil) a 100 rpm por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada a 1057 g por 5 minutos. Posteriormente, uma alíquota de 25 mL do sobrenadante foi retirada e colocada em cápsulas de porcelana que foram levadas à estufa a 105°C, até peso constante. A solubilidade foi calculada pela diferença de peso e o resultado foi expresso em porcentagem.

3.11.6 Morfologia

A morfologia das partículas foi avaliada através da análise em microscopia ótica utilizando microscópio óptico (BEL Photonics, Milão, Itália) e foram coletadas imagens com a câmera fotográfica acoplada ao equipamento e como auxílio do software BELView (BEL Photonics, Milão, Itália). Foram coletadas imagens, com aumento de 40 e 100 vezes, das partículas úmidas, recém produzidas.

As partículas desidratadas, tanto do extrato livre quanto das amostras encapsuladas, foram avaliadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em microscópio eletrônico modelo Tabletop Microscope TM 3000 (Hitachi, Tóquio, Japão). As amostras

foram fixadas em suportes metálicos (*stubs*), com fita adesiva de dupla face condutora convencional e esse sistema foi levado ao microscópio. Foi utilizada a tensão de aceleração dos elétrons de 15 KV e as imagens foram adquiridas com aumento de 1000 vezes utilizando-se o software TM 3000.

3.11.7 Tamanho médio e distribuição do tamanho de partículas

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho das partículas do extrato de canela seco em *spray dryer* (extrato livre) foi obtido através da análise por difração a laser em equipamento modelo SALD / 201V (Shimadzu, Kyoto, Japão) com faixa de medição entre 0,5 a 500 micrômetros. Para essa análise, pequena quantidade dessa amostra foi dispersa em vaselina líquida obtendo-se uma suspensão, sendo submetida a 4 leituras. Foi obtido o diâmetro 3, 4 conhecido como diâmetro de Brouckere.

Para as micropartículas de extrato de canela encapsulado, a obtenção do diâmetro médio e distribuição do tamanho de partículas foi possível através da análise de imagens utilizando o Software ImageJ, seguindo a metodologia proposta por Marcomini e Souza (2011). Foram utilizadas, para cada amostra, 10 imagens obtidas por microscopia óptica como descrito no item 3.11.6 e para essas partículas foi obtido o diâmetro médio de Feret que se trata da distância entre duas retas paralelas que tangenciam a partícula e exclui as partículas que se encontram na borda da imagem. O diâmetro de Feret é uma medida utilizada para caracterizar objetos com formato irregular.

3.12 Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram adquiridos para as amostras do extrato de canela atomizado, para os polímeros utilizados como material de parede bem como para as micropartículas contendo o extrato encapsulado. Essa análise foi realizada em equipamento

FT-IR Spectrometer (Perkin Elmer, Massachusetts, Estados Unidos) com o auxílio do software Spectrum One versão 5.3.1. Os espectros foram obtidos na região de 4000 a 600 cm^{-1} e cada espectro foi resultado de 16 leituras.

3.13 Estabilidade das cápsulas sob condições de stress

Para verificar alterações na morfologia das partículas frente a condições de stress do meio foi utilizado o método proposto por Comunian et al. (2016), onde cerca de 0,1 g das micropartículas secas foram colocadas em contato com meios aquosos em diferentes condições, a saber: variação de pH (soluções tampão com pH's de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8); variação de temperatura (congelamento/descongelamento, meio aquoso a 10, 25, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C); variação na concentração de sal (solução de cloreto de sódio a 1, 3 e 5% m/v); variação na concentração de açúcar (solução de sacarose a 1, 10 e 20% m/v). As amostras foram mantidas em contato com cada meio durante 5 min sob agitação magnética e foram coletadas alíquotas do meio após o contato para a análise da morfologia das partículas através de microscopia ótica utilizando microscópio óptico (BEL Photonics, Milão, Itália). Controles para cada amostra foram feitos através da agitação durante 5 min em água destilada à temperatura ambiente.

3.14 Estabilidade das micropartículas durante a estocagem

3.14.1 Extração dos compostos

Foi necessário romper as micropartículas para extrair os compostos da canela que foram encapsulados e quantificá-los durante a análise de estabilidade na estocagem. Para isso, cerca de 0,1 g de cada partícula foi pesado em tubos e foram adicionados 2,5 mL de uma solução de NaOH 0,1 M. A mistura foi agitada vigorosamente em vórtex modelo AV-2 (Gehaka, São Paulo, Brasil) até a dissolução do complexo e obtenção de solução homogênea.

Foram adicionados 5 mL de acetona (PA) acidificada com 5% de ácido acético, sob agitação lenta em vórtex. Em seguida, os tubos foram centrifugados durante 5 min, 10 °C e 6603 g em centrífuga modelo 5430 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e o sobrenadante foi transferido para balão de 25 mL. A operação foi repetida novamente com o pellet, os sobrenadantes foram combinados e o volume do balão foi completado com acetona acidificada. Esse extrato obtido foi utilizado para a análise do teor total de proantocianidinas e fenólicos como descrito nos itens 3.3 e 3.7.1, respectivamente.

3.14.2 Estabilidade das proantocianidinas e compostos fenólicos

As amostras das micropartículas foram estocadas como sugerido por Tonon, Brabet e Hubinger (2010). Cerca de 0,2 g de cada amostra seca foi armazenada em frascos de vidro e esses foram colocados em dessecadores contendo solução saturada de cloreto de magnésio $MgCl_2$ (UR de 32,8%). Os dessecadores foram armazenados em estufas nas temperaturas de 25 e 37 °C. O período total de armazenamento foi de 120 dias nas condições especificadas e as amostras foram avaliadas a cada 15 dias com relação ao teor de proantocianidinas totais e fenólicos totais.

3.15 Liberação dos compostos encapsulados

Foi avaliado o perfil de liberação das proantocianidinas e compostos fenólicos totais em fluidos gástrico e intestinal simulados como descrito por Gbassi et al. (2009) e Wang et al. (2015), com modificações. Foram adicionados 0,1 g de cada micropartícula em 100 mL do fluido gástrico simulado (NaCl – 9 g/l, pepsina (806,3 U/mg) – 3 g/l, pH 1,8) e incubado sob agitação magnética a 37 °C. Da mesma forma, 0,1 g de cada micropartícula foi adicionada em 100 mL do fluido intestinal simulado (NaCl – 9 g/l, pancreatina (8 x unidades U.S.P – 10 g/l, tripsina – 10 g/l, sais biliares – 3 g/l, pH 6,8) e também incubado a 37 °C sob agitação

magnética. Foram retiradas alíquotas de 1 mL em intervalos de tempo de 0,2, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 min. As alíquotas foram centrifugadas durante 5 minutos, a 4 °C e 6603 g. O sobrenadante foi diluído com etanol absoluto e a solução foi utilizada para quantificação do teor de proantocianidinas e compostos fenólicos totais, como descrito nas seções 3.3 e 3.7.1. Foram realizadas triplicatas independentes para cada amostra.

3.16 Aplicação das partículas em sorvete

Foram aplicadas as amostras das micropartículas contendo extrato de canela encapsulado com os pares gelatina/goma arábica e gelatina/ κ -carragena. Nessa etapa, as partículas foram produzidas utilizando-se solução aquosa de ácido fosfórico a 1% em volume, para ajustar o pH. A escolha dessas amostras foi baseada nos resultados das etapas anteriores. Como controle, o extrato de canela seco no *spray dryer* não encapsulado, também foi aplicado.

Foi elaborado um sorvete artesanal sabor creme utilizando o processo descrito no fluxograma da Figura 9. Esse produto foi utilizado como sistema modelo para veicular o extrato de canela possibilitando avaliar se o processo de encapsulação foi capaz de mascarar as características sensoriais indesejáveis do extrato, como o gosto intenso e a sensação de adstringência.

A formulação básica utilizada para o sorvete foi a seguinte: para 1 litro de leite UHT (marca Paulista, Amparo, Brasil) foram adicionados 100 g de leite em pó (Nestlé, Ituiutaba, Brasil), 250 g de açúcar refinado (Caravelas, Ariranha, Brasil), 120 g de creme de leite (Nestlé, Araçatuba, Brasil), 10 g de base neutra para gelados comestíveis (Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil), 10 g de emulsificante e estabilizante neutro para sorvete (Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil) e 20 g de sabor e cor para sorvetes creme (Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil). Para o sorvete com o extrato de canela livre, foram adicionados 1,5 g do extrato

para cada 1 kg de calda; para o sorvete contendo o extrato encapsulado com gelatina/goma arábica foram adicionados 5,5 g das partículas para cada 1 kg de calda e para o sorvete contendo o extrato encapsulado com gelatina/κ-carragena foram adicionados 4,0 g de partículas para cada 1 kg de calda. As quantidades de extrato de canela nas três amostras de sorvete foram equivalentes e determinadas baseadas na quantidade de proantocianidinas presente em 1 g de canela em pó para uma porção de 60 g de sorvete (1 bola), porção determinada pela legislação (BRASIL, 2003). Segundo Khan et al. (2003) a ingestão diária de 1 g de canela em pó poderia trazer benefícios à saúde de pessoas com diabetes tipo-2.

Figura 9 – Fluxograma para a produção do sorvete de creme contendo extrato de canela livre e encapsulado.

Fonte: Própria autoria.

A composição da base neutra, do emulsificante/estabilizante e do saborizante/corante é descrita a seguir: base neutra para sorvete: açúcar, espessantes (goma guar e carboximetilcelulose). Emulsificante e estabilizante neutro para sorvete: monoglicerídeos de ácidos graxos, monoestearato de sorbitana, ésteres de ácidos graxos com glicerol, polioxietileno de monoestearato de sorbitana e conservador sorbato de potássio. Saborizante e corante para sorvetes: açúcar, amido de milho, aromatizante artificial, corantes artificiais: amarelo tartrazina (INS 102) e amarelo crepúsculo (INS 110).

Tendo como base 1 litro de leite, os demais ingredientes foram pesados, reservando-se o emulsificante/estabilizante e o extrato de canela ou partículas de extrato encapsulado. Em liquidificador modelo CMF 338/204 (Cemaf, Itajobi, Brasil) foram misturados o leite e os outros ingredientes, com exceção dos que foram reservados. A mistura foi realizada durante 3 minutos obtendo-se a calda. Essa calda foi pré-congelada em freezer a -20 °C durante 4 horas. Após esse período a calda foi pesada e foram adicionados o emulsificante/estabilizante e o extrato da canela ou partículas do extrato encapsulado. A mistura foi batida em batedeira planetária modelo BPA (Arno, São Paulo, Brasil) durante 5 minutos. A massa obtida foi acondicionada em potes de polipropileno e congelada em freezer a -20 °C, obtendo-se as amostras de sorvete.

3.17 Avaliação sensorial

Por se tratar de pesquisa com seres humanos, o projeto foi submetido para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, tendo sido aprovado em 14/04/2016 (CAAE: 54847116.1.0000.5422). O parecer do Comitê encontra-se disponível no Anexo A. Foram realizados os seguintes testes sensoriais: teste discriminativo de ordenação visando recrutar provadores, também foi realizado o teste discriminativo de comparação-pareada visando comprovar a real eficiência do processo de

microencapsulação. E também o teste afetivo de aceitação sensorial para avaliar as diferenças de preferência pelo consumidor. Para todos os testes, os provadores assinaram e receberam uma cópia do termo de consentimento livre e esclarecido, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e encontra-se apresentado no Apêndice E.

3.17.1 Recrutamento e seleção dos provadores

O recrutamento foi realizado entre alunos e funcionários da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos do campus de Pirassununga, que demonstraram interesse e disposição em participar do projeto.

A seleção dos provadores foi realizada com base no teste de ordenação segundo Ferreira et al. (2000). Foram apresentadas as amostras aos julgadores, constando do extrato livre, em três diferentes concentrações, misturado aos polímeros de maneira casualizada. Assim o julgador teria que ordenar as amostras de modo crescente em relação ao atributo sabor intenso de canela e sensação de adstringência. As amostras foram servidas em bandejas, dentro de copinhos plásticos de 50 mL. Foram servidos também uma bolacha água e sal e um copo de água, para que os provadores limpassem o palato entre a degustação de cada amostra. A orientação da análise foi direcionada pela utilização da ficha apresentada na Figura D1 do Apêndice D.

3.17.2 Teste de comparação pareada (provadores selecionados)

Visando provar a eficiência do processo de microencapsulação em mascarar ou atenuar o sabor intenso e a adstringência do extrato de canela, foi realizado o teste de comparação pareada-diferença (bicaudal), segundo Ferreira et al. (2000). Neste teste foram comparadas a amostra contendo extrato de canela puro, misturado mecanicamente com os polímeros, com a amostra microencapsulada de mesmo material polimérico e proporção. Os provadores tiveram

que indicar entre as amostras apresentadas, àquela que causava maior sensação de adstringência e também a que apresentava sabor mais forte de canela. As amostras foram servidas nas mesmas condições descritas no item 3.17.1, utilizando-se as fichas apresentadas nas Figuras D2 a e b do Apêndice D. Após as amostras de extrato livre e encapsulado terem sido aplicadas no sorvete, foi realizado teste semelhante onde avaliou-se a capacidade dos provadores selecionados em indicar entre as amostras de sorvete contendo o extrato livre e as partículas do extrato encapsulado, àquela que apresentava sabor mais forte de canela. A ficha para esse teste é apresentada na Figura D3 do Apêndice D.

3.17.3 Teste de aceitação do sorvete

Foram realizados também testes afetivos de aceitação sensorial para avaliar as diferenças de preferência pelo consumidor. Foram testadas as amostras do sorvete de creme com o extrato de canela livre e também as amostras contendo o extrato encapsulado. Os testes foram realizados no Laboratório de Análise Sensorial da FZEA/USP – Campus de Pirassununga em cabines individuais com luz fluorescente branca, de acordo com a metodologia descrita por Meilgaard, Civille e Carr (1999). Foi utilizada a escala de hedônica de 9 pontos (1 – “desgostei muitíssimo” a 9 – “gostei muitíssimo”) para os atributos de sabor, textura, cor, aroma e aceitabilidade geral. Também foi avaliada a intenção de compra dos provadores em relação ao sorvete. Para isso, foi utilizada a escala hedônica de 5 pontos (1 – “certamente compraria” a 5 – “certamente não compraria”). Seguindo o que foi proposto por Hough et al (2006), o teste foi realizado com pelo menos 112 provadores não treinados, de ambos os sexos. As amostras foram apresentadas monadicamente, em copos codificados e de forma aleatória. O modelo da ficha que foi utilizada é apresentado na Figura D4 do Apêndice D.

3.18 Análise estatística

Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey, considerando que houve diferença significativa entre as amostras quando $p < 0,05$. Essas análises foram realizadas para verificar diferença estatística entre as amostras nas análises de capacidade antioxidante e anti-diabetes dos extratos, na caracterização das micropartículas, na análise de estabilidade e na análise sensorial. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando-se o pacote estatístico SAS (versão 9.2., SAS Institute Inc., Cary, NC, Estados Unidos).

4 Resultados e discussão

4.1 Cinética de extração

Os dados experimentais para a cinética de extração das proantocianidinas da canela, utilizando etanol 50% e diferentes condições de temperatura e razões sólido:solvente, estão apresentados na Figura 10.

É possível observar que em todos os casos a extração obedece a duas etapas. No início ocorre o mecanismo de lavagem onde as proantocianidinas presentes na superfície das partículas de canela são rapidamente solubilizadas pelo solvente. Esta etapa ocorreu nos primeiros minutos da extração e foi responsável, em todos os tratamentos, pelo maior rendimento da extração de proantocianidinas nos extratos. Por exemplo, para a amostra onde a extração foi realizada a 60 °C e razão sólido:solvente de 1:7,5, em apenas dois minutos de extração a concentração de proantocianidinas no extrato passou a 3,59 mg equivalente de procianidina B2/g de extrato o que corresponde a 66% do total das proantocianidinas extraídas nessa condição. O outro estágio ocorre logo após a etapa de lavagem, onde a razão de extração diminui consideravelmente, predominando o mecanismo de difusão. Esse comportamento para extração de compostos fenólicos a partir de uma matriz vegetal também foi observado por Herodez et al. (2003) para folhas de *Melissa officinalis* e por Bucic-Kojic et al. (2013) para sementes de uva, além de inúmeros trabalhos que estudaram a extração de óleos vegetais (MEZIANE; KADI, 2008; AMARANTE et al. 2014; KOSTIC et al. 2014; TODA; SAWADA; RODRIGUES et al. 2016).

Figura 10 – Dados experimentais para a concentração de proantocianidinas totais nos extratos da canela, obtidos com etanol 50% em diferentes condições de temperatura e razão sólido:solvente. ■, $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e 1:10; □, $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e 1:7,5; ▲, $40,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e 1:10; △, $40,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e 1:7,5; ●, $60,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e 1:10; ○, $60,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e 1:7,5.

Fonte: Própria autoria.

4.2 Efeito da temperatura e da razão sólido:solvente

Existem na literatura alguns modelos matemáticos que descrevem o processo de extração sólido-líquido para diferentes compostos. O modelo proposto por Perez et al. (2011), escolhido no presente trabalho, apresentou bom ajuste aos dados experimentais como pode ser comprovado pelos altos valores de R^2 ($0,9990 \leq R^2 \leq 0,9998$) e desvios médios relativos inferiores a 10% ($1,05 \leq DR \leq 2,57$), apresentados na Tabela 3. Para o ajuste dos dados foi considerado que a etapa de lavagem ocorreu até 240 segundos de contato entre o sólido e o solvente, onde foi obtido rendimento de extração de proantocianidinas entre 73 e 79%.

Com o aumento da temperatura houve aumento na concentração de proantocianidinas no extrato como pode ser visto na Figura 10. Houve também o aumento na razão de proantocianidinas extraídas no decorrer do tempo (Figura 11a). Maiores temperaturas levam a uma maior solubilização dos solutos no solvente, além de diminuir a viscosidade do solvente,

o que também contribui para aumentar a extração dos compostos de interesse. Esse comportamento também foi observado por Bucic-Kojic et al. (2013) para extração de compostos fenólicos extraídos de semente de uva com etanol 50%.

Em diferentes razões sólido:solvente, independente da temperatura de extração, o rendimento de proantocianidinas no extrato é diretamente proporcional a essa razão (Figura 10). Esse resultado era esperado, tendo em vista que menor quantidade de solvente em uma mesma massa de sólidos produzirá extrato mais concentrado nos compostos de interesse. A razão sólido:solvente maior, também aumenta levemente a razão dos compostos extraídos no decorrer do tempo, como pode ser visto na Figura 11b. Esse comportamento descrito acima, fica melhor evidenciado pelos valores do coeficiente de difusividade efetiva, apresentados na Tabela 3. Observa-se aumento nos valores desses coeficientes com o aumento da temperatura e com o aumento na razão sólido:solvente.

Os valores calculados para os coeficientes de difusividade efetiva na extração das proantocianidinas da canela variaram de $4,56 \times 10^{-12}$ a $8,31 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. Diferentes autores reportam difusividades com diferentes ordens de grandeza para compostos fenólicos. Mantell, Rodríguez e Ossa (2002), apresentam valores da ordem de $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ para a extração de antocianinas em bagaço de uvas tintas utilizando metanol como solvente em diferentes temperaturas. Guerrero, Torrez e Nuñez (2008) encontraram difusividades da ordem de $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ para extração de ácido gálico, catequina e procianidina B1 em bagaço de uvas brancas, utilizando água e etanol em diferentes temperaturas. Não há na literatura dados de difusividade para compostos fenólicos em canela. No entanto, os valores encontrados no presente trabalho estão de acordo com Tao, Zhang e Sun (2014) que apresentaram valores na mesma ordem de grandeza ($10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$) para a extração de compostos fenólicos em bagaço de uva utilizando etanol 50% e ultrassom. Essa variação entre os diferentes trabalhos pode estar relacionada com a grande complexidade dos compostos fenólicos. Essa classe de compostos

compreende um número grande e com diferentes tipos de moléculas o que pode implicar em comportamentos diferentes de solubilidade e difusividade nas diferentes condições de extração.

Figura 11 – Cinética de extração das proantocianidinas. **(a)**: Dados experimentais obtidos com razão sólido:solvente de 1:7,5 e diferentes temperaturas: ■, $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; ●, $40,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; ▲, $60,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. E dados calculados pelo modelo de Perez et al. (2011): —, $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; ····, $40,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; - - - - , $60,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. **(b)**: Resultados experimentais obtidos a $60,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e diferentes razões sólido:solvente: ■, 1:10; ▲, 1:7,5. Dados calculados segundo Perez et al. (2011): —, 1:10; - - - - , 1:7,5.

Fonte: Própria autoria.

Baseando-se nos resultados discutidos acima foram definidas as melhores condições de extração para as proantocianidinas da canela do Ceilão utilizando etanol 50% p/p. Temperatura de extração de 60 °C e razão sólido:solvente de 1:7,5, por proporcionarem maior difusividade dos compostos. Nessas condições, o tempo de extração de 30 min garantiu a extração de 99 % dos compostos. Sendo assim, esse tempo é indicado para garantir que o equilíbrio seja atingido. Além disso, o sistema deverá ser mantido sob agitação constante durante todo o período de extração.

O extrato obtido com essas condições otimizadas foi caracterizado quanto ao seu perfil químico através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As principais frações presentes no extrato foram separadas e coletadas sendo então analisadas por meio de espectrômetro de massas (MS/MS) na tentativa de identificação dos principais compostos presentes, em especial as proantocianidinas.

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos calculados pelo modelo de Perez et al. (2011) e coeficientes de difusividade, para a extração de proantocianidinas da canela utilizando etanol e diferentes condições de temperatura e razão sólido: solvente.

Tratamento	Temperatura (°C)	Razão sólido:solvente	Coeficiente A		Coeficiente B ₁ x 10 ³		De (m ² /s) x 10 ¹²	R ²	DR (%)
			Valor estimado	CV	Valor estimado	CV			
1	25,0 ± 0,1	1:10	1,132	5,04	1,02	7,65	4,56	0,9996	1,61
2	25,0 ± 0,1	1:7,5	1,135	3,21	1,13	4,87	5,05	0,9998	1,05
3	40,0 ± 0,1	1:10	1,107	7,28	1,07	11,03	4,78	0,9992	2,27
4	40,0 ± 0,1	1:7,5	1,349	7,12	1,26	10,48	5,63	0,9994	2,09
5	60,0 ± 0,1	1:10	1,443	10,34	1,77	14,46	7,91	0,9990	2,57
6	60,0 ± 0,1	1:7,5	1,615	6,27	1,86	8,33	8,31	0,9996	1,77

A e B₁ são os coeficientes cinéticos estimados; CV é o coeficiente de variação; De é a difusividade efetiva que depende do parâmetro B₁; R² é o coeficiente de determinação e DR é o módulo do desvio relativo médio calculado de acordo com a Equação 4.

Fonte: Própria autoria.

4.3 Análise por CLAE do extrato de canela obtido através das condições otimizadas

Embora a identificação das proantocianidinas da canela já tenha sido abordada antes (GU et al. 2003; MATEOS-MARTÍN et al. 2012a), o foco nos componentes principais do extrato etanólico dessa variedade de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) foi pouco relatado. (WILLIAMS et al. 2015).

O extrato de canela produzido utilizando as condições que apresentaram os melhores resultados na etapa anterior foi analisado em CLAE e o seu perfil químico obtido por cromatografia líquida é apresentado na Figura 12. Foram coletadas as 6 principais frações desse extrato, correspondentes aos picos enumerados de 1 a 6 e essas frações foram analisadas em espectrômetro de massas (MS/MS).

Figura 12 – Cromatograma do extrato etanólico de canela do Ceilão obtido por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD) em 280 nm.

Fonte: Própria autoria.

Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 4. Com a comparação dos dados obtidos, com padrões externos além de dados disponíveis na literatura, foi possível identificar no extrato de canela do Ceilão, obtido a partir das condições otimizadas, uma mistura de proantocianidinas oligoméricas (grau de polimerização de 2 – 4), ácido cinâmico e cinamaldeído. Esses compostos também foram relatados por Shan et al. (2007), Mateos-Martín et al. (2012a) e Williams et al. (2015), quando estudaram extratos de canela. E também por Pérez-Jiménez e Torres (2012) e Jiang et al. (2015), ao pesquisarem a água de branqueamento de amêndoas e folhas de chá (*Camellia sinensis*), respectivamente.

Dentre as proantocianidinas, todas as que foram identificadas nas frações do extrato de canela, foram do tipo procianidina, ou seja, cujo monômero é a (+)-catequina ou (-)-epicatequina e apresentam pelo menos uma ligação tipo A. As transições obtidas na análise de MS/MS (Tabela 4) confirmam essas afirmações. Nos picos 1 e 3, o sinal apresentado no modo negativo com m/z 575 combina com uma procianidina dímero tipo A, formada por duas moléculas de (+)-catequina ou (-)-epicatequina (290,26 Da) e a ligação tipo A é confirmada pela perda de 4 hidrogênios, diferente da ligação tipo B onde dois hidrogênios são perdidos na formação da ligação interflavan. Além disso, a fragmentação apresenta os íons do monômero $[M - H]^-$ 289 Da e os demais íons são condizentes com os encontrados por Jiang et al. (2014), identificados como sendo de um dímero do tipo (epicatequina-epicatequina). Uma procianidina trímero contendo uma ligação do tipo A e uma do tipo B foi observada nas frações correspondentes aos picos 2 e 3. O sinal de m/z 863 está de acordo com uma molécula contendo três unidades de (+)-catequina ou (-)-epicatequina e há perda de massa de 6 Da decorrentes da formação de uma ligação tipo B (2 hidrogênios) e outra ligação tipo A (4 hidrogênios), entre os monômeros. Além disso, na fragmentação há a presença dos íons $[M - H]^-$ 573 e 289/287 referentes aos dímeros e monômeros respectivamente. Nos picos 1 e 3, também apareceu o sinal correspondente à procianidina tetrâmero contendo uma ligação do

tipo A e duas ligações do tipo B entre os monômeros. O sinal de m/z 1151 no modo negativo está de acordo com esse tipo de molécula onde há a presença de quatro unidades de (+)-catequina ou (-)-epicatequina seguida da perda de massa de 8 Da que é ocasionada pela formação de uma ligação do tipo A (4 hidrogênios) e duas ligações do tipo B (mais 4 hidrogênios). E ainda na fragmentação há a presença dos íons $[M - H]^-$ 863 e 573 correspondendo ao trímero e ao dímero de procianidina respectivamente, devido à perda de monômeros durante a fragmentação. Os íons observados na fragmentação dessa molécula estão de acordo com os encontrados por Mateos-Martín et al. (2012a) também em canela do Ceilão, em uma molécula identificada como tetrâmero de (-)-epicatequina do tipo A. A canela é reconhecida como fonte de proantocianidinas do tipo A, apresentando grande número dessas ligações em comparação com outras fontes como o cacau e a uva (GU et al. 2003, 2004).

O motivo de algumas frações apresentarem mais do que um composto, está ligado ao fato do estudo ter sido realizado com um extrato, logo se trata de uma mistura complexa de compostos. Nos picos 1 e 3, os quais apresentaram mais de um composto, o sinal com maior intensidade (dados não apresentados) corresponde nos dois casos à procianidina dímero tipo A (m/z 575). As procianidinas dímero e tetrâmero foram identificadas nos picos 1 e 3, já o trímero apareceu nos picos 2 e 3. Esse fato pode estar relacionado à presença de isômeros dessas moléculas, porém apenas com os dados das massas e seus fragmentos, disponíveis no presente trabalho, não foi possível diferenciá-los. A procianidina trímero tipo A (pico 2), dentre as proantocianidinas identificadas foi a mais abundante no extrato de canela do Ceilão e dentre todos os compostos identificados foi o segundo mais abundante (Tabela 4). Esse resultado também foi observado por Shan et al. (2007) para o extrato bruto de *Cinnamomum burmannii*.

Tabela 4 - Identificação dos principais compostos presentes no extrato de canela do Ceilão (*Cinnamomum zeylanicum*)

Pico	Tempo de retenção (min)	Substâncias*	[M-H] ⁺ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	Q3 (íons positivos) (m/z)	Q3 (íons negativos) (m/z)	Área do pico (%)
1	14,3	Procianidina dímero tipo A	-	575	-	490, 289, 151, 125	0,68 ± 0,01
		Procianidina tetrâmero tipo A	1153	1151	983, 865, 713, 575, 289	981, 863, 711, 573	
2	20,7	Procianidina trímero tipo A	887 [M + Na] ⁺	863	713, 695, 575, 301, 287	711, 693, 573, 299, 289	1,70 ± 0,01
3	21,4	Procianidina dímero tipo A	-	575	-	499, 289, 151	0,60 ± 0,02
		Procianidina trímero tipo A	865	863	713, 695, 301, 287	711, 573, 299, 287	
		Procianidina tetrâmero tipo A	1175 [M + Na] ⁺	1151	865, 713, 575, 287	981, 863, 573, 299, 289	
4	33,4	Ácido <i>cis</i> -cinâmico	149	147	131, 121, 103, 93, 77, 65	119, 117	0,59 ± 0,01
5	39,5	Ácido <i>trans</i> -cinâmico	149	147	131, 121, 103, 93, 77, 65	119, 117	0,37 ± 0,01
6	44,1	Trans-cinamaldeído	133	ND	115, 105, 103, 91, 79, 77, 65, 55	-	88,8 ± 0,3

* As substâncias correspondentes aos picos 4 e 6 foram positivamente identificadas através da comparação com padrões externos. Além disso, os outros compostos foram aproximadamente identificados através da comparação dos valores dos quadrupolos Q1 e Q3, da análise por espectrometria de massas, com dados disponíveis na literatura.

(-), não detectado.

Fonte: Própria autoria.

A fração correspondente ao pico 5, foi identificada como ácido *trans*-cinâmico $[M - H]^-/[M - H]^+$ 147/149, através da comparação com padrão externo. Já o pico 4, por apresentar padrão de massas e fragmentação idêntico ao do ácido *trans*-cinâmico, conclui-se que se trata do seu isômero ácido *cis*-cinâmico. A presença desses dois isômeros do ácido cinâmico em canela do Ceilão também foi relatada por Williams et al. (2015).

O pico 6, como é claramente observado na Figura 12, e também pela porcentagem da área na Tabela 4, foi o mais abundante no extrato de canela. Essa fração foi identificada como sendo o *trans*-cinamaldeído, através da comparação com padrão externo e também pelo perfil de massas $[M - H]^+$ 133, o qual estava de acordo com a massa do composto (132,16 Da) e fragmentação, cujos íons estavam de acordo com o que foi observado por Daker et al. (2013) para o *trans*-cinamaldeído em *Cinnamomum burmannii*.

Vale ressaltar que apesar de ter sido utilizado o padrão da cumarina para comparação, essa substância não foi identificada em quantidades significativas no extrato da canela do Ceilão, pois não apareceu nas principais frações coletadas. Esse resultado era esperado tendo em vista que essa variedade de canela é conhecida por apresentar quantidades muito pequenas dessa substância (WANG et al. 2013; KUMAR et al. 2014).

Em resumo, no extrato obtido com as condições otimizadas foram identificadas as proantocianidinas do tipo A, o ácido cinâmico e o cinamaldeído. Segundo Anderson et al. (2004) a procianidina trímero tipo A, que foi a principal molécula fenólica identificada no presente trabalho, tem potente atividade anti-diabetes tipo 2. Já o *trans*-cinamaldeído, segundo Shan et al. (2007), é o composto que mais contribui para a atividade antimicrobiana no extrato de canela. Portanto, o extrato obtido apresenta grande potencial como ingrediente funcional.

4.4 Capacidade antioxidante das frações do extrato de canela do Ceilão

Compostos fenólicos são reconhecidos por apresentarem capacidade antioxidante por diferentes mecanismos, tais como sequestro de radicais, poder redutor, entre outros (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Na Figura 13 estão apresentados os resultados para a capacidade antioxidante para as frações coletadas e identificadas do extrato de canela.

A frações 1 a 3 identificadas como proantocianidinas apresentam as maiores capacidades de redução do reagente de Folin-Ciocalteu (fenólicos totais), como já era esperado tendo em vista que esses flavonóides apresentam diversos grupos fenólicos. No entanto, as demais frações identificadas como ácido cinâmico (*cis* e *trans*) e *trans*-cinamaldeído, também apresentam resultados positivos para esse ensaio, o que indica que o termo “fenólicos totais” não é o mais indicado para o extrato de canela do Ceilão. Huang, Ou e Prior (2005) afirmam que outros compostos com potencial redutor, tais como açúcares redutores, ácido ascórbico, entre outros, reagem com o ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico formando o complexo azul de molibdênio, fazendo com que esses compostos também sejam quantificados e, portanto, não seria correto apresentar o resultado como o teor de fenólicos totais para diversas amostras.

As proantocianidinas também apresentaram a maior capacidade antioxidante tanto pelo método do sequestro de radicais DPPH, quanto pela capacidade redutora do ferro. Esses compostos (frações 1 a 3) representaram 88,1% da capacidade antioxidante entre os principais componentes do extrato, nos dois ensaios. Entre eles, a fração 2, correspondente à procianidina trímero tipo A foi a que apresentou o maior poder antioxidante.

Figura 13 – Capacidade antioxidante dos principais compostos presentes no extrato de canela do Ceilão (*C. zeylanicum*). **(a)** Capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu. **(b)** Capacidade de sequestro dos radicais DPPH. **(c)** Capacidade de redução do ferro (FRAP). Letras diferentes no mesmo gráfico indicam que há diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$), $n = 3$ replicatas. Frações: **1, 2 e 3**: proantocianidinas; **4**: ácido *cis*-cinâmico; **5**: ácido *trans*-cinâmico; **6**: *trans*-cinamaldeído.

Fonte: Própria autoria.

O ácido *cis*-cinâmico (fração 4) também apresentou poder antioxidante considerável, sendo responsável por 10,3% da capacidade de sequestro dos radicais DPPH e 8,3% do poder redutor do ferro entre os principais compostos do extrato. O seu isômero ácido *trans*-cinâmico identificado na fração 5 apresentou pouca contribuição para a capacidade antioxidante sendo 0,9 e 1,8% para os ensaios DPPH e FRAP, respectivamente. Isso foi devido provavelmente à quantidade dos dois compostos no extrato, sendo a intensidade do pico 4, maior do que a do pico 5, como pode ser visto na Figura 12 e Tabela 4. O ácido cinâmico é um ácido orgânico cujo potencial antioxidante já foi relatado (AVANESYAN et al. 2009), porém alguns derivados desse composto, principalmente contendo grupos hidroxila ligados ao anel aromático, são mais potentes (AVANESYAN et al. 2009; SOVA, 2012).

Apesar de ser o composto mais abundante no extrato etanólico da canela do Ceilão, o *trans*-cinamaldeído que corresponde à fração 6 do extrato, apresentou baixas capacidades anti-radicaís e redutora do ferro, contribuindo com 0,7 e 1,8%, respectivamente. Há relatos na literatura do potencial antioxidante do cinamaldeído em produtos cárneos (NAVEENA et al. 2014) e em óleos e gorduras (HORUZ; MASKAN, 2015). Isso indica que esse composto atua principalmente como antioxidante lipofílico e explica a baixa contribuição como antioxidante hidrofílico observada no presente trabalho.

A obtenção do extrato de canela do Ceilão nas condições otimizadas, com o maior conteúdo de proantocianidinas representa a valorização ainda maior dessa matéria-prima, sendo que esse extrato apresenta potencial para uso como produto natural antioxidante pelas indústrias de alimentos, farmacêutica entre outras.

4.5 Obtenção dos extratos secos

A secagem por atomização e liofilização teve o objetivo de concentrar o teor de proantocianidinas totais do extrato de canela obtido nas condições otimizadas, bem como

obter um pó de fácil manipulação e estocagem em comparação ao extrato líquido. Foram obtidos pós finos e de coloração castanha característica da canela, como pode ser observado na Figura 14. O extrato liofilizado mostrou-se levemente mais escuro do que o atomizado e apresentou partículas bastante irregulares, pois o pó foi obtido após a maceração da amostra liofilizada. O extrato atomizado apresentou-se bastante fino e homogêneo.

Figura 14 – Extratos de canela do Ceilão desidratados. **(a)** Extrato seco por *spray drying*. **(b)** Extrato seco por liofilização.

Fonte: Própria autoria.

4.6 Potencial bioativo dos extratos líquidos e secos

O extrato de canela é conhecido por apresentar diversos efeitos benéficos à saúde, tais como atividade anti-diabetes tipo 2, antiobesidade, além de prevenir contra doenças cardiovasculares. Além disso, possuem capacidade antioxidante devido seu alto teor de compostos fenólicos e também atividade antimicrobiana (KHAN et al. 2003; BEECHER, 2004; SHAN et al. 2007). Para os extratos líquidos (etanólico e concentrado) e para os extratos secos (atomizado e liofilizado) foram determinados os teores totais de proantocianidinas, a capacidade antioxidante e a atividade anti-diabetes (inibição da α -amilase e α -glicosidase). Os resultados para essas análises estão apresentados nas Tabela 5 e 6.

4.6.1 *Proantocianidinas totais e capacidade antioxidante*

As proantocianidinas são os principais compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de canela (NONAKA; MORIMOTO; NISHIOKA, 1983). Essas moléculas são também as principais responsáveis pela capacidade antioxidante que o extrato apresenta (GRUENWALD; FREDER; ARMBRUESTER, 2010).

Pode-se observar pelos resultados apresentados na Tabela 5, que os processos de secagem do extrato de canela promoveram perdas no conteúdo de proantocianidinas totais do extrato. Os valores foram estatisticamente diferentes e ocorreram perdas de 6, 17 e 23% do conteúdo inicial de proantocianidinas nos extratos concentrado, atomizado e liofilizado, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para a capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu (fenólicos totais). Os processos térmicos, tais como a concentração e a secagem por atomização são responsáveis pela degradação de compostos sensíveis, tais como os fenólicos. Apesar da temperatura utilizada durante a concentração do extrato não ter sido alta (40 °C), o tempo de exposição à essa temperatura foi suficiente para promover perda desses compostos, mesmo que pequena. Além disso, entre os métodos de secagem, a liofilização mostrou-se pior do que a atomização para a obtenção do extrato seco de canela. As perdas totais ocorridas na liofilização foram devidas, em parte, ao processo prévio de concentração do extrato e também ao longo tempo de secagem ao qual o extrato ficou exposto às condições ambientais (24 h), mesmo que a baixas temperaturas e baixo teor de oxigênio, outros fatores como a incidência de luz podem ter contribuído para a degradação dos compostos fenólicos nesse processo.

Com relação à capacidade antioxidante, não houve diferença significativa entre os métodos de secagem, sendo que ambos promoveram perdas semelhantes tanto na capacidade sequestrante de radicais DPPH, quanto na capacidade redutora do ferro em comparação às amostras dos extratos líquidos. Essas perdas também estão relacionadas às condições de

secagem, tais como alta temperatura, tempo de processo, exposição à luz e oxigênio, entre outras que podem influenciar na degradação dos compostos responsáveis por essas atividades.

Tabela 5 – Teor total de proantocianidinas e capacidade antioxidante dos extratos de canela do Ceilão líquidos e secos.

Amostra	Proantocianidinas totais (mg eq procianidina B2/g de extrato b.s)*	Redução do Folin-Ciocalteu (mg eq. ácido gálico/g de extrato b.s)*	DPPH (μmol eq. Trolox/g de extrato b.s)*	FRAP (μmol eq. Trolox/g de extrato b.s)*
Extrato etanólico	419 ± 4 ^a	740 ± 8 ^a	2304 ± 62 ^a	1277 ± 87 ^a
Extrato concentrado	395 ± 4 ^b	698 ± 8 ^b	2249 ± 62 ^a	1240 ± 87 ^a
Extrato atomizado	346 ± 8 ^c	610 ± 10 ^c	2072 ± 32 ^b	924 ± 46 ^b
Extrato liofilizado	321 ± 5 ^d	567 ± 5 ^d	2055 ± 42 ^b	860 ± 43 ^b

*Média ± desvio padrão. Médias na mesma coluna e seguidas de letras diferentes, diferem entre si (p<0,05), n = 3 replicatas.

Fonte: Própria autoria.

Perdas no conteúdo de fenólicos e capacidade antioxidante devido aos processos de secagem também foram observadas por Fujita et al. (2013) ao avaliarem extratos de camu-camu secos por liofilização e leito de jorro, em comparação com a polpa fresca da fruta.

4.6.2 Atividades inibitórias da α -amilase e α -glicosidase

O extrato de canela é bastante conhecido pelo seu efeito anti-diabetes tipo 2 (KHAN et al. 2003; ANDERSON et al. 2004; JIAO et al. 2013). Essa atividade está centrada na inibição das enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase, responsáveis pela digestão de carboidratos solúveis. A capacidade dos extratos de canela do Ceilão líquidos (etanólico e concentrado) e secos (atomizado e liofilizado) em inibir essas enzimas digestivas foi avaliada *in vitro* obtendo-se resultados expressivos que estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Atividade inibitória (IC₅₀) das enzimas α -amilase e α -glicosidase pelos extratos de canela do Ceilão líquidos e secos.

Amostra	Inibição da α -amilase ($\mu\text{g/mL}$ de reação)	Inibição da α -glicosidase ($\mu\text{g/mL}$ de reação)
Extrato etanólico	$4,1 \pm 0,2^a$	$6,3 \pm 0,1^a$
Extrato concentrado	$3,7 \pm 0,2^a$	$6,2 \pm 0,1^a$
Extrato atomizado	$2,6 \pm 0,2^b$	$0,8 \pm 0,0^b$
Extrato liofilizado	$3,5 \pm 0,3^a$	$0,7 \pm 0,0^b$

*Média $\pm$ desvio padrão. Médias na mesma coluna e seguidas de letras diferentes, diferem entre si ($p < 0,05$), $n = 3$ replicatas.

Fonte: Própria autoria.

Para essas atividades, ao contrário do que ocorreu com a capacidade antioxidante, os processos de secagem do extrato, principalmente a atomização, potencializaram a ação do extrato na inibição das enzimas digestivas. Menores valores de IC 50 na Tabela 6 indicam que é necessária concentração menor de extrato para inibir a mesma concentração de enzima na reação. A princípio parece um resultado conflitante pois como foi visto na seção 4.6.1, os processos de secagem ocasionaram perda no conteúdo total de proantocianidinas e essas moléculas são conhecidas como as principais responsáveis pela capacidade da canela em inibir a α -amilase e α -glicosidase (ANDERSON et al. 2004; ANHÊ et al. 2013). No entanto, isso pode ser explicado pelo fato dos processos de secagem utilizados, principalmente a atomização promoverem alta perda dos compostos voláteis presentes no extrato da canela, como o cinamaldeído. Já foi visto que esse composto está presente em grande quantidade no extrato da canela do Ceilão (Seção 4.3). Sendo assim, com a perda de massa considerável de cinamaldeído, as proantocianidinas passam a representar uma fração maior no total de compostos presentes no extrato.

Para dar respaldo à afirmação acima, foi avaliado o perfil químico dos extratos de canela líquidos e secos em um sistema de cromatografia líquida (CLAE) como descrito no item 3.5. Para isso foram preparadas diluições dos extratos, padronizando todos com o mesmo conteúdo de sólidos totais. Foram calculadas as porcentagens com a qual cada uma das principais frações contribui dentro de cada amostra de extrato, sendo que esses valores estão apresentados na Tabela 7. Vale ressaltar que somente as principais frações, as que foram

identificadas, foram apresentadas. Mas para o cálculo das porcentagens foram considerados todos os picos resultantes da análise em CLAE.

Tabela 7 – Porcentagem de contribuição das principais frações do extrato de canela em relação ao total de picos (CLAE) nas amostras dos extratos líquidos (etanólico e concentrado) e secos (atomizado e liofilizado).

Fração (composto)	Porcentagem de contribuição para o extrato (%)			
	Extrato etanólico	Extrato concentrado	Extrato atomizado	Extrato liofilizado
1 (PA)	0,7 ± 0,0 ^d	0,9 ± 0,1 ^c	1,9 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,0 ^b
2 (PA)	0,7 ± 0,0 ^d	1,6 ± 0,6 ^c	4,4 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,0 ^b
3 (PA)	0,6 ± 0,0 ^b	0,6 ± 0,0 ^b	1,2 ± 0,3 ^a	0,7 ± 0,1 ^b
4 (ácido cinâmico)	0,6 ± 0,1 ^d	0,7 ± 0,0 ^c	1,6 ± 0,0 ^a	0,9 ± 0,0 ^b
5 (ácido cinâmico)	0,4 ± 0,0 ^d	0,4 ± 0,0 ^c	0,9 ± 0,0 ^a	0,6 ± 0,0 ^b
6 (cinamaldeído)	88,8 ± 0,3 ^a	87,8 ± 0,2 ^a	74 ± 1 ^c	84,9 ± 0,5 ^b

Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indica que há diferença significativa entre as amostras em relação a determinada fração ($p < 0,05$). PA – Proantocianidinas.

Fonte: Própria autoria.

Observa-se claramente o aumento da contribuição das proantocianidinas (frações 1, 2 e 3) no total de compostos que constituem os extratos secos, principalmente no atomizado. Também se observa a redução significativa no cinamaldeído (fração 6), principalmente no extrato atomizado.

Os extratos de canela estudados no presente trabalho apresentaram maior atividade de inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase do que os extratos de camu-camu estudados por Fujita et al. (2015) secos por *spray drying* e liofilização. Adisakwattana et al. (2011) avaliaram a capacidade inibidora de α -amilase e α -glicosidase em extratos de canela de quatro variedades diferentes observando menores efeitos inibitórios em comparação aos observados do presente trabalho. Esses autores obtiveram os extratos de canela utilizando água a 90 °C como solvente durante 2 horas seguido de filtração e liofilização. Isso evidencia que as condições de extração utilizadas no presente estudo podem contribuir para a obtenção do extrato de canela com maior capacidade anti-diabetes tipo 2.

4.6.3 Atividade antimicrobiana

A capacidade de inibir a multiplicação de micro-organismos patogênicos já foi observada no extrato metanólico de canela (*Cinnamomum burmannii*) desidratado por liofilização (SHAN et al. 2007). No presente trabalho, a atividade antimicrobiana contra as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli* foi avaliada nas amostras dos extratos de canela do Ceilão (*C. zeylanicum*) líquidos e secos e os resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Atividade antimicrobiana medida pela zona de inibição (ZI), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), para os extratos de canela do Ceilão líquidos e secos.

		Amostra			
Micro-organismo		Extrato etanólico	Extrato concentrado	Extrato atomizado	Extrato liofilizado
<i>Staphylococcus aureus</i>	ZI* (mm)	9 ± 2 ^a	8 ± 1 ^a	-	-
	CIM (mg/mL)	12,5	12,5	-	-
	CBM (mg/mL)	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ZI* (mm)	7 ± 0 ^b	7 ± 0 ^b	12 ± 0 ^a	-
	CIM (mg/mL)	12,5	12,5	6,25	-
	CBM (mg/mL)	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	ZI* (mm)	6 ± 3 ^a	5 ± 1 ^a	-	-
	CIM (mg/mL)	6,25	25,0	-	-
	CBM (mg/mL)	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	ZI* (mm)	9,7 ± 0,6 ^a	5,7 ± 0,6 ^b	-	-
	CIM (mg/mL)	25,0	25,0	-	-
	CBM (mg/mL)	25,0	25,0	-	-

*Média ± desvio padrão. Médias na mesma linha e seguidas de letras diferentes, diferem entre si (p<0,05), n = 3 replicatas.

(-): resultado não observado nas concentrações testadas.

Fonte: Própria autoria.

Os extratos etanólico e concentrado foram os que apresentaram maior capacidade de inibição dos micro-organismos testados, apresentando efeito contra todos eles. O extrato atomizado inibiu o crescimento de *L. monocytogenes* enquanto que o extrato liofilizado não apresentou efeito inibitório contra nenhum dos micro-organismos avaliados, na concentração em que foi testado.

A diminuição considerável dessa capacidade nos extratos secos pode estar ligada à redução considerável no conteúdo de cinamaldeído no extrato após secagem, como já

discutido na Seção 4.6.2. Esse composto volátil está presente em grande quantidade nos extratos líquidos da canela e segundo Shan et al. (2007) é o composto que mais contribui para a capacidade antimicrobiana no extrato de canela da Indonésia (*C. burmannii*). Além disso, o potencial antimicrobiano da canela parece estar ligado principalmente ao seu óleo essencial, onde o cinamaldeído está presente em grande quantidade (GRUENWALD; FREDER; ARMBRUESTER, 2010).

Baseado nos resultados obtidos na avaliação do potencial bioativo dos extratos de canela líquidos e secos, o extrato atomizado foi escolhido para ser utilizado na etapa seguinte do trabalho. Esse extrato apresentou alta atividade inibidora das enzimas α -amilase e α -glicosidase e apresenta alta concentração de proantocianidinas (aproximadamente 35% em base seca). Além disso, requer menos tempo e etapas para sua obtenção.

4.7 Obtenção das micropartículas por coacervação complexa

4.7.1 Determinação do pH de coacervação

As micropartículas contendo extrato de canela e utilizando os diferentes pares poliméricos foram produzidas pela técnica de coacervação complexa e foi avaliado o efeito do pH sobre a formação dos complexos. Os resultados da morfologia e a separação de fases ocasionada pela sedimentação das partículas após repouso são apresentados na Figura 15.

Apesar de terem sido avaliados vários valores de pH, os apresentados aqui foram os que proporcionaram os melhores resultados na morfologia e na separação de fases do sistema. Pode-se observar que em relação à morfologia, as paredes das partículas estão bem definidas e algumas apresentam formato esférico. O par polimérico formado por gelatina-goma de cajueiro formou as partículas com menor tamanho enquanto o par gelatina-carragena formou as maiores partículas. Todos os sistemas apresentaram clara separação de fases, com sobrenadante límpido. Em alguns casos como nas Figuras 15d e 15e, observa-se presença de

partículas em suspensão no sobrenadante. Isso foi devido à movimentação do béquer no momento do registro da imagem.

Para cada par polimérico, um valor diferente de pH foi selecionado e isso mostra a importância desse parâmetro. O pH do meio é um dos parâmetros que mais afetam a formação de coacervados e para materiais diferentes, haverá comportamento diferente já que a distribuição de cargas em determinado pH é particular de cada molécula (DANIELS; MITTERMAIER, 1995).

Figura 15 - Morfologia das partículas (aumento de 100X) e separação de fases nos sistemas para a encapsulação do extrato de canela por coacervação complexa nos pH's selecionados. (a) gelatina e goma arábica pH 3,8, (b) gelatina e pectina pH 3,5, (c) gelatina e goma do cajueiro pH 4,1, (d) gelatina e carboximetilcelulose pH 4,4, (e) gelatina e k-carragena pH 4,2.

Figura 15 – Continuação

Fonte: Própria autoria.

4.7.2 Determinação da concentração de núcleo

As micropartículas com os diferentes pares poliméricos e com o pH ajustado para os valores definidos no ensaio anterior foram produzidas com diferentes concentrações de núcleo (extrato de canela atomizado) em relação à massa total de polímeros utilizada. Os resultados para a morfologia, a separação de fases e o teor de proantocianidinas totais na água de coacervação, estão apresentados nas Tabelas de 9 a 13.

Observa-se que na maioria dos casos ocorre o aumento na concentração de proantocianidinas presente na água de coacervação, ou seja, que não foi encapsulada, com o aumento na concentração de núcleo. Esse resultado é esperado tendo em vista que o aumento na concentração de núcleo implica em massa maior do extrato, para a mesma massa de polímeros. Isso também indica que a maioria dos polímeros testados tem capacidade limitada de encapsulação ou ainda, que parte do extrato deve estar sendo solubilizada na água e não é encapsulada. O par polimérico composto por gelatina-pectina apresentou comportamento um

pouco diferente. Houve aumento na concentração de proantocianidinas não encapsulada com o aumento de 25 para 30 % de núcleo, porém com o aumento para 35 e 40 %, não houve diferença significativa em comparação com a amostra contendo 30 % de núcleo. Isso pode indicar maior capacidade de encapsulação para esse sistema.

As mudanças na morfologia das partículas com o aumento da concentração de núcleo são evidentes nos sistemas contendo goma arábica, pectina e carragena (Tabelas 9, 10 e 13 respectivamente). Pode-se observar que as cápsulas contendo gelatina/goma arábica e gelatina/pectina apresentam formato menos esférico e aparência mais aglomerada à medida que se aumenta a concentração de núcleo (Tabelas 9 e 10). Com relação à separação de fases, não houve diferença evidente para esses pares com a variação na concentração de núcleo. Dessa forma, para esses dois pares, a concentração de núcleo mais indicada é de 25 %. Apesar do par formado por gelatina/pectina aparentemente ser capaz de comportar maiores quantidades de extrato sem perder maiores quantidades de proantocianidinas, a morfologia das partículas sofre alteração significativa e, além disso, com 25 % de núcleo, sobrou menor quantidade de proantocianidinas na água de coacervação.

As partículas produzidas com gelatina e goma de cajueiro, não apresentaram diferença visível em sua morfologia com o aumento na concentração de núcleo (Tabela 11). Porém, quando as concentrações foram de 35 e 40 %, observa-se que o sobrenadante ficou turvo ao contrário das menores concentrações onde ficaram transparentes. Essa turbidez pode estar ligada à presença de polímeros que não complexaram, ou seja, não formaram complexos e isso pode justificar também o aumento na concentração de proantocianidinas no sobrenadante. Entre as concentrações de 25 e 30 % de núcleo, houve menor quantidade de proantocianidinas que ficou na água de coacervação a 25 %, sendo assim, essa concentração é a mais indicada para esse par polimérico.

Para o par polimérico contendo gelatina-CMC, não há diferença visível na morfologia das partículas com a variação na concentração de núcleo (Tabela 12). As amostras produzidas com 25 e 30 % de núcleo apresentaram os menores teores de proantocianidinas na água de coacervação. No entanto, pode-se observar que a 25 % de núcleo, há menos sedimentação das partículas o que implica em menor rendimento de produto. Dessa forma, a concentração de 30 % de núcleo é a mais indicada para a produção das cápsulas com gelatina e CMC.

Para a gelatina e carragena, apesar das concentrações de 25 e 30 % de núcleo, apresentarem as menores quantidades de proantocianidinas na água de encapsulação (Tabela 13), as partículas obtidas nessas concentrações foram as de maior tamanho entre todos os pares poliméricos testados. Partículas muito grandes não são interessantes, pois podem causar sensação de areosidade na boca quando incorporadas em um produto, e tal sensação, na maioria das vezes, é indesejada. A concentração de 35 % de núcleo é a mais indicada nesse caso, pois originou partículas com menor tamanho e formato mais esférico entre todas as concentrações testadas para esse par polimérico.

Tabela 9 - Morfologia, separação de fases e concentração de proantocianidinas totais na água de coacervação das cápsulas contendo extrato de canela em diferentes concentrações, produzidas com GELATINA E GOMA ARÁBICA.

Concentração de núcleo*	25%	30%	35%	40%
Morfologia
Separação de fases
Proantocianidinas totais (mg eq. procianidina B2/ mL de água de coacervação)**	$0,062 \pm 0,002^d$	$0,074 \pm 0,001^c$	$0,085 \pm 0,001^b$	$0,103 \pm 0,001^a$

* Massa de extrato de canela em relação à massa total de polímeros (gelatina + polissacarídeo).

** Média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 10 - Morfologia, separação de fases e concentração de proantocianidinas totais na água de coacervação das cápsulas contendo extrato de canela em diferentes concentrações, produzidas com GELATINA E PECTINA.

Concentração de núcleo*	25%	30%	35%	40%
Morfologia
Separação de fases
Proantocianidinas totais (mg eq. procianidina B2/ mL de água de coacervação)**	$0,060 \pm 0,002^b$	$0,075 \pm 0,000^a$	$0,077 \pm 0,001^a$	$0,076 \pm 0,001^a$

* Massa de extrato de canela em relação à massa total de polímeros (gelatina + polissacarídeo).

** Média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 11 - Morfologia, separação de fases e concentração de proantocianidinas totais na água de coacervação das cápsulas contendo extrato de canela em diferentes concentrações, produzidas com GELATINA E GOMA DE CAJUEIRO.

Concentração de núcleo*	25%	30%	35%	40%
Morfologia
Separação de fases
Proantocianidinas totais (mg eq. procianidina B2/ mL de água de coacervação)**	$0,083 \pm 0,001^d$	$0,107 \pm 0,001^c$	$0,128 \pm 0,001^b$	$0,179 \pm 0,001^a$

* Massa de extrato de canela em relação à massa total de polímeros (gelatina + polissacarídeo).

** Média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 12 - Morfologia, separação de fases e concentração de proantocianidinas totais na água de coacervação das cápsulas contendo extrato de canela em diferentes concentrações, produzidas com GELATINA E CMC.

Concentração de núcleo*	25%	30%	35%	40%
Morfologia
Separação de fases
Proantocianidinas totais (mg eq. procianidina B2/ mL de água de coacervação)**	$0,021 \pm 0,001^c$	$0,025 \pm 0,001^{b,c}$	$0,030 \pm 0,001^{a,b}$	$0,032 \pm 0,001^a$

* Massa de extrato de canela em relação à massa total de polímeros (gelatina + polissacarídeo).

** Média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 13 - Morfologia, separação de fases e concentração de proantocianidinas totais na água de coacervação das cápsulas contendo extrato de canela em diferentes concentrações, produzidas com GELATINA E CARRAGENA.

Concentração de núcleo*	25%	30%	35%	40%
Morfologia
Separação de fases
Proantocianidinas totais (mg eq. procianidina B2/ mL de água de coacervação)**	$0,026 \pm 0,001^c$	$0,033 \pm 0,000^b$	$0,036 \pm 0,001^{a,b}$	$0,039 \pm 0,001^a$

* Massa de extrato de canela em relação à massa total de polímeros (gelatina + polissacarídeo).

** Média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

4.8 Secagem das partículas por liofilização

Após a definição dos parâmetros para a encapsulação do extrato de canela do Ceilão por coacervação complexa, os quais encontram-se compilados na Tabela 14, as partículas foram produzidas utilizando essas condições e desidratadas por liofilização, obtendo-se amostras em pó mostradas na Figura 16.

Tabela 14 – Parâmetros determinados para a produção das micropartículas contendo extrato de canela do Ceilão, por coacervação complexa utilizando diferentes materiais encapsulantes.

Par polimérico	Proporção gelatina:polissacarídeo	pH de coacervação	Concentração de núcleo (extrato de canela)
Gelatina:Goma Arábica	1:1	3,8	25%
Gelatina:Pectina	2:1	3,5	25%
Gelatina:Goma de cajueiro	1:2,5	4,1	25%
Gelatina:CMC	7:1	4,4	30%
Gelatina:k-carragena	4:1	4,2	35%

Fonte: Própria autoria.

Todas as amostras apresentaram cor castanha característica do extrato de canela, como pode ser observado comparando a imagem do extrato atomizado (Figura 16 a) com as amostras do extrato encapsulado (Figuras 16 b – f). Apresentaram-se também com alguns grumos característicos das amostras obtidas no liofilizador, onde o pó é obtido após maceração da amostra seca. A maioria era facilmente reidratada ficando em suspensão. Uma exceção foi o pó obtido com o par polimérico gelatina/CMC, o qual formava grumos quando em contato com a água e demorava para dispersar.

Figura 16 – Extrato de canela do Ceilão livre e micropartículas do extrato encapsulado. (a) extrato atomizado (livre); (b) extrato encapsulado com gelatina/goma arábica; (c) extrato encapsulado com gelatina/pectina; (d) extrato encapsulado com gelatina/goma de cajueiro; (e) extrato encapsulado com gelatina/carboximetilcelulose; (f) extrato encapsulado com gelatina/κ-carragena.

Fonte: Própria autoria.

4.9 Caracterização das micropartículas contendo extrato de canela

As partículas produzidas foram caracterizadas quanto ao rendimento e eficiência de encapsulação dos compostos fenólicos, teor de umidade, atividade de água, higroscopicidade, solubilidade em água, morfologia, tamanho médio e distribuição do tamanho de partículas.

4.9.1 Eficiência e rendimento de encapsulação

A eficiência e o rendimento são parâmetros importantes no desenvolvimento de um processo de encapsulação, seja qual for o método e a substância a ser encapsulada. Normalmente, materiais hidrofílicos não são encapsulados diretamente pela técnica de coacervação complexa, sendo necessário obter uma emulsão desse material em óleo. Essa emulsão então, é utilizada como núcleo na obtenção das partículas (COMUNIAN et al. 2013;

ROCHA-SELMÍ et al. 2013a; 2013b; SANTOS et al. 2015). Tal etapa é necessária porque a eficiência de encapsulação de substâncias hidrofílicas nessa técnica é muito menor do que a de substâncias lipofílicas, uma vez que as primeiras tendem a migrar para a água de coacervação durante o processo. No presente estudo, o extrato de canela do Ceilão rico em proantocianidinas foi encapsulado utilizando a técnica de coacervação complexa, sem o uso de emulsão primária e utilizando diferentes pares poliméricos, como já descrito. Os teores de fenólicos e proantocianidinas totais, bem como a eficiência e rendimento de encapsulação para cada tipo de partícula foram avaliados e os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Teores de fenólicos e proantocianidinas totais, eficiência e rendimento de encapsulação para cada amostra de micropartículas do extrato de canela do Ceilão encapsulado por coacervação complexa utilizando diferentes materiais encapsulantes.

Amostra	Fenólicos totais (mg eq ác gálico/g)	Proantocianidinas totais (mg eq Pro B2/g)	Eficiência de encapsulação (%)	Rendimento de encapsulação (%)
GEL + GA	49 ± 1 ^c	21,2 ± 0,7 ^c	73 ± 3 ^b	80 ± 3 ^b
GEL + PEC	75 ± 6 ^b	38 ± 6 ^b	85 ± 2 ^a	92 ± 2 ^a
GEL + GC	124 ± 8 ^a	69 ± 7 ^a	86 ± 6 ^a	91 ± 6 ^a
GEL + CMC	55 ± 2 ^c	24,5 ± 0,6 ^c	67 ± 1 ^{b, c}	73 ± 2 ^c
GEL + CARR	42 ± 13 ^c	15 ± 6 ^c	65 ± 4 ^c	70 ± 4 ^c

*Média ± desvio padrão. Médias na mesma coluna e seguidas de letras diferentes, diferem entre si ($p < 0,05$), $n = 3$ replicatas.

Fonte: Própria autoria.

As concentrações dos compostos fenólicos nas partículas foram variáveis, pois, para cada par polimérico foram utilizadas concentrações diferentes de núcleo, bem como proporções diferentes entre os polímeros.

Observa-se que foram obtidos valores elevados de eficiência e rendimento de encapsulação, em se tratando de compostos hidrofílicos e que foram encapsulados diretamente. Esse resultado pode estar ligado à capacidade que compostos fenólicos, principalmente as proantocianidinas possuem em se ligar com proteínas, como a gelatina. A

interação dos compostos presentes no extrato com a gelatina utilizada como material de parede, pode ter contribuído para aumentar a quantidade dos compostos fenólicos que foram encapsulados.

Nori et al. (2011) obtiveram partículas de extrato de própolis, que também é rico em compostos fenólicos, por coacervação complexa utilizando isolado proteico de soja e pectina como materiais encapsulantes. Esses autores utilizaram metodologia similar à que foi apresentada aqui e obtiveram eficiência de encapsulação entre 66 e 72%, valores similares aos encontrados no presente trabalho. Santos et al. (2015) obtiveram eficiências de encapsulação variando de 31 a 63% para xilitol (altamente hidrofílico) encapsulado utilizando emulsão dupla seguida de coacervação complexa com gelatina/goma arábica como encapsulantes, valores menores aos que foram obtidos no presente estudo. Já García-Saldaña et al. (2016) utilizando gelatina/pectina para encapsular sulforafano de sementes de brócolis por coacervação complexa, obtiveram rendimento de encapsulação de 81% e eficiência de 18%, valores menores aos encontrados para o extrato de canela encapsulados com os mesmos materiais.

4.9.2 Teor de umidade, atividade de água, higroscopicidade e solubilidade

Alguns parâmetros são importantes para caracterizar produtos em pó uma vez que podem fornecer informações do ponto de vista de conservação, estocagem e aplicação desses materiais. Foram medidos o teor de umidade, a atividade de água, a higroscopicidade e a solubilidade em água do extrato de canela, bem como das micropartículas secas contendo o extrato encapsulado. Os resultados para essas análises são apresentados na Tabela 16.

Os valores de atividade de água variaram de 0,36 no extrato atomizado até 0,6 na partícula produzida com gelatina/carragena. De forma geral a atividade de água nas partículas foi de baixa a intermediária sendo que as partículas produzidas com gelatina/goma arábica

foram as que apresentaram o menor valor desse parâmetro. A atividade de água elevada pode comprometer a conservação das partículas obtidas, pois pode permitir a multiplicação microbiana, bem como facilitar a ocorrência de reações de degradação dos compostos encapsulados. Sendo assim, a estocagem do material deverá ser feita em condições que minimizem a ocorrência dessas reações. Os valores de atividade de água obtidos no presente trabalho estão de acordo com Comunian et al. (2013) para micropartículas obtidas por coacervação complexa encapsulando ácido ascórbico. E também com Gomez-Estaca et al. (2016) que obtiveram micropartículas de astaxantina de camarão por coacervação complexa utilizando gelatina e goma de cajueiro como encapsulantes.

Tabela 16 – Atividade de água, teor de umidade, higroscopicidade e solubilidade do extrato de canela atomizado (extrato livre) e das partículas contendo extrato de canela encapsulado por coacervação complexa utilizando diferentes materiais encapsulantes.

Amostra	Atividade de água (Aw)	Umidade (%)	Higroscopicidade (g de água/100 g b.s)	Solubilidade (%)
Extrato livre	0,36 ± 0,02 ^d	6,5 ± 0,2 ^{a, b}	10,2 ± 0,9 ^{a, b}	69 ± 1 ^a
GEL + GA	0,37 ± 0,02 ^d	3,4 ± 0,3 ^c	12,4 ± 0,9 ^a	17 ± 2 ^c
GEL + PEC	0,56 ± 0,01 ^{b, c}	7,0 ± 0,8 ^a	9 ± 1 ^b	11,4 ± 0,5 ^d
GEL + GC	0,59 ± 0,01 ^{a, b}	5,8 ± 0,1 ^b	5,7 ± 0,7 ^c	22,7 ± 0,9 ^b
GEL + CMC	0,6 ± 0,0 ^c	6,6 ± 0,3 ^{a, b}	5,6 ± 0,4 ^c	6,8 ± 0,5 ^e
GEL + CARR	0,60 ± 0,01 ^a	6,5 ± 0,4 ^{a, b}	1,8 ± 0,3 ^d	8,1 ± 0,8 ^e

Média ± desvio padrão. Médias na mesma coluna e seguidas de letras diferentes, diferem entre si (p<0,05), n = 3 replicatas. Fonte: Própria autoria.

Os teores de umidade foram baixos, variando de 3,4 a 7,0%, como esperado para produtos desidratados. Esses valores estão de acordo com os encontrados por Rocha-Selmi et al. (2013), variando de 4,0 a 7,4% para microcápsulas de aspartame obtidas por emulsão dupla seguida de coacervação complexa.

A higroscopicidade na maioria das partículas foi menor do que a do extrato livre, com exceção das partículas obtidas com gelatina/goma arábica. A higroscopicidade dos polímeros utilizados é na maioria dos casos maior do que àquela observada para as partículas (Tabela 17), provavelmente devido ao fato dos grupos que são utilizados para adsorver água do ambiente serem os mesmos envolvidos na formação dos complexos entre a proteína e os polissacarídeos, o que ocuparia tais grupos e consequentemente reduziria a higroscopicidade das partículas formadas.

Os valores de higroscopicidade variaram de 1,8 a 12,4 g de água/100 g de matéria seca, sendo as partículas obtidas com gelatina e carragena as que apresentaram o menor valor. Gomez-Estaca et al. (2016) obtiveram partículas de astaxantina de camarão utilizando a coacervação complexa entre gelatina e goma de cajueiro com higroscopicidade de 1,14 g de água/100 g de matéria seca, valor esse que foi menor ao observado no presente trabalho, com os mesmos materiais de parede. Os valores obtidos para as partículas com gelatina/goma arábica foram similares aos obtidos por Rocha-Selmi et al. (2013) utilizando os mesmos materiais para encapsular aspartame por coacervação complexa.

Tabela 17 – Higroscopicidade dos materiais de parede utilizados para a encapsulação do extrato de canela por coacervação complexa.

Material encapsulante	Higroscopicidade (g de água/100 g b.s)
Gelatina	7,0 ± 0,3 ^f
Goma arábica	8,5 ± 0,1 ^e
Pectina	10,2 ± 0,1 ^d
Goma de cajueiro	11,4 ± 0,2 ^c
Carboximetilcelulose (CMC)	12,0 ± 0,3 ^b
K-carragena	14,1 ± 0,1 ^a

Média ± desvio padrão. Médias na mesma coluna e seguidas de letras diferentes, diferem entre si (p<0,05), n = 3 replicatas.

Fonte: Própria autoria.

Como esperado, a solubilidade das partículas obtidas por coacervação complexa encapsulando o extrato de canela foi menor do que àquela apresentada pelo extrato livre. Os coacervados obtidos através dessa técnica são formados através da interação entre os polímeros (proteína-polissacarídeo) em solução, tornando-se insolúveis e ocorrendo a separação de fases.

Os valores de solubilidade em água variaram de 6,8 a 22,7%, sendo as partículas obtidas com gelatina/goma de cajueiro as que apresentaram o maior valor. Isso pode ser devido a certa quantidade de polímeros que não complexaram e ficaram livres juntamente com as partículas, sendo contabilizados durante o ensaio para determinação da solubilidade. Valor similar de solubilidade em água para micropartículas com gelatina/goma de cajueiro foi observado por Gomez-Estaca et al (2016), onde as partículas contendo astaxantina de camarão apresentaram solubilidade de 28,6%. Valores obtidos por Comunian et al. (2013) para partículas contendo ácido ascórbico encapsulado no sistema gelatina/goma arábica, também são similares aos encontrados no presente trabalho.

4.9.3 Morfologia das partículas

O extrato atomizado apresenta partículas esféricas características de materiais secos no *spray dryer* como pode ser observado na imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (Figura 17 a).

Diferente do que acontece quando se encapsula compostos lipofílicos por coacervação complexa, no presente trabalho, todas as partículas obtidas com os diferentes materiais encapsulantes apresentaram formato irregular, como pode ser observado tanto nas imagens obtidas por microscopia óptica como nas obtidas por MEV (Figura 17). Normalmente o que se observa são partículas bastante esféricas quando se utiliza essa técnica. Esse formato irregular pode estar relacionado com a interação do extrato com o material de parede,

principalmente a gelatina. Foi observado que quanto menor a concentração de extrato presente (portanto menor interação), principalmente nos sistemas gelatina/goma arábica e gelatina/pectina, as partículas apresentaram formato mais esférico e regular (Tabelas 8 e 9). Lv et al. (2012) obtiveram partículas esféricas contendo óleo essencial de jasmim utilizando gelatina/CMC como encapsulantes com os mesmos valores de razão proteína:polissacarídeo e pH, que foram utilizados no presente trabalho, o que reforça a ideia de que o tipo de material que está sendo encapsulado pode influenciar na morfologia das partículas obtidas.

Esse formato irregular em partículas contendo extratos ricos em fenólicos também foi observado por Nori et al. (2011), para partículas de isolado proteico de soja/pectina encapsulando extrato de própolis. Gomez-Estaca et al. (2016) observaram formato irregular em partículas obtidas com gelatina/goma de cajueiro encapsulando astaxantina de camarão. Resultados semelhantes aos obtidos por Comunian et al. (2016) ao encapsularem óleo de *Echium* também com gelatina/goma de cajueiro. Isso significa que a forma das partículas pode também estar relacionada ao tipo de material de parede utilizado.

Observa-se também que as partículas obtidas com os sistemas gelatina/goma arábica e gelatina/pectina foram as que apresentaram paredes mais definidas e em todas as amostras é visível a presença do extrato de canela encapsulado, devido sua coloração característica.

Figura 17 – Microscopias óptica e eletrônica de varredura (MEV) do extrato atomizado e das micropartículas contendo extrato de canela encapsulado por coacervação complexa. (a) extrato livre; (b) partícula com GEL/GA; (c) partícula com GEL/PEC; (d) partícula com GEL/GC; (e) partícula com GEL/CMC; (f) partícula com GEL/CARR. Imagem de microscopia óptica (aumento de 100 X) e MEV (aumento de 1000 X).

Figura 17 – Continuação.

Figura 17 – Continuação.

Fonte: Própria autoria.

4.9.4 Tamanho e distribuição do tamanho das partículas

O tamanho de partículas é um parâmetro importante principalmente do ponto de vista da aplicação de ingredientes alimentícios, uma vez que partículas muito grandes podem ser indesejadas por serem percebidas na boca, causando sensação de areosidade. Em outros casos, podem ser desejadas, quando o objetivo for obter produtos onde as partículas sejam vistas. O tamanho médio de partículas para as amostras de extrato livre e também para as partículas do extrato encapsulado foi medido e os resultados são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 – Tamanho médio das partículas do extrato de canela atomizado e do extrato encapsulado por coacervação complexa com diferentes encapsulantes.

AMOSTRA	Diâmetro médio (um)
Extrato livre	$7,6 \pm 0,1^d$
GEL + GA	$121 \pm 24^{a, b}$
GEL + PEC	116 ± 10^b
GEL + GC	26 ± 3^c
GEL + CMC	29 ± 7^c
GEL + CARR	149 ± 21^a

*Média $\pm$ desvio padrão. Médias na mesma coluna e seguidas de letras diferentes, diferem entre si ($p < 0,05$), $n = 3$ replicatas. Fonte: Própria autoria.

É possível observar que o extrato atomizado da canela apresenta o menor tamanho médio de partícula enquanto as partículas do extrato encapsulado apresentam tamanhos diversos, porém sempre maiores do que o do extrato livre. Isso porque no processo de

encapsulação há a adição de cobertura polimérica em volta do extrato, além disso, as partículas de extrato não são encapsuladas individualmente, mas em conjunto, obtendo-se como resultado estruturas multinucleadas.

Rocha-Selmi et al (2013) obtiveram microcápsulas de aspartame por coacervação complexa com gelatina/goma arábica, sendo que as partículas apresentaram tamanhos entre 84 e 102 μm , valores um pouco menores do que os obtidos no presente trabalho para as partículas com os mesmos materiais de parede. Dai et al. (2010) encapsularam fluido para eletroforese por coacervação complexa utilizando gelatina/carboximetilcelulose/doctil sulfocinato, obtendo partículas com diâmetro médio 36 μm que é um pouco maior do que o diâmetro obtido para as partículas do extrato de canela utilizando gelatina/carboximetilcelulose.

Com relação à distribuição do tamanho de partículas, o extrato atomizado e as partículas produzidas com pectina, goma de cajueiro e carboximetilcelulose, apresentaram distribuição unimodal com um pico principal em torno do tamanho médio (Figuras 18 a, c, d, e). As amostras produzidas com goma arábica e κ -carragena (Figuras 18 b e f) apresentaram picos sobrepostos o que indica a presença de partículas de diferentes tamanhos. Essas amostras foram as que apresentaram o maior diâmetro médio de partículas.

Dai et al. (2010) e Peng et al. (2014) também observaram distribuição unimodal para partículas coacervadas obtidas com gelatina/carboximetilcelulose/doctil.

Figura 18 – Distribuição do tamanho de partículas para os extratos de canela livre e encapsulados por coacervação complexa com diferentes encapsulantes. **(a)** extrato atomizado (livre); **(b)** partícula produzida com GEL/GA; **(c)** partícula produzida com GEL/PEC; **(d)** partícula produzida com GEL/GC; **(e)** partícula produzida com GEL/CMC; **(f)** partícula produzida com GEL/CARR.

Fonte: Própria autoria.

4.10 Análise por espectroscopia de infravermelho

As análises dos espectros de infravermelho podem fornecer informações a respeito das interações envolvidas no processo de coacervação complexa entre a gelatina, os polissacarídeos e o extrato de canela. Os espectros dos ingredientes separados bem como das micropartículas obtidas após a encapsulação, são apresentados nas Figuras 19 e 20.

O espectro do extrato de canela atomizado (extrato livre) apresenta uma banda a 3330 cm^{-1} que é característica de grupos hidroxílicos ($-\text{OH}$), os quais, segundo Ping et al. (2012) e Santiago-Adame et al. (2015) podem pertencer a compostos fenólicos e carboidratos. Esse sinal também foi observado nos espectros dos polissacarídeos estudados, com pequenas variações no número de onda. A banda que aparece a 2926 no espectro do extrato livre é devida à frequência de estiramento da ligação $-\text{CH}_2$ (PING et al. 2012). Na faixa de 1600 a 900 cm^{-1} , apareceram bandas relacionadas a compostos fenólicos, por exemplo, as proantocianidinas. As duas bandas que aparecem a 1606 e 1519 cm^{-1} são devido à vibração da ligação $\text{C}=\text{C}$, que está presente em grande quantidade em compostos aromáticos, como os fenólicos (EDELMAN et al. 2001; SOUZA et al. 2015; SANTIAGO-ADAME et al. 2015). Segundo Ping et al. (2012), os picos que aparecem por volta de 1282 , 1251 e 1207 cm^{-1} , como observado no espectro do extrato livre, são devido a presença de taninos de flavonoides, que são as proantocianidinas.

O principal interesse dessa análise foi confirmar a formação do complexo entre a gelatina e os polissacarídeos estudados durante o processo de encapsulação. Para isso, analisando-se o espectro da gelatina, observa-se a presença de quatro regiões características como descrito por Anvari e Chung (2016): A banda a 3282 cm^{-1} (amida A, devido aos estiramentos de $-\text{OH}$ e NH), de $3000\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ (amida B, devido aos estiramentos em $=\text{C}-\text{H}$ e $-\text{NH}_3^+$), de $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (amida I, devido ao estiramento em $\text{C}=\text{O}$ e deformação de NH) e de $1335\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$ (amida II, devido à deformação de $\text{N}-\text{H}$ e estiramento de $\text{C}-\text{N}$). Anvari e

Chung (2016) observaram a banda referente à amida I em 1635 cm^{-1} , que foi exatamente a mesma observada no presente trabalho (Figura 19). Esses autores indicam que esse valor está ligado à estrutura secundária da proteína do tipo aleatoriamente enrolada o que seria um tipo de estrutura favorável para interação entre biopolímeros no processo de formação dos complexos.

Os polissacarídeos estudados apresentaram bandas características de estiramento da ligação --OH , típica de carboidratos e também algumas bandas características do estiramento do sal de ácido carboxílico --COO^- , como no caso da goma arábica com os picos a 1600 e 1415 cm^{-1} (ANVARI; CHUNG (2016). Para a pectina, a banda a 1735 cm^{-1} indica a presença de grupos carboxílicos esterificados na molécula (GARCÍA-SALDAÑA et al. 2016) e a de 1610 é característica do estiramento do grupo carboxílico --COO^- . Na goma de cajueiro essa banda característica aparece em 1606 cm^{-1} de acordo com o que foi observado por Oliveira, Paula e De Paula (2014). Para a carboximetilcelulose (CMC) as bandas que aparecem bastante pronunciadas a 1588 e 1412 cm^{-1} estão relacionadas, respectivamente aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo carboxílico --COO^- , como observado por Sitthichai et al. (2015). E na κ -carragena esse grupo é evidente pela presença da banda em 1622 cm^{-1} .

Na Figura 20 estão apresentados os espectros de infravermelho para as amostras das partículas obtidas por coacervação complexa. Em todas essas amostras, o grupo --NH_3^+ (amida B da gelatina) que aparece em 3072 cm^{-1} na Figura 19 (espectro da gelatina) e também as bandas referentes ao estiramento do grupo carboxílico --COO^- (1600 a 1415 cm^{-1}) nos polissacarídeos desapareceram indicando que houve interação eletrostática entre os grupos amino (--NH_3^+) da gelatina e os grupos carboxílicos (--COO^-) presentes nos polissacarídeos estudados. Esse comportamento foi igualmente observado por Anvari e Chung (2016).

A presença do extrato de canela nas micropartículas pode ser percebida principalmente pela banda em torno de 1067 cm^{-1} proveniente do extrato e que se refere ao estiramento da ligação C–O, presente nas proantocianidinas, como mostrado por Ping et al. (2012). Além disso, mudanças no número de onda das bandas referentes às amidas A, I e II, nos coacervados em comparação com a gelatina, podem indicar interação principalmente do tipo ligação de hidrogênio entre os fenólicos presentes no extrato de canela. Anvari e Chung (2016) observaram mudança nessas bandas ao utilizarem ácido tânico como agente reticulante nas partículas produzidas com gelatina de peixe/goma arábica. Os autores atribuíram esse resultado à interação entre o ácido tânico e a gelatina.

Figura 19 – Espectros de infravermelho do extrato de canela do Ceilão atomizado e dos materiais encapsulantes.

Fonte: Própria autoria.

Figura 20 – Espectros de infravermelho para as amostras das partículas de extrato de canela encapsulado por coacervação complexa, utilizando diferentes pares poliméricos. GEL+GA: gelatina + goma arábica; GEL+PEC: gelatina + pectina; GEL+GC: gelatina + goma de cajueiro; GEL+CMC: gelatina + carboximetilcelulose;

Fonte: Própria autoria.

4.11 Estabilidade das cápsulas sob condições de stress

As características do meio onde as partículas produzidas por coacervação complexa serão aplicadas, poderão afetar a estrutura dessas partículas. Segundo Chung e McClements (2015), os alimentos apresentam quantidades de sais e ácidos que podem alterar a interação eletrostática entre moléculas de biopolímeros. Sendo assim, é importante conhecer como as partículas obtidas por coacervação complexa contendo extrato de canela irão se comportar frente às condições do meio onde serão inseridas. As partículas obtidas no presente trabalho foram submetidas a variações de pH, temperatura, concentração de sal e concentração de açúcar do meio, sendo que alterações na morfologia dessas partículas foram avaliadas em todos os casos.

4.11.1 Variação de pH

As micropartículas foram colocadas em contato com soluções tampão com pH variando de 1 até 8 e os resultados da morfologia das partículas em água destilada, para os valores extremos de pH (1 e 8) e para o pH 6 são apresentados na Figura 21. Foram apresentados os resultados para o pH 6, pois esse valor está muito próximo ao do sorvete de creme (pH 6,3), onde as partículas foram aplicadas posteriormente.

As partículas obtidas com os pares poliméricos gelatina/goma arábica e gelatina/pectina apresentaram grande alteração na morfologia no pH mais baixo, onde a cobertura polimérica foi visualmente dissolvida, perdendo-se a estrutura inicial. Esse resultado foi semelhante no pH 2,0 (imagens não apresentadas). Em pH's mais elevados, essas partículas mantiveram a estrutura que apresentam quando estão em água destilada. Resultados semelhantes foram observados por Comunian et al. (2016) para partículas contendo óleo de Echim encapsulado com gelatina/goma arábica e gelatina/goma de cajueiro, embora esses autores observaram perda da estrutura das partículas também em pH

8,0. Segundo os mesmos, as forças eletrostáticas, responsáveis pela formação do complexo entre a proteína e o polissacarídeo, são fracas e podem ser mudadas ou eliminadas por variações no pH.

Também ocorreram alterações nas partículas produzidas com os outros materiais poliméricos. As amostras produzidas com gelatina/goma de cajueiro também foram mais afetadas no pH mais baixo, onde observa-se diminuição do tamanho das partículas e pedaços de material polimérico suspensos no meio. Para as amostras produzidas com gelatina/CMC o principal efeito tanto no pH 1 quanto no pH 8 foi a perda da cobertura polimérica que é observada quando as partículas estão em água. Já para as amostras obtidas com gelatina/ κ -carragena, a principal diferença na estrutura pode ser observada no pH mais elevado onde as partículas começaram a perder a estrutura inicial, mostrando que são formadas por um aglomerado multinucleado. No pH 6, que é próximo ao do sorvete onde ocorrerá a aplicação, as partículas, de maneira geral, mantiveram suas estruturas. Nos demais valores de pH (3, 4, 5 e 7) as partículas mantiveram sua estrutura inicial.

Os resultados obtidos nesse teste permitem inferir que as partículas do extrato de canela produzidas por coacervação complexa com diferentes materiais encapsulantes, podem ser aplicadas em grande número de produtos alimentícios, pois são resistentes em faixa considerável de pH's onde muitos alimentos se encontram. No entanto, em produtos muito ácidos (pH 1 e 2) a maioria dessas partículas perderiam sua estrutura, não sendo indicadas para aplicação.

Figura 21 – Morfologia das partículas antes e após 5 minutos de contato com soluções em pH 1, 6 e 8. Aumento das imagens de 100 vezes e barras da escala de 100 μm . GEL – gelatina, GA – goma arábica, PEC – pectina, GC – goma de cajueiro, CMC – carboximetilcelulose, CARR – κ -carragena.

Fonte: Própria autoria.

4.11.2 Variação de temperatura

A temperatura do meio pode afetar a estrutura das partículas uma vez que o aquecimento provoca agitação das moléculas e pode desestabilizar os complexos formados entre proteínas e polissacarídeos. Além disso, o uso de temperaturas muito baixas como as de congelamento pode formar cristais de gelo no meio, o que poderia levar à ruptura da estrutura de partículas coacervadas especialmente após o descongelamento. Sendo assim, as partículas contendo extrato de canela encapsulado por coacervação complexa foram submetidas ao contato com meios a diferentes condições de temperatura: congelamento lento e descongelamento, temperatura ambiente (25 °C), e valores de temperatura de 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Na Figura 22 estão apresentados os resultados para a morfologia das partículas após congelamento/descongelamento, a 25, 50 e 80 °C.

Não foram observadas alterações significativas nas partículas no processo de congelamento lento e posterior descongelamento, o que indica que a estrutura dessas amostras se manteve mesmo com a formação de cristais grandes de gelo. Esse resultado é interessante, pois indica que as partículas podem ser aplicadas em produtos congelados como o sorvete, ainda que este fosse produzido de forma artesanal, congelado em freezer doméstico, por exemplo. Também não foram observadas mudanças significativas à temperatura ambiente nem a 30 e 40 °C (imagens não apresentadas).

As maiores alterações na estrutura das partículas ocorreram a partir de 50 °C onde é possível observar diferenças em todas as amostras. Na maioria delas ocorreu aglomeração das partículas, formando-se estruturas bem maiores do que as originais. Já nas partículas obtidas com gelatina/κ-carragena a 50 °C ocorreu quebra da estrutura original obtendo-se partículas menores.

Na temperatura mais elevada utilizada (80 °C), nas partículas obtidas com os pares poliméricos gelatina/goma arábica e gelatina/pectina, observou-se a formação de estruturas

maiores e mais esféricas do que as originais. Além disso, a maior parte das partículas do meio se aglomeraram e ficaram na superfície do meio após repouso. Para as demais amostras, observa-se a formação de aglomerados com tamanhos bem maiores do que as partículas originais.

Comunian et al. (2016) observaram destruição da parede em microcápsulas de óleo de *Echium* produzidas com gelatina/goma arábica e gelatina/goma de cajueiro a 40 °C. No presente trabalho as partículas foram resistentes até a temperatura de 40 °C e não foi observada a destruição das paredes. A interação dos compostos fenólicos presentes no extrato de canela com o material de parede das partículas pode contribuir para aumentar a resistência dessas estruturas, o que explica esse resultado.

Os resultados obtidos indicam que as micropartículas contendo extrato de canela podem ser aplicadas em alimentos em temperaturas abaixo daquelas normalmente utilizadas para tratamento térmico. Portanto, a etapa do processo onde as partículas serão adicionadas é um parâmetro importante a ser definido.

Figura 22 – Morfologia das partículas após congelamento/descongelamento em meio aquoso, e após contato com meios aquosos nas temperaturas de 25, 50 e 80 °C. Aumento das imagens de 100 vezes e barras da escala de 100 µm.

Fonte: Própria autoria.

4.11.3 Concentração de sal

A concentração de sal no meio pode alterar a força iônica o que pode influenciar a estrutura dos coacervados formados pela interação entre proteínas e polissacarídeos. Foram testadas diferentes concentrações de sal (0, 1, 3 e 5%) no meio onde as partículas do extrato de canela encapsulado foram colocadas em contato e os resultados podem ser vistos na Figura 23.

As partículas obtidas com gelatina/pectina, gelatina/goma de cajueiro e gelatina/carragena foram as mais resistentes ao aumento na concentração de sal do meio, não apresentando mudanças significativas na estrutura. Nas amostras com gelatina/goma arábica e gelatina/CMC, observa-se a diminuição da cobertura polimérica em volta do extrato de canela, porém isso não parece comprometer a estrutura uma vez que visualmente, o extrato permanece encapsulado.

Comunian et al. (2016) observaram que cápsulas contendo óleo de Echium quando produzidas com gelatina/goma arábica, foram resistentes ao aumento na concentração de sal. Porém, quando utilizaram gelatina/goma de cajueiro observaram a perda da estrutura das partículas. Como esses autores relataram, as partículas que foram resistentes ao aumento no conteúdo de sal no meio, têm potencial para serem aplicadas em diversos produtos alimentícios, uma vez que concentrações de sal de 3 e 5% já são consideradas bastante elevadas em diversos alimentos.

Figura 23 – Morfologia das partículas após contato com meios aquosos contendo 0, 1, 3 e 5% de cloreto de sódio (NaCl). Aumento das imagens de 100 vezes e barras da escala de 100 μm .

Fonte: Própria autoria.

4.11.4 Concentração de açúcar

Foram testadas concentrações de sacarose de 1, 10 e 20% no meio onde as partículas do extrato de canela foram colocadas. Segundo Comunian et al. (2016), algumas moléculas de carboidratos de baixo peso molecular podem alterar o grau de hidratação de proteínas e polissacarídeos o que poderia afetar a estrutura das partículas obtidas com esses materiais.

No entanto, não foram observadas alterações na estrutura das partículas obtidas pela encapsulação do extrato de canela por coacervação complexa utilizando gelatina e diferentes polissacarídeos. Tal fato indica que as amostras foram resistentes ao aumento no conteúdo de sacarose no meio e apresentam potencial para aplicação em diversos produtos com diferentes concentrações de açúcar. Resultados semelhantes foram obtidos por Comunian et al. (2016) para microcápsulas de óleo de *Echium* obtidas por coacervação complexa com gelatina/goma arábica e gelatina/goma de cajueiro.

Os resultados obtidos nas análises do comportamento das partículas sob condições de stress permitem afirmar que essas amostras podem ser utilizadas como ingredientes em uma vasta gama de produtos mantendo sua estrutura estável.

4.12 Estabilidade das proantocianidinas e fenólicos durante a estocagem

Na estocagem, as partículas em pó contendo extrato de canela estão sujeitas às condições do ambiente, como temperatura e umidade relativa, que podem comprometer sua conservação, uma vez que tais condições podem favorecer a degradação dos compostos sensíveis presentes nesse extrato. Dessa forma, foi avaliada a degradação das proantocianidinas e fenólicos totais nas partículas durante o período de estocagem de 120 dias, a 25 e 37 °C e 32,8% de umidade relativa.

Como pode ser observado na Figura 24, ocorre maior degradação tanto das proantocianidinas quanto dos fenólicos em todas as amostras nos primeiros 45 dias de estocagem, sendo que após esse período, a estabilidade desses compostos é maior. Isso está relacionado com a degradação desses compostos presentes na superfície das partículas, que estão mais susceptíveis ao contato com oxigênio e umidade que favorecem a sua degradação. Esse comportamento também foi observado por Tonon, Brabet e Hubinger (2010) para antocianinas de açaí em partículas obtidas por *spray drying* com diferentes agentes carreadores.

Na temperatura de 37 °C é observada queda mais acentuada na quantidade dos compostos nos dias iniciais em comparação com as amostras estocadas a 25 °C. Esse resultado é esperado tendo em vista que a temperatura mais elevada deve aumentar a degradação de compostos termosensíveis como os fenólicos. Isso também foi observado por Tonon, Brabet e Hubinger (2010) para antocianinas de açaí em partículas obtidas por *spray drying* e também por Tulini et al. (2016) para proantocianidinas de canela do Ceilão encapsuladas em partículas lipídicas sólidas por *spray chilling*.

As porcentagens de proantocianidinas e fenólicos totais que foram mantidas nas partículas do extrato de canela após 120 dias de estocagem estão mostradas na Figura 25.

Figura 24 – Concentração total de proantocianidinas e fenólicos durante estocagem das partículas contendo extrato de canela encapsulado. (a) proantocianidinas totais, estocagem a 25 °C e 32,8% UR; (b) proantocianidinas totais, estocagem a 37 °C e 32,8% UR; (c) fenólicos totais, estocagem a 25 °C e 32,8% UR; (d) fenólicos totais, estocagem a 37 °C e 32,8% UR. Partículas: -○- (GEL/GA); -■- (GEL/PEC); -▲- (GEL/GC); -▼- (GEL/CMC); -◇- (GEL/CARR).

Fonte: Própria autoria.

As partículas produzidas com gelatina/CMC, foram as que mais perderam os compostos encapsulados durante a estocagem. As outras amostras mantiveram o conteúdo dos compostos fenólicos avaliados no mínimo acima de 60% do conteúdo inicial.

Pode ser observado que as micropartículas obtidas com o par polimérico gelatina/ κ -carragena foram as que mantiveram o maior teor dos compostos estudados após o período de estocagem, mesmo na temperatura mais elevada, ficando com cerca de 80% do conteúdo inicial. Esse sistema, portanto, é o mais indicado para a encapsulação do extrato de canela por garantir maior estabilidade dos compostos bioativos durante a estocagem. Esse resultado

poderia ser explicado pela baixa higroscopicidade apresentada por essas partículas (1,8 g de água/100 g de amostra seca), valor menor do que as outras amostras. Tendo a capacidade de adsorver umidade reduzida, a amostra será mais estável uma vez que o meio com maior conteúdo aquoso está mais susceptível à degradação por diversas reações.

Figura 25 – Porcentagem remanescente de proantocianidinas e fenólicos totais após 120 dias de estocagem. (a) proantocianidinas totais, estocagem a 25 °C e 32,8% UR; (b) proantocianidinas totais, estocagem a 37 °C e 32,8% UR; (c) fenólicos totais, estocagem a 25 °C e 32,8% UR; (d) fenólicos totais, estocagem a 37 °C e 32,8% UR.

Fonte: Própria autoria.

4.13 Liberação dos compostos encapsulados

A microencapsulação pode promover além do aumento da estabilidade de compostos sensíveis, sua liberação controlada nos locais onde serão absorvidos ou em seus sítios de ação. Segundo Mateos-Martín et al (2012b), após a ingestão, os monômeros e dímeros de flavan-3-

ols são absorvidos no intestino delgado e convertidos em diversos metabólitos no fígado; esses produtos passam pela corrente sanguínea sendo mais tarde excretados na urina, ou retornam via bile ao intestino delgado. Já as proantocianidinas que não são absorvidas no intestino delgado, chegam intactas no cólon onde serão despolimerizadas e fermentadas pela microbiota, gerando produtos que irão seguir o mesmo caminho daqueles absorvidos no intestino. Dessa forma é importante avaliar a capacidade das partículas obtidas por coacervação complexa contendo extrato de canela, em liberar as proantocianidinas e compostos fenólicos totais. Assim, foram realizados testes de liberação *in vitro* em sistemas contendo fluídos gástrico e intestinal simulados e os resultados para a liberação das proantocianidinas e fenólicos totais estão apresentados nas Figuras 26 e 27, respectivamente.

Figura 26 – Porcentagem liberada de proantocianidinas das partículas de extrato de canela encapsulado, em fluidos gástrico e intestinal simulados. (a) fluido gástrico simulado; (b) fluido intestinal simulado. Amostras das partículas: -■- (GEL/GA); -●- (GEL/PEC); -△- (GEL/GC); -▼- (GEL/CMC); -◇- (GEL/CARR).

Figura 26 – Continuação.

Fonte: Própria autoria.

Todos as micropartículas contendo extrato de canela encapsulado com os diferentes materiais de parede, apresentaram perfil semelhante, com rápida liberação dos compostos nos primeiros 30 minutos do processo seguido de liberação mais lenta até o fim do processo. Em alguns casos, havendo até diminuição ou atingindo-se o equilíbrio na quantidade dos compostos liberados. Perfis de liberação semelhantes foram observados por Santiago-Adame et al. (2015) para o extrato de canela encapsulado em partículas produzidas por *spray drying*. E por Belščak-Cvitanović et al. (2011) para os compostos polifenólicos de extratos vegetais encapsulados em micropartículas de alginato e quitosana. Esses autores avaliaram a liberação em meio aquoso.

É provável que o mecanismo de liberação dos compostos nas partículas contendo extrato de canela encapsulado aconteça por meio da dissolução da parede, ou degradação da partícula. Segundo Comunian e Favaro-Trindade (2016), a adição de solventes em partículas

produzidas por coacervação complexa podem contribuir para a degradação dessas partículas, devido, por exemplo, ao pH do meio, pois variações nesses valores irão alterar a solubilidade dos polímeros que compõem as partículas. Vale ressaltar, que além do pH, a presença de proteases nos fluidos gástrico e intestinal simulados, utilizados no presente trabalho, pode contribuir também para a dissolução das partículas, uma vez que essas possuem gelatina em sua composição.

Figura 27 - Porcentagem liberada de fenólicos das partículas de extrato de canela encapsulado, em fluidos gástrico e intestinal simulados. (a) fluido gástrico; (b) fluido intestinal. Amostras das partículas: -■- (GEL/GA); -●- (GEL/PEC); -△- (GEL/GC); -▼- (GEL/CMC); -◇- (GEL/CARR).

Figura 27 - Continuação

Fonte: Própria autoria.

No presente trabalho, as proantocianidinas e os fenólicos totais foram detectados tanto no fluido gástrico quanto no fluido intestinal simulados. Como comentado, as enzimas, principalmente as proteases presentes nos dois meios podem contribuir para degradar a cobertura polimérica, liberando o extrato encapsulado. Além disso, em pH baixo como o fluido gástrico simulado, muitas das amostras estudadas perdem sua estrutura como foi visto no ensaio de resistência à variação de pH (Seção 4.11.1). No caso específico das proantocianidinas, pode ocorrer despolimerização em meio ácido o que seria desejável pois moléculas menores chegariam ao intestino no tamanho ideal para serem absorvidas. E de qualquer forma, os compostos fenólicos não são instáveis em meios ácidos (SCHWARTZ; VON ELBEE; GIUSTI, 2010).

A amostra que apresentou resultado diferente e mais interessante em relação às demais, foi a produzida utilizando o sistema com goma arábica/ κ -carragena. Como pode ser

observado na Figura 27, em fluido gástrico simulado os fenólicos totais são liberados até quantidade próxima a 40% em relação ao total. Já no fluido intestinal simulado ocorreu liberação acima de 60% do conteúdo total desses compostos após 180 min, sendo que o perfil de liberação indica que há continuidade no processo para essa amostra. Dessa forma, as partículas obtidas com gelatina/ κ -carragena mostraram-se como bom sistema para liberação controlada de compostos fenólicos no intestino.

4.14 Aplicação das partículas em sorvete

Após a obtenção do extrato de canela do Ceilão rico em proantocianidinas e sua encapsulação por coacervação complexa utilizando diferentes materiais encapsulantes, foram selecionados duas das amostras das partículas obtidas para serem aplicadas em sistema alimentício modelo, a fim de avaliar se o processo de encapsulação foi eficiente em mascarar as características sensoriais indesejáveis do extrato de canela, como o sabor forte e a sensação de adstringência.

Como sistema modelo foi utilizado o sorvete de creme e as amostras escolhidas para a aplicação foram as partículas obtidas com o par polimérico gelatina/goma arábica, por ser o par clássico para a encapsulação de compostos por coacervação complexa e também as partículas obtidas com o sistema gelatina/ κ -carragena, por ter sido o que apresentou os melhores resultados de estabilidade durante a estocagem e como sistema de liberação controlada de fenólicos. Essas amostras foram comparadas com a do extrato atomizado livre, sendo as três aplicadas no sorvete. As amostras de sorvete obtidas, bem como suas estruturas microscópicas podem ser observadas na Figura 28.

Figura 28 – Amostras de sorvete de creme contendo extrato de canela livre e encapsulado e microscopias ópticas das amostras correspondentes. **(a)** sorvete com extrato de canela livre. **(b)** sorvete com as partículas de gelatina/goma arábica. **(c)** sorvete com as partículas de gelatina/ κ -carragena. Aumento das microscopias de 100 vezes e barra da escala de 100 μm .

Fonte: Própria autoria.

As partículas apresentaram boa dispersão no sorvete com presença de poucos aglomerados e a amostra contendo o extrato livre (Figura 28 a) apresentou coloração castanha mais intensa do que as demais amostras. Nas microscopias dos sorvetes aparecem grande

quantidade de bolhas de ar, o que é esperado para o produto cuja aeração é uma das principais características. As partículas de extrato livre se dissolveram ou dispersaram no sorvete e por serem muito pequenas não foi possível visualizá-las. Nas imagens da estrutura microscópica dos dois sorvetes contendo o extrato de canela encapsulado foi possível visualizar a presença das partículas na massa e nota-se que essas mantiveram sua estrutura. Como foi mostrado anteriormente, as partículas contendo extrato de canela obtidas por coacervação complexa foram resistentes às condições encontradas no sorvete (pH 6, processo de congelamento/descongelamento e alto teor de açúcar), sendo esse meio então adequado para ser utilizado como sistema modelo.

4.15 Avaliação sensorial

Com o objetivo de avaliar o real efeito do processo de microencapsulação em mascarar as características sensoriais indesejáveis do extrato de canela, foram realizados testes sensoriais com provadores selecionados utilizando as amostras dos extratos encapsulados e a amostra do extrato livre misturada mecanicamente com os polímeros usados na encapsulação na mesma proporção e concentração das amostras encapsuladas.

Em um grupo de 44 provadores recrutados, 23 foram selecionados quanto sua sensibilidade à sensação de adstringência do extrato de canela. Dentre os provadores selecionados, 15 compareceram ao dia do teste com as amostras de extrato livre e encapsulado. Segundo Meilgaard, Civille e Carr (1999), no teste de comparação pareada bicaudal ao nível de 5% de significância e 15 provadores, a resposta deve conter no mínimo 12 provadores que escolham uma das duas amostras para que possa haver diferença significativa entre elas.

Como pode ser observado na Tabela 19, com relação à sensação de adstringência a maioria dos provadores indicou a amostra contendo o extrato de canela livre como sendo a que causa a maior sensação de adstringência. E com relação ao sabor intenso de canela, 100%

dos provadores indicaram a amostra contendo o extrato livre, como a que possui o sabor mais forte. Isso mostra que o processo de encapsulação utilizando gelatina/goma arábica e gelatina/κ-carragena por coacervação complexa foi capaz de mascarar as características indesejáveis no extrato de canela do Ceilão. Resultados semelhantes foram observados por Mendanha et al. (2009), ao concluírem que o processo de coacervação complexa utilizando proteína isolada de soja/pectina para encapsular hidrolisado de caseína conseguiu mascarar o gosto amargo desse ingrediente em comparação com a amostra não encapsulada. Tulini et al. (2016) também observaram que a encapsulação do extrato de canela do Ceilão em micropartículas lipídicas sólidas, foi capaz de mascarar o sabor e a sensação de adstringência do extrato.

Tabela 19 – Avaliação sensorial das amostras de sorvete contendo extrato de canela livre e encapsulado por coacervação complexa utilizando gelatina/goma arábica (GEL/GA) e gelatina κ-carragena (GEL/CARR).

Par de amostras testado	Mais adstringente			Sabor mais intenso		
	Livre	GEL/GA	GEL/CARR	Livre	GEL/GA	GEL/CARR
Livre x GEL/GA	14	1		15	0	
Livre x GEL/CARR	15		0	15		0

Os resultados foram expressos como número de provadores selecionados que classificaram cada amostra como apresentando maior sensação de adstringência e sabor mais intenso de canela.

Fonte: Própria autoria.

O teste de comparação pareada foi repetido com as amostras de sorvete contendo os extratos livre e encapsulados utilizando os mesmos provadores selecionados. Nessa avaliação, 100% dos provadores indicaram que a amostra contendo o extrato de canela livre apresentou o sabor mais intenso de canela. Porém, os provadores não perceberam sensação de adstringência em nenhuma das amostras de sorvete. Isso pode ser explicado pela matriz complexa do sorvete que também deve ter contribuído para mascarar essa sensação. A

encapsulação, então, também foi capaz de mascarar o sabor intenso de canela mesmo com os extratos aplicados no produto alimentício.

As amostras de sorvete contendo os extratos de canela livre e encapsulados foram submetidas também ao teste afetivo de aceitação sensorial e intenção de compra, a fim de avaliar as preferências de um grupo de provadores não selecionados. Nessa avaliação foram utilizados 117 provadores não treinados os quais foram solicitados a provar e avaliar as amostras de sorvete quanto a suas características e também a intenção de compra. Os resultados para a aceitação sensorial dos sorvetes estão apresentados na Tabela 20. O número de provadores utilizados está de acordo ao proposto por Hough et al. (2006) que indicam número mínimo de 112 provadores a serem utilizados em testes de aceitabilidade sensorial.

Tabela 20 – Aceitação sensorial do sorvete contendo extrato de canela livre e as partículas do extrato encapsulado por coacervação complexa utilizando os pares gelatina/goma arábica e gelatina/κ-carragena.

Atributo sensorial	Tratamentos		
	Extrato livre	Partícula GEL/GA	Partícula GEL/CARR
Aroma	7,1 ± 1,4 ^a	7,2 ± 1,3 ^a	7,1 ± 1,4 ^a
Cor	7,4 ± 1,3 ^a	7,6 ± 1,2 ^a	7,5 ± 1,2 ^a
Textura	6,6 ± 1,7 ^{a, b}	7,1 ± 1,5 ^a	6,6 ± 1,5 ^b
Sabor	6,9 ± 1,8 ^b	7,5 ± 1,4 ^a	7,7 ± 1,1 ^a
Aceitação global	7,1 ± 1,5 ^b	7,5 ± 1,1 ^a	7,4 ± 1,1 ^{a, b}

Média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha, apresentam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Observa-se que não houve diferença estatística significativa entre os julgamentos dos provadores em relação aos atributos de aroma, cor e textura entre as amostras do sorvete contendo o extrato de canela encapsulado em comparação com a amostra contendo o extrato livre. Com relação ao sabor houve diferença significativa entre as amostras, sendo que os provadores gostaram mais do sabor nas amostras de sorvete contendo o extrato encapsulado,

com notas de 7,5 e 7,7 entre as avaliações “gostei moderadamente” e “gostei muito”. Com relação à aceitação global do sorvete, a amostra com o extrato encapsulado em gelatina/goma arábica apresentou maior aceitação, mas não foi diferente estatisticamente da amostra produzida com gelatina/ κ -carragena.

Como pode ser visto na Figura 29, as amostras contendo o extrato de canela encapsulado apresentaram melhor avaliação com relação à intenção de compra. Essas amostras obtiveram as maiores quantidades de avaliações “certamente compraria” e “provavelmente compraria” e não foram avaliadas por nenhum provador como “certamente não compraria”. Diferentemente, a amostra contendo extrato livre, apesar de também ter sido bem avaliada e apresentar alta intenção de compra pelos provadores, apresentou também o maior número de avaliações “provavelmente não compraria” e foi a única amostra que apresentou avaliações “certamente não compraria”.

Figura 29 – Intenção de compra dos provadores em relação as amostras de sorvete contendo extrato de canela livre e encapsulado.

Fonte: Própria autoria.

Os resultados obtidos permitem inferir que a encapsulação do extrato de canela, ao mascarar as características sensoriais indesejáveis desse extrato, contribui para o aumento na aceitação do sorvete e também aumenta a intenção de compra desses produtos pelos consumidores.

É importante lembrar que a massa de partículas adicionadas no sorvete foi baseada na quantidade de canela em pó que seria necessária para garantir benefícios à saúde do consumidor. Nesse caso, seriam necessárias 1 g de canela em pó em uma bola de sorvete de 60 g (1 porção). No caso das partículas produzidas com gelatina/goma arábica e gelatina/ κ -carragena, seriam necessárias 0,33 e 0,24 g de partículas em uma bola de sorvete, respectivamente. Sendo assim, seria possível obter um produto funcional capaz de proporcionar os mesmos benefícios à saúde associados à capacidade antioxidante, anti-diabetes e outros efeitos fisiológicos, sem apresentar as características sensoriais indesejadas da matéria-prima.

5 Conclusões

Foi obtido extrato de canela do Ceilão em condições otimizadas que garantiram alto conteúdo de proantocianidinas. O extrato apresentou alta capacidade antioxidante e de inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase.

O extrato de canela rico em proantocianidinas foi encapsulado com sucesso através da técnica de coacervação complexa utilizando gelatina e diferentes polissacarídeos como materiais de parede. As partículas de extrato encapsulado apresentaram altos valores de rendimento e eficiência de encapsulação. Apresentaram formatos irregulares e características como umidade, atividade de água, higroscopicidade, solubilidade e tamanho de partículas variadas a depender dos materiais encapsulantes.

As partículas de extrato encapsulado apresentaram resistência quando submetidas a diversas condições de stress e garantiram boa estabilidade dos compostos fenólicos encapsulados durante a estocagem, principalmente nas partículas obtidas com gelatina/ κ -carragena. Esses materiais também se mostraram como alternativa para a obtenção de um bom sistema de liberação controlada de compostos fenólicos.

O processo de encapsulação foi capaz de mascarar as características sensoriais indesejadas do extrato de canela, como sabor forte e sensação de adstringência que é causada pelas proantocianidinas.

O extrato de canela rico em proantocianidinas e encapsulado pela técnica de coacervação complexa apresenta enorme potencial para ser utilizado como ingrediente funcional, capaz de promover benefícios à saúde associados à capacidade antioxidante, anti-diabetes dentre outros efeitos fisiológicos.

Sugestões para trabalhos futuros

- Estudar mais a fundo as interações entre os fenólicos do extrato de canela e os materiais de parede utilizados na encapsulação por coacervação complexa.
- Utilizar o extrato de canela não apenas como núcleo, mas como reticulante, comparando com os reticulantes mais utilizados.
- Modificar quimicamente as gomas de cajueiro e tamarindo através de carboximetilação e avaliar a capacidade de formação de complexo com proteínas e encapsulação por coacervação complexa.

Referências

- ABRAHAM, K. et al. Toxicology and risk assessment of coumarin: Focus on human data. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, p. 228–239, 2010.
- ADISAKWATTANA et al. Inhibitory activity of cinnamon bark species and their combination effect with acarbose against intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 66, p. 143-148, 2011.
- ALI, H.; HOUGHTON, P.J.; SOUMYANATH, A. Alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, n.3, p.449-455, 2006.
- ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 1069-1076, 2010.
- AMARANTE, R. C. A. et al. Oil extraction from castor cake using ethanol: kinetics and thermodynamics. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 53, p. 6824–6829, 2014.
- ANDERSON, R. A. et al. Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 65-70, 2004.
- ANDRY, M. C. et al. Proanthocyanidin microcapsules: Preparation, properties and free radical scavenging activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 171, p. 217–226, 1998.
- ANHÊ, F. F. Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. **Pharma Nutrition**, v. 1, p. 105–114, 2013.
- ANVARI, M.; CHUNG, D. Dynamic rheological and structural characterization of fish gelatina-Gum arabic coacervate gels cross-linked by tannic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 516-524, 2016.
- ARES, G. et al. Alternatives to reduce the bitterness, astringency and characteristic flavor of antioxidant extracts. **Food Research International**, v. 42, p. 871–878, 2009.
- ARSHADY, R. Microcapsules for food. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 10, n. 4, p. 413-435, 1993.
- AUGUSTIN, M. A.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 902–912, 2009.
- AVANESYAN, A. A. et al. Antiradical activity of cinnamic acid derivatives. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 43, n. 5, p. 249-250, 2009.
- BARUAH, A.; NATH, S. C. Indian cassia. In: BABU, K. N.; RAVINDRAN, P. N.; SHYLAJA, M. (Ed.) **Cinnamon and cassia – the genus *Cinnamomum***. CRC Press, 2004.

BEECHER, G. R. Proanthocyanidins: biological activities associated with human health. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, Supplement, p. 2–20, 2004.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, et al. Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. **Food Research International**, v. 44, p. 1094–1101, 2011.

BEMILLER, J. N.; HUBER, K. C. Carboidratos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 75-130, 2010.

BENNICK, A. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 13, n.2, p. 184-196, 2002.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, n.1, p. 25-31, 1995.

BRASIL. Resolução - RDC nº. 359, de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 23 de dezembro de 2003.

BUCIC-KOJIC, A. et al. Temperature-dependent kinetics of grape seed phenolic compounds extraction: Experiment and model. **Food Chemistry**, 136, 1136–1140, 2013.

BUFFO, R. A.; REINECCIUS, G.A.; OEHLERT, G. W. Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acacia in beverage emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 53-66, 2001.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, p. 1523-1527, 2009.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 379–389, 2003.

CAI, Y.Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v.65, n.6, p.1248-1252, 2000.

CAO, H.; POLANSKY, M. M.; ANDERSON, R. A. Cinnamon extract and polyphenols affect the expression of tristetraprolin, insulin receptor, and glucose transporter 4 in mouse 3T3-L1 adipocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 459, p. 214–222, 2007.

CHENG, D. M. et al. *In vivo* and *in vitro* antidiabetic effects of aqueous cinnamon extract and cinnamon polyphenol-enhanced food matrix. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2994–3002, 2012.

CHEN, L. et al. Diverse mechanisms of antidiabetic effects of the different procyanidin oligomer types of two different cinnamon species on *db/db* mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9144–9150, 2012.

CHUNG, C.; MCCLEMENTS, D. J. Controlling microstructure and physical properties of biopolymer hydrogel particles through modulation of electrostatic interactions. **Journal of Food Engineering**, 158, 13–21, 2015.

COMUNIAN, T. A. et al. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52, p. 373–379, 2013.

COMUNIAN, T. A. et al. Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 319–329, 2016.

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.

DAI, R. et al. Gelatin/carboxymethylcellulose/dioctyl sulfosuccinate sodium microcapsule by complex coacervation and its application for electrophoretic display. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 362, p. 84–89, 2010.

DAKER, M. et al. Inhibitory effects of *Cinnamomum burmannii* Blume stem bark extract and *trans*-cinnamaldehyde on nasopharyngeal carcinoma cells; synergism with cisplatin. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 5, p. 1701–1709, 2013.

DANIELS, R.; MITTERMAIER, E. M. Influence of pH adjustment on microcapsules obtained from complex coacervation of gelatin and acacia. **Journal of microencapsulation**, v. 12, n. 6, p. 591–599, 1995.

DAO, N. K. Chinese cassia. In: BABU, K. N.; RAVINDRAN, P. N.; SHYLAJA, M. (Ed.) **Cinnamon and cassia – the genus *Cinnamomum***. CRC Press, 2004.

DAVIS, R. M. Carboxymethylcellulose. In: Tracton, a. a. (Ed.) **Coatings Technology Handbook, Third Edition**. CRC Press, p. 67-1 – 67-4, 2005.

DAYANANDA, K. R.; SENANAYAKE, U. M.; WIJESSEKERA, R. O. B. Harvesting, processing, and quality assessment of cinnamon products. In: BABU, K. N.; RAVINDRAN, P. N.; SHYLAJA, M. (Ed.) **Cinnamon and cassia – the genus *Cinnamomum***. CRC Press, 2004.

DE KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; DE VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, p. 340–349, 2004.

DELADINO, L. et al. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 126–134, 2008.

DE PAULA, R. C. M.; HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Characterization of *Anacardium occidentale* Exudate Polysaccharide. **Polymer International**, v. 45, p. 27–35, 1998.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p. 1361–1394, 2005.

DETERS, A. et al. High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from *Hamamelis virginiana* bark: influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin. **Phytochemistry**, v. 58, p. 949–958, 2001.

DEVI, N.; MAJI, T. K. Genipin crosslinked microcapsules of gelatina A and κ -carrageenan polyelectrolyte complex for encapsulation of Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss.) seed oil. **Polymer Bulletin**, v. 65, p. 347–362, 2010.

DE VOS, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 292–302, 2010.

DIMA, C. et al. Microencapsulation of essential oil of pimento [*Pimenta dioica* (L) Merr.] by chitosan/ κ -carrageenan complex coacervation method. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 22, p. 203–211, 2014.

DONG, Z. et al. Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n.3, p. 455–460, 2011.

DONG, X. Q. et al. Preparation of A-type proanthocyanidin dimers from peanut skins and persimmon pulp and comparison of the antioxidant activity of A-type and B-type dimers. **Fitoterapia**, v. 91, p. 128–139, 2013.

EASTMAN, J. E.; MOORE, C. O. Cold water soluble granular starch for gelled food composition. **U.S. Patent 4465702**, 1984.

EDELMANN, A. et al. Rapid Method for the Discrimination of Red Wine Cultivars Based on Mid-Infrared Spectroscopy of Phenolic Wine Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1139–1145, 2001.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 510–523, 2010.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>. Acesso em jun. 2016.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103–112, 2008.

FAWCETT, J. K.; SCOTT, J. E. A rapid and precise method for the determination of urea. **Journal of Clinical Pathology**, v. 13, p. 156–159, 1960.

FERNANDEZ, M. L. Pectin: Composition, Chemistry, Physicochemical Properties, Food Applications, and Physiological Effects. In: CHO, S. S. (Ed.) **Handbook of Dietary Fiber**. CRC Press, p. 566–584, 2001.

FERREIRA, V. L. P.; ALMEIDA, T. C. A.; PETTINELLI, M. L. C. V. Análise Sensorial – Testes Discriminativos e Afetivos. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 1ª edição, 127 p., 2000.

FOO, L. Y. et al. A-type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic p-fimbriated *Escherichia coli*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1225–1228, 2000.

FUJITA, A. et al. Evaluation of phenolic-linked bioactives of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) for antihyperglycemia, antihypertension, antimicrobial properties and cellular rejuvenation. **Food Research International**, v. 77, p. 194–203, 2015.

FUJITA, A. et al. Impact of spouted bed drying on bioactive compounds, antimicrobial and antioxidant activities of commercial frozen pulp of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh). **Food Research International**, v. 54, p. 495–500, 2013

GADKARI, P.V.; BALARAMAN, M. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 122–138, 2015.

GARCÍA-SALDAÑA, J. S. Microencapsulation of sulforaphane from broccoli seed extracts by gelatin/gum arabic and gelatin/pectin complexes. **Food Chemistry**, v. 201, p. 94–100, 2016.

GBASSI, G. K. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp. in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 103–105, 2009.

GHOSHAL, S.; MATTEA, C.; STAPF, S. Inhomogeneity in the drying process of gelatin film formation: NMR microscopy and relaxation study. **Chemical Physics Letters**, v. 485, p. 343–347, 2010.

GIBBS, B. F. et al. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, p. 213–224, 1999.

GOMEZ-ESTACA, J. Encapsulation of an astaxanthin-containing lipid extract from shrimp waste by complex coacervation using a novel gelatine-cashew gum complex. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 155–162, 2016.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 330–347, 2004.

GRUENWALD, J.; FREDER, J.; ARMBRUESTER, N. Cinnamon and Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 822–834, 2010.

GUERRERO, M. S.; TORRES, J. S.; NUÑEZ, M. J. Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: Optimization and modeling. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1311–1318, 2008.

GU, L. et al. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 613–617, 2004.

- GU, L. et al. Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normalphase HPLC–MS fluorescent detection method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4852–4860, 2002.
- GU, L. et al. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7513–7521, 2003.
- GUYOT, S. Flavan-3-ols and proanthocyanidins. In: NOLLET L. M. L.; TOLDRÁ, F. **Handbook of Analysis of Active Components in Functional Foods**. CRC Press, 2012, pp. 317–348.
- HERODEZ, S. S. et al. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. **Food Chemistry**, v. 80, p. 275–282, 2003.
- HO, C. T.; RAFI, M. M.; GHAI, G. Substâncias bioativas: nutracêuticas e tóxicas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 585–609, 2010.
- HOFMANN, T. et al. Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9503–9509, 2006.
- HORUZ, T. I.; MASKAN, M. Effect of cinnamaldehyde on oxidative stability of several fats and oils at elevated temperatures. **Cogent Food & Agriculture**, 1:1071725, 2015.
- HOUGH, G. et al. Number of consumers necessary for sensory acceptability tests. **Food Quality and Preference**, v. 17, p. 522–526, 2006.
- HOWELL, A. B. et al. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2281–2291, 2005.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841–1856, 2005.
- HURST, W. J. Characterization of primary standards for use in the HPLC analysis of the procyanidin content of cocoa and chocolate containing products. **Molecules**, v. 14, p. 4136–4146, 2009.
- IDOWU, T. O. et al. Doubly linked, A-type proanthocyanidin trimer and other constituents of *Ixora coccinea* leaves and their antioxidant and antibacterial properties. **Phytochemistry**, v. 71, p. 2092–2098, 2010.
- IGLESIAS, J. et al. Antioxidant mechanism of grape procyanidins in muscle tissues: Redox interactions with endogenous ascorbic acid and α -tocopherol. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1767–1774, 2012.

JACKSON, R. S. Chemical constituents of grapes and wine. In: JACKSON, R. S. **Wine Science Principles and applications**. 3. Ed. San Diego: Academic Press, p. 271-329, 2008.

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

JEREZ, M. et al. Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. **Food Chemistry**, v. 94, p. 406–414, 2006.

JIANG, X. et al. Analysis of accumulation patterns and preliminary study on the condensation mechanism of proanthocyanidins in the tea plant [*Camellia sinensis*]. **Scientific Reports**, v. 5, n. 8742, p. 1-15, 2015.

JIAO, L. et al. Proanthocyanidins are the major anti-diabetic components of cinnamon water extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 398–405, 2013.

KALMAN, D. S. Gelatin. In: WOLINSKY, I.; DRISKELL, J. A. **Nutritional ergogenic aids**. CRC Press, pp. 105-113, 2004

KANG, B. H. et al. Evaluation of the in vitro anti-hyperglycemic effect of *Cinnamomum cassia* derived phenolic phytochemicals, via carbohydrate hydrolyzing enzyme inhibition. **Plant Foods and Human Nutrition**, v. 69, p.155–160, 2014.

KARVELA, E. et al. Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. **Talanta**, v. 79, p. 1311–1321, 2009.

KEENAN, T. R. Gelatin. In: WISEMAN, M.; KOST, J.; DOMB, A. J. (Ed.) **Handbook of biodegradable polymers**. CRC Press, 1998.

KHAN, A. et al. Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, p. 3215–3218, 2003.

KHANAL, R. C.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. Procyanidin composition of selected fruits and fruit byproducts is affected by extraction method and variety. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8839–8843, 2009.

KIM, J. S.; KWON, C. S.; SON, K.H. Inhibitors of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.64, n.11, p.2458-2461, 2000.

KIMURA, H. et al. Structural analysis of A-type or B-type highly polymeric proanthocyanidins by thiolytic degradation and the implication in their inhibitory effects on pancreatic lipase. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7704–7712, 2011.

KOSTIC, M. D. et al. The kinetics and thermodynamics of hempseed oil extraction by n-hexane. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 679– 686, 2014.

KOUPANTSIS, T.; PAVLIDOU, E.; PARASKEVOPOULOU, A. Glycerol and tannic acid as applied in the preparation of milk proteins e CMC complex coavervates for flavour encapsulation, **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 62-71, 2016.

KRISHNAMOORTHY, B.; REMA, J. End uses of cinnamon and cassia. In: BABU, K. N.; RAVINDRAN, P. N.; SHYLAJA, M. (Ed.) **Cinnamon and cassia – the genus *Cinnamomum***. CRC Press, 2004.

KRUGER, M. J.; DAVIES, N.; MYBURGH, K. H.; LECOUR, S. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research International**, v. 59, p. 41–52, 2014.

KUMAR, A. Cashew gum a versatile hydrophylic polymer: a review. **Current Drug Therapy**, v. 7, p. 2-12, 2012.

KUMAR, K. et al. Enhanced anti-diabetic activity of polyphenolrich de-coumarinated extracts of *Cinnamomum cassia*. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 54–64, 2014.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.; LEHR, C. M. Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for Ω -3 unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. **Journal of microencapsulation**, v. 18, n. 3, p. 347-357, 2001.

LAZARUS, S. A. et al. High performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3693–3701, 1999.

LI, Q. Antioxidant activity of proanthocyanidins-rich fractions from *Choerospondias axillaris* peels using a combination of chemical-based methods and cellular-based assay. **Food Chemistry**, v. 208, p. 309–317, 2016.

LI, Y.; ZHAO, Q.; HUANG, Q. Understanding complex coacervation in serum albumin and pectinmixtures using a combination of the Boltzmann equation and Monte Carlo simulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 544-553, 2014.

LIU, Y. et al. Development of an ionic liquid-based microwave-assisted method for simultaneous extraction and distillation for determination of proanthocyanidins and essential oil in Cortex cinnamomi. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2514–2521, 2012.

LV, Y. et al. Simplified optimization for microcapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between coacervates and the corresponding microcapsule. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 225–233, 2012.

MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; OSSA, E. M. Semi-batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modeling. **Chemical Engineering Science**, 57, 3831 – 3838, 2002.

MARCOMINI, R. F.; SOUZA, D. M. P. F. Caracterização microestrutural de materiais cerâmicos utilizando o programa de processamento digital de imagens Image J. **Cerâmica**, v. 57, p. 100-105, 2011.

MARTIN, J. G. P. et al. Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes. **Journal of Natural Products**, v. 5, p. 27-36, 2012.

MATEOS-MARTÍN, M. L. et al. New identification of proanthocyanidins in cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 1327-1336, 2012a.

MATEOS-MARTÍN, M. L. et al. Profile of urinary and fecal proanthocyanidin metabolites from common cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) in rats. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 56, p. 671–675, 2012b.

MCCUE, P. P.; KWON, Y-I.; SHETTY, K. Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotension I converting enzyme potential of selected foods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, p. 278-294, 2005.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. Boca Raton: CRC Press. 1999, 387 p.

MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 2510–2518, 2012.

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

MEZIANE, S.; KADI, H. Kinetics and thermodynamics of oil extraction from olive cake. **Journal of American Oil Chemical Society**, 85, 391–396, 2008.

MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of natural poly-phenolic compounds: A review. **Pharmaceutics**, v.3, n. 4, p. 793–829, 2011.

NAVEENA, B. M. et al. Use of cinnamaldehyde as a potential antioxidant in ground spent hen meat. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, p. 1911–1917, 2014.

NONAKA, G-I.; MORIMOTO, S.; NISHIOKA, L. Tannins and Related Compounds. Part 13.¹ Isolation and Structures of Trimeric, Tetrameric, and Pentameric Proanthocyanidins from Cinnamon. **Journal of Chemical Society, Perkin Trans**, v.1, p. 2139-2145, 1983.

NORI, M. P. et al. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 429–435, 2011.

OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 146–151, 2014.

ONWULATA, C. I. Encapsulation of new active ingredients. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 183–202, 2012.

PAYNE, M. J. et al. Determination of total procyanidins in selected chocolate and confectionery products using DMAC. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 1, p. 89–96, 2010.

PENG, C. et al. Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation. *Food Chemistry*, v. 165, p. 560–568, 2014.

PEREZ, E. E.; CARELLI, A. A.; CRAPISTE, G. H. Temperature-Dependent Diffusion Coefficient of Oil from Different Sunflower Seeds during Extraction with Hexane. **Journal of Food Engineering**, v. 105, p. 180–185, 2011.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; TORRES, J. L. Analysis of proanthocyanidins in almond blanch water by HPLC–ESI–QqQ–MS/MS and MALDI–TOF/TOF MS. **Food Research International**, 49, 798–806, 2012.

PINHO, E. et al. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 121–135, 2014.

PING, L. et al. Condensed tannins from grape pomace: Characterization by FTIR and MALDI TOF and production of environment friendly wood adhesive. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 13– 20, 2012.

POPPE, J. Gelatin, In: Imeson, a. (Ed.) **Thickening and gelling agents for food**, New York, Blackie Academic & Professional, Cap. 7, p. 144-168, 1997.

PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, v. 25, n.1, p. 223-230, 1986.

RAJHA, H. N. et al. Extraction of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and tannins from grape byproducts by response surface methodology. Influence of solid-liquid ratio, particle size, time, temperature and solvent mixtures on the optimization process. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 397-409, 2014.

RANASINGHE, P. et al. Medicinal properties of ‘true’ cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 275, n. 13, 2013.

RAVINDRAN, P. N.; BABU, K. N. Introduction. In: BABU, K. N.; RAVINDRAN, P. N.; SHYLAJA, M. (Ed.) **Cinnamon and cassia – the genus Cinnamomum**. CRC Press, 2004.

REED, J. D.; KRUEGER, C. G.; VESTLING, M. M. MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2248–2263, 2005.

ROCHA-SELMÍ, G. A. et al. Double emulsion stage prior to complex coacervation process for microencapsulation of sweetener sucralose. **Journal of Food Engineering**, v. 119, p. 28–32, 2013a.

ROCHA-SELMÍ, G. A. et al. Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness. **Food Chemistry**, v.139, p. 72–78, 2013b.

RODRIGUES, C. E. C.; OLIVEIRA, R. Response surface methodology applied to the analysis of rice bran oil extraction process with ethanol. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 813-820, 2010.

RODRIGUES, J. F.; DE PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 1, p. 31-36, 1993.

RODRIGUES, R. A. F.; GROSSO, C. R. F. Cashew gum microencapsulation protects the aroma of coffee extracts. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 1, p. 13–20, 2008.

ROHR, G. E.; MEIER, B.; STICHER, O. Analysis of procyanidins. In: Rahman, A. (Ed.) **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 21, Elsevier Science B.V, p. 497-570, 2000.

SANCHEZ, C. Structure and rheological properties of acácia gum dispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 257-267, 2002.

SANTIAGO-ADAME, R. Spray drying-microencapsulation of cinnamon infusions (*Cinnamomum zeylanicum*) with maltodextrin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 571-577, 2015.

SANTOS, M. G. et al. Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 171, p. 32–39, 2015.

SARAVANAN, M.; RAO, K. P. Pectin–gelatin and alginate–gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 808–816, 2010.

SARKAR, S. K.; HOWARTH, R. E. Specificity of the Vanillin test for flavanols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 317–320, 1976.

SARUBBO, L. A. et al. A goma de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) como sistema inovador de extração líquido-líquido. **Exacta**, v. 5, n. 1, p. 145-154, 2007.

SCHMITT, C.; TURGEON, S. L. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 167, p. 63–70, 2011.

SCHWARTZ, S. J.; VON ELBEE, J. H.; GIUSTI, M. M. Corantes. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 445-498, 2010.

SENANAYAKE, U. M.; WIJESEKERA, R. O. B. Chemistry of cinnamon and cassia. In: BABU, K. N.; RAVINDRAN, P. N.; SHYLAJA, M. (Ed.) **Cinnamon and cassia – the genus *Cinnamomum***. CRC Press, 2004.

SERGEANT, T. et al. Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances. **Food Chemistry**, v. 135, p. 68–73, 2012.

SHAHGHOLIAN, N.; RAJABZADEH, G. Fabrication and characterization of curcumin-loaded albumin/gum arabic coacervate. **Food Hydrocolloids**, v. 59, p. 17–25, 2016.

SHAN, B. et al. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmanii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5484–5490, 2007.

SILVA, D. F. et al. Microencapsulation of lycopene by gelatin–pectin complex coacervation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, p. 185–190, 2012.

SILVA, F. C. et al. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 28–36, 2013.

SILVA, J. A. L.; RAO, M. A. Pectins: Structure, Functionality, and Uses. In: STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Food Polysaccharides and Their Applications**. CRC Press, p. 353–411, 2006.

SINGH, O. N.; BURGESS, D. J. Characterisation of albumin-alginate complex coacervation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 41, p. 670–673, 1989.

SINGLETON, V. L. et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 178–184, 1999.

SITTHICHAI, S. et al. CMC-coated Fe₃O₄ nanoparticles as new MRI probes for hepatocellular carcinoma. **Applied Surface Science**, v. 356, p. 972–977, 2015.

SOUZA, V. B. et al. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 39–50, 2015.

SOUZA, V. B. et al. Functional properties and stability of spray-dried pigments from Bordo grape (*Vitis labrusca*) winemaking pomace. **Food Chemistry**, v. 164, p. 380–386, 2014.

SOVA, M. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 749–767, 2012.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 200–208, 2007.

SPRANGER, I. et al. Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. **Food Chemistry**, v. 108, p. 519–532, 2008.

STORTZ, C. A. Carrageenans: Structural and Conformational Studies. In: Yarema, k. j. **Handbook of Carbohydrate Engineering**. CRC Press, p. 211-246, 2005.

STRAUSS, G.; GIBSON, S. M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. **Food Hydrocolloids**, v.18, p. 81–89, 2004.

TANAKA, T. et al. Structure of polymeric polyphenols of cinnamon bark deduced from condensation products of cinnamaldehyde with catechin and procyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5864–5870, 2008.

TAO, Y.; ZHANG, Z.; SUN, D-W. Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature. **Ultrasonics Sonochemistry**, 21, 1461–1469, 2014.

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

TODA, T. A.; SAWADA, M. M.; RODRIGUES, C. E. C. Kinetics of soybean oil extraction using ethanol as solvent: Experimental data and modeling. **Food and Bioproducts Processing**, 98, 1-10, 2016.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. **Food Research International**, v. 43, p. 907–914, 2010.

TULINI, F. L. et al. Development of solid lipid microparticles loaded with a proanthocyanidin rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*): Potential for increasing antioxidant content in functional foods for diabetic population. **Food Research International**, v. 85, p. 10–18, 2016.

U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service (2004). **USDA database for the proanthocyanidin content of selected foods**. (Nutrient Data Laboratory Home Page). <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>.

WANG, Y-H. et al. Cassia cinnamon as a source of coumarin in cinnamon-flavored food and food supplements in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 4470–4476, 2013.

WANG, Z. et al. 2015. Effect of high pressure treatment on rapeseed protein microparticle properties and gastrointestinal release behavior of the encapsulated peptides. **Food Research International**, v, 77, p. 549-555, 2015.

WATANABE, J. et al. Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.61, n.1, p.177-178, 1997.

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.

- WILLIAMS, A. R. et al. Anthelmintic activity of *trans*-cinnamaldehyde and A- and B-type proanthocyanidins derived from cinnamon (*Cinnamomum verum*). **Scientific Reports**, v. 5, n. 14791, p. 1-12, 2015.
- WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Gum Arabic. In: CHO, S. S. **Handbook of Dietary Fiber**, CRC Press, p. 655-673, 2001.
- WORTHINGTON, V., & Ed. Alpha amylase. **Worthington enzyme manual**. Freehold, NJ: Worthington Biochemical, pp. 36-41, 1993.
- YANG, C. H.; LI, R. X.; CHUANG, L. Y. Antioxidant activity of various parts of *Cinnamomum cassia* extracted with different extraction methods. **Molecules**, v. 17, p. 7294-7304, 2012.
- YE, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 406–415, 2008.
- YILMAZ, E. E.; OZVURAL, E. B.; VURAL, H. Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis vinifera*) using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 924–928, 2011.
- YOU, Q. et al. Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, p. 164-168, 2012.
- YUN, J. W. Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1625–1641, 2010.
- ZHANG, L.; MOU, D.; DU, Y. Procyanidins: Extraction and microencapsulation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 2192–2197, 2007.

APÊNDICE A – Teste preliminar para a escolha do solvente usado na extração das proantocianidinas

Teste para escolha do melhor solvente

Para determinação do melhor solvente para a extração das proantocianidinas, foram obtidos extratos utilizando-se a proporção de sólido (canela da China em casca triturada) e solvente de 1:10. Como solventes, foram testados água destilada e etanol aquoso em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 99,5 (absoluto)). O sólido e os solventes foram colocados em contato em tubos com rosca e mantidos em banho-maria a 60°C durante 50 minutos com agitações ocasionais. Os tubos foram centrifugados a 4°C por 5 minutos a 2935 g e os sobrenadantes (extratos) foram coletados. O experimento foi repetido duas vezes e os extratos obtidos são apresentados na Figura A1.

Os extratos apresentaram coloração castanho-avermelhada com diferentes tons a depender do solvente utilizado.

Figura A1 - Extratos obtidos a partir do extrato de canela da China (*C. cassia*) obtidos com diferentes solventes. (a) com água destilada; (b) com etanol 10%; (c) com etanol 20%; (d) com etanol 30%; (e) com etanol 40%; (f) com etanol 50%; (g) com etanol 60%; (h) com etanol 70%; (i) com etanol 80%; (j) com etanol 90%; (k) com etanol 99,5%.

Fonte: Própria autoria

O teor de proantocianidinas totais foi determinado nos extratos, como descrito no item 3.3. Os resultados estão apresentados na Tabela A1.

Tabela A1 – Teor de proantocianidinas totais utilizando diferentes solventes, durante 50 min a 60°C com agitações ocasionais.

Solvente	Proantocianidinas totais (mg eq procianidina B2/g de extrato)*
Água	2,75 ± 0,1 ^H
10% EtOH	4,62 ± 0,1 ^F
20% EtOH	5,77 ± 0,2 ^D
30% EtOH	5,88 ± 0,1 ^{C, D}
40% EtOH	6,58 ± 0,0 ^{A, B}
50% EtOH	6,63 ± 0,0 ^A
60% EtOH	6,56 ± 0,1 ^{A, B}
70% EtOH	6,20 ± 0,2 ^{B, C}
80% EtOH	5,10 ± 0,0 ^E
90% EtOH	4,34 ± 0,1 ^F
99,5% EtOH	3,67 ± 0,0 ^G

* Média ± desvio padrão. Médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Fonte: Própria autoria.

É possível observar que houve tendência de aumento no teor de proantocianidinas nos extratos da água pura até quantidades intermediárias de etanol e após isso, houve diminuição no conteúdo dos compostos nos extratos obtidos com quantidades maiores de etanol. Esses solventes testados apresentaram concentração ótima para a extração de proantocianidinas. As soluções aquosas de etanol em concentrações intermediárias, principalmente o etanol a 50% p/p, garantiram a extração das maiores quantidades desses compostos na canela. A variação na quantidade de etanol implicou na mudança de polaridade do solvente e essa mudança teve grande influência no processo de extração desses compostos da canela. Cacace e Mazza (2003) mostraram que o coeficiente de difusão e consequentemente a difusividade dos compostos fenólicos extraídos de groselha preta aumentou com o aumento da concentração de etanol de 39% até 67%, no entanto diminuiu com o aumento na concentração de etanol de 67% até 95%. Os autores explicaram que o aumento na concentração de etanol reduz a constante dielétrica do solvente e dessa forma, reduz a solvatação das moléculas. Isso pode

explicar o porquê de haver uma concentração ótima de solvente para extração das proantocianidinas da canela utilizando o etanol aquoso em diferentes concentrações.

Baseado nesses ensaios, para dar continuidade ao projeto com os experimentos de extração, foi escolhido o etanol aquoso a 50%, para ser utilizado como solvente.

Referências

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 379–389, 2003.

APÊNDICE B – Seleção da espécie da canela

No início do trabalho houve a possibilidade de trabalhar com a canela da China (*Cinamomum cassia*) que é comercializada no Brasil e seria mais facilmente obtida. No entanto, diversos estudos relatam que a cumarina, presente em grandes quantidades nessa variedade de canela, apresenta efeitos tóxicos, tais como potencial carcinogênico (SENANAYAKE; WIJESEKERA, 2004; KUMAR et al. 2014). Sendo assim, foi realizado estudo preliminar a fim de confirmar a presença da cumarina nas variedades de canela da China (*C. cassia*) e do Ceilão (*C. zeylanicum*) que haviam sido obtidas.

Para esse teste, foi utilizada a canela do Ceilão (*C. zeylanicum*) em casca, importada do Chile, da Empresa Hela Especias Chile S.A. (Santiago, Chile), que a obtém do Sri Lanka. Canela da China (*C. cassia*) em casca foi obtida no comércio local (Pirassununga, Brasil). Como solvente para a extração, foi utilizado o etanol (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, Brasil).

Foram obtidos extratos das duas variedades de canela utilizando-se a proporção de sólido (canela em casca triturada) e solvente de 1:10. Como solvente foi utilizado o etanol aquoso 50 % (p/p). O sólido e o solvente foram colocados em contato em tubos com rosca e mantidos em banho-maria a 60 °C durante 50 minutos com agitações ocasionais. Os tubos foram então centrifugados a 4 °C por 5 minutos a 2935 g e os sobrenadantes (extratos) foram coletados e analisados por CLAE como descrito na Seção 3.5 do presente trabalho.

Para a confirmação da presença da cumarina foi utilizado o padrão dessa substância (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos). Além disso, a fração suspeita de ser a cumarina foi coletada e analisada em espectrômetro de massas como descrito na Seção 3.6 para a identificação e confirmação.

O resultado da análise do perfil químico das duas variedades de canela pode ser observado na Figura B1. Claramente, o extrato de canela da China apresentou um pico com mesmo tempo de retenção do padrão de cumarina, inclusive em maior intensidade do que a concentração de padrão testada. Por outro lado, a canela do Ceilão não apresentou tal pico.

Figura B1 – Detalhe do perfil químico dos extratos das variedades de canela da China (*C. cassia*) e do Ceilão (*C. zeylanicum*) em comparação com o padrão da cumarina.

Fonte: Própria autoria

Esse pico do extrato de canela da China que apresentou o mesmo tempo de retenção do padrão de cumarina foi coletado com um coletor de frações e analisado em espectrômetro de massas. O espectro de massas obtido para essa fração do extrato de canela da China é apresentado na Figura B2.

Nesse espectro apareceram picos referentes ao composto da fração coletada e também às impurezas do solvente. No entanto, o sinal com 146,52 m/z (razão massa/carga) com maior

intensidade, provavelmente foi devido ao composto de interesse. Esse pico foi selecionado e fragmentado e o resultado dessa fragmentação está apresentado na Figura B3.

Figura B2– Espectro de massas do pico coletado do extrato de canela da China (*C. cassia*).

Fonte: Própria autoria

Shen et al. (2014) analisaram a presença de vanilina, etil vanilina e cumarina em fórmulas infantis, e apresentaram o espectro para a cumarina muito próximo ao encontrado no presente trabalho, para a fração coletada do extrato de *C. cassia*, o que implica que o pico que aparece no cromatograma no extrato da canela da China e não aparece na canela do Ceilão, corresponde ao composto cumarina. A largura dos picos de fragmentação indica ainda que esse composto está presente em grande concentração na fração analisada.

Segundo Yang, Li e Chuang (2012), as cumarinas presentes principalmente em gramíneas podem apresentar diversos efeitos benéficos, tais como potenciais antimicrobiano e anti-inflamatório. No entanto, a maioria dos trabalhos indica que a cumarina presente na canela da China pode ser tóxica quando consumida com regularidade e em grandes quantidades (SENANAYAKE; WIJESEKERA, 2004; KUMAR et al. 2014). Nas etapas seguintes do trabalho, pretendia-se obter o extrato de canela e concentrá-lo, a fim de

encapsular grandes quantidades de proantocianidinas presentes nesse extrato. Dessa forma, como há controvérsias na literatura, enquanto não existirem estudos mais concretos, a variedade de canela da China não será utilizada, tendo em vista a presença de grande quantidade de cumarina, mesmo no extrato antes da concentração. A variedade de canela do Ceilão (*C. zeylanicum*), por não possuir tais compostos, foi então utilizada para a execução das demais etapas do trabalho.

Figura A3 – Fragmentos (íons) correspondentes ao composto presente na fração coletada do extrato de *C. cassia*.

Fonte: Própria autoria

Referências

KUMAR, K.; ISSAC, A.; NINAN, E.; KUTTAN, R.; MALIAKEL, B. Enhanced anti-diabetic activity of polyphenol-rich de-coumarinated extracts of *Cinnamomum cassia*. **Journal of functional foods**, v. 10, p. 54–64, 2014.

SENANAYAKE, U. M.; WIJESEKERA, R. O. B. Chemistry of cinnamon and cassia. In: BABU, K. N.; RAVINDRAN, P. N.; SHYLAJA, M. (Ed.) **Cinnamon and cassia – the genus *Cinnamomum***. CRC Press, 2004.

SHEN, Y. et al. Determination of vanillin, ethyl vanillin, and coumarin in infant formula by liquid chromatography-quadrupole linear ion trap mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 679–686, 2014.

YANG, C. H.; LI, R. X.; CHUANG, L. Y. Antioxidant activity of various parts of *Cinnamomum cassia* extracted with different extraction methods. **Molecules**, v. 17, p. 7294–7304, 2012.

APÊNDICE C – Seleção dos materiais encapsulantes

Materiais testados

Foram testados como materiais encapsulantes os polissacarídeos: goma arábica, pectina, goma de cajueiro, carboximetilcelulose, κ -carragena e goma da semente de tamarindo. Todos esses polímeros foram avaliados pela sua capacidade de formar partículas pela técnica de coacervação complexa juntamente com a gelatina e encapsulando extrato de canela do Ceilão.

Obtenção da goma de tamarindo

A goma da semente de tamarindo, testada como possível material encapsulante, foi obtida seguindo a metodologia proposta por Nayak e Pal (2011), com algumas modificações descritas a seguir: 100 g de sementes de tamarindo limpas foram trituradas e misturadas com 1000 mL de água destilada. O sistema foi aquecido a 80-100 °C com agitação constante até a obtenção de solução viscosa. A solução foi então filtrada quente em tecido, para separar a parte insolúvel. O líquido viscoso resultante foi seco em estufa a 40 °C por 12 h. O material seco foi adicionado em água destilada na proporção de 1:10 obtendo-se uma pasta que em seguida foi adicionada em 4 vezes o volume de água anterior. A solução foi fervida sob agitação, durante 20 min e deixada descansar *overnight*. Em seguida foi centrifugada a 2935 g por 20 min e o sobrenadante foi adicionado sob agitação no dobro do volume de etanol absoluto. O precipitado foi seco *overnight* em estufa a 40 °C e o filme seco foi triturado obtendo-se um pó, que foi acondicionado em frasco de polietileno e selado.

Potencial Zeta dos encapsulantes

Foram produzidas soluções dos materiais encapsulantes estudados, sendo o pH ajustado para valores na faixa de 2 a 8. Foi medido o potencial Zeta dessas amostras em

equipamento Zeta Potential Analyzes da marca BTC – Brookhaven instrument Corporation (Nova York, Estados Unidos).

Potencial de encapsulação do extrato de canela por coacervação complexa

Os polissacarídeos foram testados quanto a sua capacidade em formar complexo com a gelatina e encapsular o extrato de canela. Para isso, utilizou-se a metodologia proposta no item 3.10 sendo avaliada a formação de partículas através da microscopia óptica e também a separação de fases no sistema que ocorre com a decantação das partículas.

Resultados

Seleção dos materiais encapsulantes

Inicialmente foi feita a análise de potencial zeta das soluções de cada polímero a fim de verificar a distribuição das cargas de cada um em diferentes valores de pH. Os resultados podem ser vistos na Figura C1, onde se observa que a gelatina apresentou carga positiva na maior parte da faixa de pH estudada, enquanto os demais materiais apresentaram cargas negativas em toda a faixa de pH estudada. Isso foi indicativo de que os polissacarídeos testados poderiam ser utilizados para formar par polimérico com a gelatina na coacervação complexa. Dessa forma, os materiais foram testados quanto sua capacidade de formar complexo com a gelatina encapsulando o extrato de canela, que era o objetivo do presente trabalho.

A morfologia das micropartículas obtidas utilizando os diferentes pares poliméricos é apresentada na Figura C2. É possível observar claramente a presença do extrato de canela encapsulado nas amostras que continham os polissacarídeos goma Arábica, pectina, goma de cajueiro, CMC e carragena (Figura C2 A-E). Nesses sistemas também é evidente a separação de fases que ocorre com a sedimentação das micropartículas formadas e o sobrenadante

límpido. Isso indica que esses pares poliméricos poderiam ser utilizados para encapsulação do extrato de canela.

Figura C1 – Potencial Zeta das soluções dos polímeros avaliados como possíveis materiais encapsulantes do extrato de canela.

Fonte: Própria autoria

Para o sistema contendo goma da semente de tamarindo (Figura C2 F), pode ser observada a presença de micropartículas formadas, no entanto, não houve separação de fases tão evidente como nas outras amostras. As partículas formadas podem ser resultantes da interação dos compostos fenólicos presentes no extrato de canela com a gelatina presente no sistema. De fato, quando foi realizado o teste apenas utilizando a gelatina e o extrato de canela, pode-se observar a formação de partículas no meio, semelhante àquelas onde havia a goma de tamarindo e também não foi observada clara separação de fases após o tempo de repouso. A goma da semente de tamarindo, nas condições testadas, aparentemente não foi capaz de formar complexo com a gelatina, para encapsular o extrato de canela no meio. Esse polissacarídeo não foi utilizado para os demais ensaios do presente trabalho.

O resultado obtido pelo potencial zeta da goma de tamarindo pode ter sido devido ao fato da goma não estar totalmente purificada e apresentar carga negativa devido a impurezas e

não ao polissacarídeo em si. A goma da semente de tamarindo tem sido estudada como carreador para liberação controlada de fármacos (NAYAK; PAL; SANTRA, 2015). Tem sido utilizada também a reação de modificação através de carboximetilação, o que a torna um polissacarídeo aniônico, aumentando a solubilidade em água fria e estabilidade (KAUR et al. 2012). Essa natureza aniônica da goma de tamarindo modificada poderia possibilitar a formação de complexo com polímeros catiônicos como a gelatina. Isso, no entanto, poderá ser alvo de estudos futuros.

Figura C2 - Morfologia das partículas (aumento de 100X) e separação de fases nos sistemas testados para a encapsulação do extrato de canela por coacervação complexa. (A) gelatina e goma arábica, (B) gelatina e pectina, (C) gelatina e goma do cajueiro, (D) gelatina e carboximetilcelulose, (E) gelatina e k-carragena, (F) gelatina e goma da semente de tamarindo, (G) somente gelatina.

Fonte: Própria autoria

Referências

KAUR, H., AHUJA, M., KUMAR, S., DILBAGHI, N. Carboxymethyl tamarind kernel polysaccharide nanoparticles for ophthalmic drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 833– 839, 2012.

NAYAK, A. K.; PAL, D. Development of pH-sensitive tamarind seed polysaccharide–alginate composite beads for controlled diclofenac sodium delivery using response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 784– 793, 2011.

NAYAK, A. K., PAL, D., SANTRA, K. Screening of polysaccharides from tamarind, fenugreek and jackfruitseeds as pharmaceutical excipients. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 756–760, 2015.

APÊNDICE D: Fichas de avaliação sensorial

Figura D1 – Ficha de avaliação sensorial para seleção de provadores

Nome: _____	Data: __/__/__	Ficha nº: _____
<p>Você está recebendo 3 amostras codificadas. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita, e ordene-as em ordem crescente em relação à SENSÇÃO ADSTRINGÊNCIA.</p>		
_____ menos adstringente	_____	_____ mais adstringente
Comentários: _____		

Fonte: Própria autoria

Figura D2 – Ficha de avaliação sensorial para provadores selecionados no teste de comparação pareada entre o extrato livre misturado mecanicamente com os materiais de parede e as partículas contendo o extrato encapsulado. **(a)** teste para identificação da amostra mais adstringente. **(b)** teste para identificação da amostra com sabor de canela mais intenso.

(a)	Nome: _____ Data: __/__/__ Ficha nº: _____
<p>Você está recebendo 2 amostras codificadas. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita, e escreva o código da amostra mais ADSTRINGENTE.</p>	
_____ Mais adstringente	
Comentários: _____	

(b)	Nome: _____ Data: __/__/__ Ficha nº: _____
<p>Você está recebendo 2 amostras codificadas. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita, e escreva o código da amostra com mais SABOR FORTE DE CANELA.</p>	
_____ Sabor de canela mais forte	
Comentários: _____	

Fonte: Própria autoria

Figura D3 – Ficha de avaliação sensorial para provadores selecionados no teste de comparação pareada entre as amostras de sorvete contendo extrato de canela livre e encapsulado.

Nome: _____	Data: __/__/__	Ficha nº: _____
<p>Você está recebendo 2 amostras codificadas de SORVETE DE CREME COM CANELA. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita, e escreva o código da amostra com mais SABOR INTENSO DE CANELA.</p> <div style="text-align: center; margin: 20px 0;"> <div style="border-top: 1px solid black; width: 200px; margin: 0 auto;"></div> <p>Sabor mais intenso</p> </div> <p>Comentários: _____</p>		

Fonte: Própria autoria

Figura D4 – Ficha de avaliação sensorial para o teste de aceitação e intenção de compra das amostras de sorvete contendo extrato de canela livre e encapsulado.

Nome: _____		Data: _____	Ficha nº: _____																		
<p>Por favor, avalie a amostras de SORVETE DE CREME COM CANELA utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou, em relação ao sabor, textura, cor, aroma e aceitabilidade geral destas. AMOSTRA Nº _____</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">1. Desgostei muitíssimo</td> <td style="width: 50%;">AROMA _____</td> </tr> <tr> <td>2. Desgostei muito</td> <td></td> </tr> <tr> <td>3. Desgostei regularmente</td> <td>COR _____</td> </tr> <tr> <td>4. Desgostei ligeiramente</td> <td></td> </tr> <tr> <td>5. Não gostei nem desgostei</td> <td>TEXTURA _____</td> </tr> <tr> <td>6. Gostei ligeiramente</td> <td></td> </tr> <tr> <td>7. Gostei regularmente</td> <td>SABOR _____</td> </tr> <tr> <td>8. Gostei muito</td> <td></td> </tr> <tr> <td>9. Gostei muitíssimo</td> <td>ACEITABILIDADE GLOBAL _____</td> </tr> </table> <p>Comentários: _____</p> <p>INTENÇÃO DE COMPRA</p> <p>() Certamente compraria</p> <p>() Provavelmente compraria</p> <p>() Talvez compraria</p> <p>() Provavelmente não compraria</p> <p>() Certamente não compraria</p>				1. Desgostei muitíssimo	AROMA _____	2. Desgostei muito		3. Desgostei regularmente	COR _____	4. Desgostei ligeiramente		5. Não gostei nem desgostei	TEXTURA _____	6. Gostei ligeiramente		7. Gostei regularmente	SABOR _____	8. Gostei muito		9. Gostei muitíssimo	ACEITABILIDADE GLOBAL _____
1. Desgostei muitíssimo	AROMA _____																				
2. Desgostei muito																					
3. Desgostei regularmente	COR _____																				
4. Desgostei ligeiramente																					
5. Não gostei nem desgostei	TEXTURA _____																				
6. Gostei ligeiramente																					
7. Gostei regularmente	SABOR _____																				
8. Gostei muito																					
9. Gostei muitíssimo	ACEITABILIDADE GLOBAL _____																				

Fonte: Própria autoria

APÊNDICE E: Termo de consentimento livre e esclarecido

Termo de consentimento livre e esclarecido
De acordo com a Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012
 Consentimento formal de participação no projeto de pesquisa:

“Avaliação sensorial de extrato de canela livre e encapsulado por coacervação complexa aplicado em sorvete”

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ CEP: _____ email: _____

Justificativa: A canela é uma especiaria rica em proantocianidinas que são compostos pertencentes à classe dos flavonoides. As proantocianidinas apresentam efeitos benéficos à saúde, pois possuem atividades anti-diabetes tipo 2, antioxidante, antimicrobiana, entre outras. Porém, para se beneficiar dessas propriedades o consumidor teria que consumir quantidades imensas de canela, o que é difícil, pois trata-se de uma especiaria, e as proantocianidinas provocam sensação indesejável de adstringência quando consumidas, além do sabor amargo e também são muito suscetíveis a reações de oxidação. Uma alternativa para mascarar essa sensação de adstringência e, também, para aumentar a estabilidade desse composto é a técnica de microencapsulação.

Objetivos do projeto: O objetivo desse trabalho foi produzir micropartículas contendo proantocianidinas imobilizadas em uma matriz composta por polímeros naturais (gelatina e alguns polissacarídeos, tais como goma Arábica, pectina, goma do cajueiro, carboximetilcelulose e carragena), que foram os agentes carreadores utilizados na técnica de coacervação complexa, bem como estudar as características das micropartículas obtidas, entre estas, o seu poder de mascarar o sabor amargo e a sensação de adstringência.

Procedimentos:

A análise onde seres humanos avaliam diversos atributos de qualidade de alimentos é chamada de ANÁLISE SENSORIAL. Os procedimentos para execução da análise sensorial nesta pesquisa serão os seguintes:

- Cem provadores farão a avaliação sensorial dos produtos.
- Serão testadas extrato de canela livre e na forma encapsulada com polímeros naturais bem como esses mesmos ingredientes aplicados em sorvete.
- O provador deverá avaliar (provar) os produtos e ordenar as amostras em ordem crescente em relação ao sabor amargo e a sensação de adstringência na Ficha de Avaliação. E informar o quando gostaram ou desgostaram do produto alimentício contendo as cápsulas.
- A duração do teste para cada pessoa será de aproximadamente 10 minutos.
- **Desconfortos e riscos da pesquisa:** Tendo em vista que o extrato de canela é conhecido por causar sensação de adstringência, bem como apresentar sabor amargo, é possível que os provadores sintam desconforto ao provar as amostras, já que esses atributos não são desejados. Sugere-se que façam uso da água que será servida juntamente com as amostras a fim de aliviar o desconforto. Além disso, por se tratar de alimento processado, há sempre o risco de alguma contaminação, seja química física ou microbiológica. Para minimizar esses riscos procurou-se utilizar ingredientes de boa qualidade, bem como realizar a produção levando-se em conta os procedimentos de boas práticas de fabricação. É possível que algumas pessoas sejam alérgicas aos compostos presentes na canela.

- **Benefícios da pesquisa:** ao participar da pesquisa o provador estará contribuindo com o desenvolvimento da mesma, bem como ajudando no avanço do tema na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Outras informações:

- O provador poderá procurar a qualquer momento os responsáveis pela pesquisa caso ocorra algum problema decorrente da ingestão das amostras, para que seja dada a assistência adequada.
- O provador pode se recusar a continuar com a avaliação sensorial a qualquer momento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- Serão mantidos o sigilo e a privacidade dos participantes durante todas as fases da pesquisa;
- Os provadores têm o direito a uma cópia do presente termo de consentimento livre e esclarecido.
- Os provadores não terão qualquer tipo de despesas em decorrência da participação nesta pesquisa.
- É garantida a indenização ao participante em caso de eventuais danos decorrentes da participação na pesquisa.
- Os testes para avaliação sensorial de canela, nos quais os provadores experimentarão os pós constando de extrato de canela livre e encapsulados, bem como de sorvete contendo o extrato e as cápsulas desenvolvidos serão acompanhados pelo aluno proponente (Volnei Brito de Souza).
- Quaisquer outros esclarecimentos poderão ser solicitados antes, durante e após a pesquisa.

Eu, _____, RG _____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **“Avaliação sensorial de extrato de canela livre e encapsulado por coacervação complexa aplicado em sorvete”**.

Tenho pleno conhecimento da justificativa, objetivos, benefícios esperados e dos procedimentos a serem executados, bem como da possibilidade de receber esclarecimentos sempre que considerar necessário. Será mantido sigilo quanto à identificação de minha pessoa e zelo a minha privacidade. Ao mesmo tempo assumo o compromisso de seguir as recomendações estabelecidas pelos pesquisadores.

Eu li e entendi todas as informações contidas neste documento.

Aluno de Pós Graduação responsável: Volnei Brito de Souza–Eng. de Alimentos – FZEA – USP. Contato: volnei15@gmail.com/Cel: 19 98119-0454

Pirassununga, _____ de _____ de _____.

Assinatura: _____

APÊNDICE F: Publicações originadas deste trabalho até o momento

- Manuscrito intitulado “Obtaining of a rich proanthocyanidins extract from Ceylon cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): extraction kinetics, composition and antioxidant capacity” **submetido para publicação do periódico Food Chemistry.**
- Co-autoria no trabalho intitulado “Development of solid lipid microparticles loaded with a proanthocyanidin rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*): Potential for increasing antioxidant content in functional foods for diabetic population” **publicado no periódico Food Research International.**
- Trabalho “Obtaining Chinese cinnamon (*Cinnamomum cassia*) extract and its encapsulation by complex coacervation” apresentado em forma de pôster no “Delivery of Functionality in Complex Food Systems” que aconteceu em Paris em julho de 2015.
- Co-autoria no trabalho intitulado “Seleção de polímeros naturais para encapsulação do extrato de canela por coacervação complexa” apresentado no 23º Simpósio de Iniciação Científica da USP.

ANEXO A: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação sensorial do extrato de canela livre e encapsulado por coacervação complexa aplicado em sorvete

Pesquisador: Volnei Brito de Souza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54847116.1.0000.5422

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.500.364

Apresentação do Projeto:

A apresentação foi sucinta e coerente.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo estava claro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios foram mencionados, faltando apenas destacar que algumas pessoas podem ser alérgicas a canela.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta de pesquisa parece bastante interessante e útil à sociedade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCL estava dentro do padrão.

Recomendações:

Alertar sobre a possibilidade de alergia.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há problemas com a proposta.

Endereço: Avenida Duque de Caxias Norte, 225

Bairro: Campus Universitário da USP

CEP: 13.635-900

UF: SP

Município: PIRASSUNUNGA

Telefone: (19)3565-4299

Fax: (19)3565-4114

E-mail: apoiofzea@usp.br

Continuação do Parecer: 1.500.364

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto atende os aspectos éticos na pesquisa com seres humanos portanto este Comitê recomenda sua aprovação. Caso haja alteração no número de indivíduos e/ou metodologia, favor relatar ao CONEP e ao CEPH.

Solicitamos a inserção no TCLE de informação sobre a possibilidade de alergia a canela.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_676003.pdf	30/03/2016 10:35:25		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_comite_etica_volnei_sorvete.pdf	30/03/2016 10:34:52	Volnei Brito de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termode_consentimento_livre_esclarecido_canela.pdf	30/03/2016 10:34:27	Volnei Brito de Souza	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rostoassinada.pdf	09/03/2016 16:35:05	Volnei Brito de Souza	Aceito
Outros	carta_presidente_comite.pdf	08/03/2016 10:46:37	Volnei Brito de Souza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_responsabilidade CEP_volnei.pdf	08/03/2016 10:44:38	Volnei Brito de Souza	Aceito
Orçamento	declaracao_orcamento.pdf	08/03/2016 10:39:29	Volnei Brito de Souza	Aceito
Cronograma	cronograma_de_execucao CEP.pdf	08/03/2016 10:34:32	Volnei Brito de Souza	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PIRASSUNUNGA, 14 de Abril de 2016

Assinado por:
Daniele dos Santos Martins
(Coordenador)

Endereço: Avenida Duque de Caxias Norte, 225
Bairro: Campus Universitário da USP **CEP:** 13.635-900
UF: SP **Município:** PIRASSUNUNGA
Telefone: (19)3565-4299 **Fax:** (19)3565-4114 **E-mail:** apoiofzea@usp.br