

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**NATHALIA KAREN SILVA**

**MICROENCAPSULAÇÃO DE ISOFLAVONAS EM ISOLADO PROTEICO DO  
SORO DE LEITE POR *SPRAY-DRYING***

**MEDIANEIRA**

**2022**

**NATHALIA KAREN SILVA**

**MICROENCAPSULAÇÃO DE ISOFLAVONAS EM ISOLADO PROTEICO DO  
SORO DE LEITE POR *SPRAY-DRYING***

**Microencapsulation of isoflavones in whey protein by spray-drying**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Profa. Dra. Rosana Aparecida da Silva Buzanello.

**MEDIANEIRA**

**2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**NATHALIA KAREN SILVA**

**MICROENCAPSULAÇÃO DE ISOFLAVONAS EM ISOLADO PROTEICO DO  
SORO DE LEITE POR *SPRAY-DRYING***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 29 de novembro de 2022

---

Profa. Rosana Aparecida da Silva Buzanello  
Doutora em Ciência de Alimentos  
UTFPR Campus Medianeira

---

Profa. Eliana Maria Baldissera  
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
UTFPR Campus Medianeira

---

Profa. Deisy Alessandra Drunkler  
Doutora em Tecnologia de Alimentos  
UTFPR Campus Medianeira

**MEDIANEIRA**

**2022**

Dedico este trabalho à minha família, pelos momentos de ausência, amor e cuidado, e a minha orientadora, por todo apoio e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

Certamente agradeço primeiramente a Deus, razão de todas as minhas conquistas e vitórias.

Agradeço a minha orientadora, Professora Dra. Rosana Aparecida Buzanello, pela atenção, paciência, sabedoria e dedicação com que me guiou nesta trajetória. Sem você, nada disso seria possível.

Ao meu namorado Marcos por toda ajuda, paciência, compreensão, amor e cuidado. Você foi fundamental para esta fase e as próximas que virão!

A minha família, em especial meus pais Antônio e Silvana por nunca medirem esforços para me verem feliz, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e orientando, por me entregarem o mais puro amor, e acima de tudo, sempre acreditarem em mim. A minha irmã Cintia, meu cunhado Rafael, meus sobrinhos Davi e Sophia e minha cachorra Andy, por existirem em minha vida, me entregando tanto amor e alegria. A vocês - minha família, também peço desculpas pela ausência do percurso.

Aos meus sogros Carlos e Lucialane por me acolherem prontamente em seus corações, casa e família. Vocês são incríveis.

A todas as amigas que fiz ao longo desta jornada de estudos, em especial a Maria e a Vanessa pelo companheirismo.

À CEANMED – Central Analítica Multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Medianeira e ao LABMULT-LD – Laboratório Multiusuário da UTFPR Campus Londrina pelos ensaios realizados. À Unioeste Campus Toledo, na pessoa de Gabriel Nardi, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

A todos, agradeço o prazer de poder compartilhar essa história com vocês. Obrigada!

“O começo de todas as ciências é o espanto de  
as coisas serem o que são”.  
(ARISTÓTELES, 2002).

## RESUMO

Devido aos potenciais benefícios à saúde, as isoflavonas tem atraído atenção para sua aplicação em suplementos e produtos alimentícios. Contudo, as isoflavonas apresentam elevada instabilidade, baixa solubilidade e sabor indesejável, dificultando sua aplicação. Assim, a microencapsulação apresenta-se como um meio eficaz para contornar tais limitações. O objetivo deste estudo foi microencapsular isoflavonas (IS) provenientes da soja, em proteína do soro de leite (WPI) pela técnica de *spray-drying*, avaliando suas propriedades químicas e físico-químicas. As isoflavonas foram solubilizadas em etanol absoluto com Tween-80, sendo em seguida adicionadas em uma suspensão de WPI em água destilada. Foram estudadas as razões de 1:11 (MP1) e 1:22 (MP2) de WPI:IS na suspensão. As micropartículas foram obtidas por *spray-drying*, operado a uma temperatura de entrada de 150 °C e vazão de 0,6 L h<sup>-1</sup>. A eficiência de encapsulação (*EE%*) e recuperação percentual de isoflavonas (*REC%*) foram determinadas por quantificação do teor de fenólicos totais em mg de ácido gálico por g de amostra (mg EAG g<sup>-1</sup>), pelo método de Folin-Ciocalteu. As micropartículas foram caracterizadas quanto a morfologia e diâmetro médio, por meio da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espalhamento de luz dinâmico (DLS). As propriedades térmicas e espectroscópicas das micropartículas foram determinadas em analisador térmico simultâneo e em espectroscópio de infravermelho com transformada de Fourier em modo de refletância total atenuada (FTIR-ATR), respectivamente. A umidade foi determinada por método gravimétrico após secagem em estufa a 105 °C e a atividade de água em analisador Aqualab®. O teor de fenólicos totais para MP1 (4,74 mg EAG g<sup>-1</sup>) e MP2 (2,15 mg EAG g<sup>-1</sup>) foi cerca de três vezes maior do que o teor correspondente a massa de isoflavonas adicionada (1,56 e 0,81 mg EAG g<sup>-1</sup>, respectivamente). Este aumento pode estar relacionado a conversão de formas glicosiladas das isoflavonas para formas aglicona devido as reações de esterificação e hidrólise durante o processo de microencapsulação. As análises térmicas e de infravermelho confirmaram a eficiência do processo de encapsulação. O aumento da concentração de isoflavonas permitiu maior *EE%*, com 59,67% para MP1, diferindo de MP2 (47,82%) ( $p < 0,05$ ). Este resultado pode estar relacionado as maiores interações químicas entre isoflavonas e proteínas quando a primeira estava em maior proporção nas condições estudadas. As micropartículas exibiram morfologia de superfície rugosa e diâmetro médio variando de 4,3 a 2,5  $\mu\text{m}$  sendo os menores diâmetros médios observados para a amostra MP2. Valores de atividade de água inferiores a 0,450 e umidade inferior a 2 m/m foram obtidos para todas as formulações, demonstrando que o processo de secagem foi eficiente. As isoflavonas foram eficientemente encapsuladas em WPI por *spray-drying*, possibilitando a aplicação deste ingrediente em suplementos alimentares ou produtos alimentícios.

**Palavras-chave:** alimentos funcionais; compostos bioativos; isoflavonas; proteína do leite.

## ABSTRACT

Due to potential health benefits, isoflavones have attracted attention for their application in supplements and food products. However, isoflavones have high instability, low solubility, and undesirable taste, making their application difficult. Thus, microencapsulation presents itself as an effective way to circumvent such limitations. Therefore, the aim of this study was to microencapsulate isoflavones (*IS*) from soybean in whey protein isolated (*WPI*) by spray-drying technique, evaluating its chemical and physicochemical properties. Isoflavones were solubilized in absolute ethanol with Tween-80, followed by their addition in *WPI* suspension in distilled water. 1:11 (MP1) and 1:22 (MP2) *WPI:IS* ratios were studied. The microparticles were obtained by spray-drying, operated at an inlet temperature of 150 °C, and 0.6 L h<sup>-1</sup> feed. Encapsulation efficiency (*EE%*) and isoflavones percentual recovery (*REC%*) were determined by phenolic compounds quantification, expressed in mg of gallic acid per g of sample (mg EAG g<sup>-1</sup>), by Folin-Ciocalteu method. Microparticles were characterized by morphology and average diameter by scanning electronic microscopy and dynamic light scattering (DLS), respectively. Thermal and spectroscopy properties of microparticles were determined by the simultaneous thermal analyzer and infrared spectroscope with Fourier transform in attenuated total reflectance mode (FTIR-ATR), respectively. Moisture was determined by the gravimetric method after drying in an oven at 105 °C and water activity in an Aqualab® analyzer. The total phenolic content for MP1 (4.74 mg EAG g<sup>-1</sup>) and MP2 (2.15 mg EAG g<sup>-1</sup>) was about three times higher than the content corresponding to the added mass of isoflavones (1.56 and 0.81 mg EAG g<sup>-1</sup>, respectively). This increase may be related to the conversion of glycosylated forms of isoflavones to aglycone forms due to esterification and hydrolysis reactions during the microencapsulation process. Thermal and FTIR-ATR analysis confirmed the efficiency of the encapsulation process. The increase in the concentration of isoflavones allowed a higher *EE%*, with 59.67% for MP1, differing from MP2 (47.82%) ( $p < 0.05$ ). This result may be related to the greater chemical interactions between isoflavones and proteins when the former was in greater proportion under the conditions studied. The microparticles exhibited rough surface morphology and mean diameter ranging from 4.3 to 2.5 µm, with the smallest mean diameters observed for the MP2 sample. Water activity values lower than 0.450 and moisture lower than 2 m/m were obtained for all formulations, demonstrating that the drying process was efficient. The isoflavones were efficiently encapsulated in *WPI* by spray-drying, allowing the application of this ingredient in food supplements or food products.

**Keywords:** functional foods; bioactive compounds; isoflavones; milk protein.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química das isoflavonas agliconas, de forma livre, e estrutura glicosilada, unida ao carboidrato por ligação éster.....	19
Figura 2 - Morfologia das micropartículas de isoflavonas para formulação 1 (MP1), com ampliação de 6000x (a) e de 1000x (b) .....	32
Figura 3 - Morfologia das micropartículas de isoflavonas para formulação 2 (MP2), com ampliação de 6000x (c) e de 1000x (d).....	33
Figura 4 - Morfologia das micropartículas da formulação branco, com ampliação de 6000x (e) e de 1000x (f) .....	33
Figura 5 - Espectros FTIR das mistura física (MF) correspondente as micropartículas branco com isoflavona, das micropartículas de isoflavona da formulação 1 (MP1) e 2 (MP2), das micropartículas branco (MP branco) e da isoflavona pura (Isoflavona).....	35
Figura 7 - Curvas derivadas (DTG) correspondentes às termogravimétricas (TG) das amostras de mistura física (MF) correspondente as micropartículas branco com isoflavonas livres, micropartículas de isoflavonas da formulação 1 (MP1) e 2 (MP2), das micropartículas branco (MP branco) e das isoflavonas livres).....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulações para elaboração das micropartículas de isoflavona encapsuladas em isolado proteico de soro de leite por spray-drying .....	26
Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos totais teórico e real, recuperação percentual (REC%) e eficiência de encapsulação (EE%) para as amostras de isoflavonas microencapsuladas em isolado proteico de soro de leite por spray-drying.....	30
Tabela 3 - Diâmetro médio das micropartículas da formulação branco (sem isoflavonas), micropartículas de isoflavonas formulação 1 (MP1) e micropartículas de isoflavonas formulação 2 (MP2) .....	34
Tabela 4 - Valores de atividade de água ( $A_w$ ) e umidade para as amostras de micropartículas formulação 1 (MP1), formulação 2 (MP2) e micropartículas branco (MP Branco) .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR	Refletância total atenuada
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
EE	Eficiência de encapsulação
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
IS	Isoflavona
MF	Mistura física
MP1	Micropartículas de isoflavonas em formulação 1
MP2	Micropartículas de isoflavonas em formulação 2
<i>REC</i>	Recuperação
WPI	Isolado proteico de soro de leite

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Isoflavonas.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Composto bioativo, alimento funcional e alimento nutracêutico ....</b>	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>Microencapsulação .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4</b>	<b><i>Spray-drying</i> como método de microencapsulação .....</b>	<b>22</b>
<b>3.5</b>	<b>Materiais de parede .....</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>Métodos.....</b>	<b>25</b>
4.2.1	Microencapsulação das isoflavonas .....	25
4.2.2	Eficiência de encapsulação ( <i>EE%</i> ).....	26
4.2.3	Caracterização das micropartículas .....	28
<u>4.2.3.1</u>	<u>Morfologia e diâmetro médio.....</u>	<u>28</u>
<u>4.2.3.2</u>	<u>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em modo de refletância total atenuada (ATR).....</u>	<u>28</u>
<u>4.2.3.3</u>	<u>Análises térmicas.....</u>	<u>29</u>
<u>4.2.3.4</u>	<u>Determinação de umidade e atividade de água.....</u>	<u>29</u>
4.2.4	Análise estatística.....	29
<b>5</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>Recuperação percentual de isoflavonas (<i>REC%</i>) e eficiência de encapsulação (<i>EE%</i>) .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2</b>	<b>Caracterização das micropartículas .....</b>	<b>32</b>
5.2.1	Morfologia e diâmetro médio .....	32
5.2.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em modo de refletância total atenuada (ATR).....	34
5.2.3	Análises térmicas .....	36
5.2.4	Determinação da umidade e atividade de água .....	38
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>39</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é considerada um alimento de alto valor nutricional, sendo também rico em fitoquímicos, tendo como destaque as isoflavonas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2014). As isoflavonas são um grupo conhecido de flavonoides que estão abundantemente presentes nos grãos de soja, e vem ganhando cada vez mais espaço devido ao seu potencial benefício para a saúde (CHEN *et al.*, 2013).

Tem-se apresentado com impacto positivo na inibição enzimática, redução do colesterol e atividades estrogênicas, e se reportado como antioxidante e antitumoral (AGUIAR, 2002), sendo uma alternativa promissora na prevenção e tratamentos de doenças crônicas, como diabetes mellitus tipo 2 (DURU *et al.*, 2018), câncer (PUDENZ; ROTH; GERHAUSER, 2014), osteoporose (LIU *et al.*, 2019), doenças cardiovasculares (LAI *et al.*, 2021), além de alívio nos sintomas da menopausa (SETCHELL, 2017).

As isoflavonas da soja possuem quatro formas químicas: agliconas, b-glicosídeos, acetil glicosídeos e malonil glicosídeos (DALPIZOL *et al.*, 2020). Todavia, estudos apontam que as propriedades biológicas benéficas somente são ativas para a presença de concentrações relevantes de isoflavonas em sua forma aglicona (MANTOVANI, 2009; YATSU *et al.*, 2016), uma vez que possui maior biodisponibilidade no organismo (SAHIN *et al.*, 2019).

Analogamente, na perspectiva de se obter produtos com absorção mais reprodutível, a conversão das isoflavonas em sua forma aglicona é uma alternativa para o desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos (YATSU *et al.*, 2016). Porém, alguns desafios podem ser encontrados, já que as isoflavonas possuem baixa solubilidade, instabilidade e sabor desagradável (LARKIN *et al.*, 2008), interferindo sua absorção no organismo e determinando uma menor aceitação para os produtos que as contém (ARAÚJO *et al.*, 1997; CARRÃO-PANIZZI *et al.*, 1999; ROSIER *et al.*, 2004).

Para contornar as limitações, utiliza-se a técnica de microencapsulação aplicada ao bioativo isoflavona, com finalidade de proteger o composto contra fatores externos e componentes do alimento em si, oferecendo conseqüentemente o aumento

de sua estabilidade, biodisponibilidade e atenuação de sabores indesejáveis (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; HOLKEM *et al.*, 2015).

A microencapsulação pode ser definida como um processo no qual pequenas partículas são envolvidas por um agente de revestimento, conferindo às cápsulas geradas diversas propriedades úteis. Este tem se tornado um processo bastante estudado, facilitando as aplicações como manipulação, transporte, conservação e adição em formulações de componentes sensíveis à degradação (BRASILEIRO, 2011). O material encapsulado é denominado de recheio ou núcleo e o material que forma a cápsula encapsulante, cobertura ou parede (BARRETO *et al.*, 2015).

Ainda que muitas técnicas tenham sido desenvolvidas para a microencapsulação de substâncias alimentícias, a técnica por *spray drying* é a mais utilizada na indústria de alimentos. O processo consiste na secagem adequada de produtos líquidos, na qual o líquido é pulverizado em uma corrente de ar aquecido, permitindo a obtenção instantânea de um produto sólido (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; RATTES; OLIVEIRA, 2007).

A escolha de um material de parede adequado é fundamental para que se obtenha êxito na microencapsulação. Dependendo das propriedades físico-químicas do núcleo, da composição do material de parede e da técnica empregada, podem ser obtidos diferentes tipos de partículas, com forma irregular com núcleos distintos na mesma microcápsula ou ainda microcápsula com parede composta (SINGH, 2011). Dessa forma, as proteínas do leite apresentam boas características para atuar como agente encapsulante de diversas substâncias, pois sua estrutura permite interação com os materiais sensíveis, de modo a facilitar a formação da parede da cápsula (CHATTERJEE; JUDEH, 2016).

A proteína do soro de leite é pautada no trabalho por ser um facilitador econômico de aceitação satisfatória. Além disso, demonstram benefícios proeminentes, por exemplo, capacidade de resposta a estímulos e capacidade de formar agregados bem definidos, o que os torna arquiteturas poliméricas promissoras para encapsulamento de agentes bioativos (FALSAFI. *et al*, 2022). No entanto, as informações sobre a utilização de proteína de soro de leite para encapsular isoflavonas ainda são muito limitadas.

Apesar de ainda ser muito limitado informações sobre a utilização da proteína do soro do leite para encapsular isoflavonas, seu uso aliado aos demais procedimentos do estudo projeta eficiência e estabilidade do bioativo

microencapsulado, possibilitando então a sua entrega através da aplicação em produtos funcionais e nutracêuticos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Microencapsular isoflavonas provenientes da soja, em proteína do soro de leite pela técnica de *spray-drying*, avaliando suas propriedades químicas e físico-químicas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Microencapsular isoflavonas pela técnica de *spray-drying*, utilizando proteína do soro de leite como material de parede, variando a concentração dos materiais.
- Determinar a eficiência de encapsulação das formulações pela quantificação de compostos fenólicos totais.
- Realizar análises térmicas e de espectroscopia de infravermelho para confirmação da eficiência de encapsulação e estabilidade das micropartículas.
- Avaliar a morfologia e diâmetro médio das partículas por análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Caracterizar as micropartículas obtidas quanto a umidade e atividade de água.
- Análise estatística para avaliação da eficiência de encapsulação e caracterização das micropartículas de isoflavonas.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Isoflavonas

O grão de soja possui diversos compostos funcionais, dentre os quais se destacam as isoflavonas. Os teores já estudados variaram entre 100 e 300 mg/100 g de alimentos à base de soja (SONG *et al.*, 1998) e variam ainda mais quando analisado o próprio grão (CARRÃO-PANIZZI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2012). Ainda assim, dentre todas leguminosas já estudadas, a soja e seus produtos são os que possuem maior concentração de isoflavonas (HSIANO-HSIAO; HO; PAN, 2020).

As isoflavonas (também chamadas isoflavonoides) são compostos químicos fenólicos, pertencentes à classe dos fitoestrógenos, que estão abundantemente presentes nos cotilédones e hipocótilos dos grãos de soja (CHEN *et al.*, 2013). Possuem propriedades bioativas que agem diretamente na célula, tecido e organismo vivo, apresentando potencial benéfico a saúde (HSIANO-HSIAO; HO; PAN, 2020).

Estudos apontam a relação entre o estresse oxidativo e distúrbios metabólicos (RAINS; JAIN, 2011; FATEHI-HASSANABD; CHAN; FURMAN, 2010, CHEN *et al.*, 2018). O estresse oxidativo geralmente surge do aumento de radicais livres no organismo. As isoflavonas, por se comportarem como excelentes antioxidantes, neutralizam os radicais livres e, por consequência, acabam contribuindo para a prevenção de doenças carcinogênicas, cardiovasculares e diabetes (BARBOSA *et al.*, 2006; PUDENZ; ROTH; GERHAUSER, 2014; LAI *et al.*, 2021; DURU *et al.*, 2018).

Além disso, por terem estrutura semelhante ao estrógeno, hormônio produzido pelos ovários, podem atuar de forma antagonista sob circunstâncias em que a produção do hormônio é drasticamente reduzida, como no caso da menopausa. Dessa forma, podem ser aderidas de forma fitoterápica para reposição hormonal natural, controlando sintomas característicos do período, como as ondas de calor, suor noturno e insônia (SETSELL, 2017; HARIRI *et al.*, 2021).

A osteoporose é uma doença comum na pós-menopausa devido às alterações hormonais da fase (WEI, 2012; LIU, 2019). As isoflavonas podem atuar no aumento dos níveis da enzima fosfatase alcalina e da proteína osteoprotegerina, importantes para reposição da matriz óssea, podendo ser utilizadas para prevenção e tratamento

da osteoporose, principalmente para mulheres que possuem contraindicação a terapia de reposição hormonal com anticoncepcionais (YU *et al.*, 2015).

Pesquisas experimentais mostraram que as isoflavonas, em especial a genisteína e daidzeína, podem ter potencial atuação antidiabética contra diabetes mellitus tipo 2, devido também à sua capacidade de reduzir a absorção de carboidratos pelo intestino, uma vez que atua na inibição de enzimas intestinais (glicosidases) que hidrolisam os resíduos finais do amido, como o último passo da digestão dos carboidratos dietéticos para a liberação de glicose. A inibição da alfa glicosidase retarda a absorção dos carboidratos ingeridos, reduzindo a glicemia pós prandial e picos de insulina, logo, diminuindo os níveis de açúcar no sangue (DURU *et al.*, 2018). Ademais, possuem efeito vasodilatador com o aumento do fluxo sanguíneo, e conseqüente redução da pressão arterial, o que contribui para proteção contra doenças cardiovasculares (SETCHELL, 2017; ERDMAN *et al.*, 2007; LAI *et al.*, 2021).

Analogamente, o maior interesse dos pesquisadores é na farmacologia e fisiologia das isoflavonas, pois apresentam estrutura que se comporta como estrógenos na maioria dos sistemas biológicos (ESTEVES; MONTEIRO, 2001; HSIANO-HSIAO, HO; PAN, 2020). Portanto, está aliada ao tratamento e prevenção de doenças crônicas, já que os estrogênios exercem seu efeito através de receptores (RE  $\alpha$  e RE  $\beta$ ) expressados em células do ovário, cérebro, ossos, sistema cardiovascular e mama (PERON *et al.*, 2008; HSIANO-HSIAO; HO; PAN, 2020). Dessa forma, apresentam propriedades quimiopreventivas atreladas a redução da proliferação das células cancerosas e prevenção da formação de tumor (PUDENZ; ROTH; GERHAUSER, 2014), já comprovado pela atuação contra o câncer de mama (MESSINA, 2016) câncer de próstata (PAVESE *et al.*, 2014) e câncer no endométrio (MALLOY *et al.*, 2018).

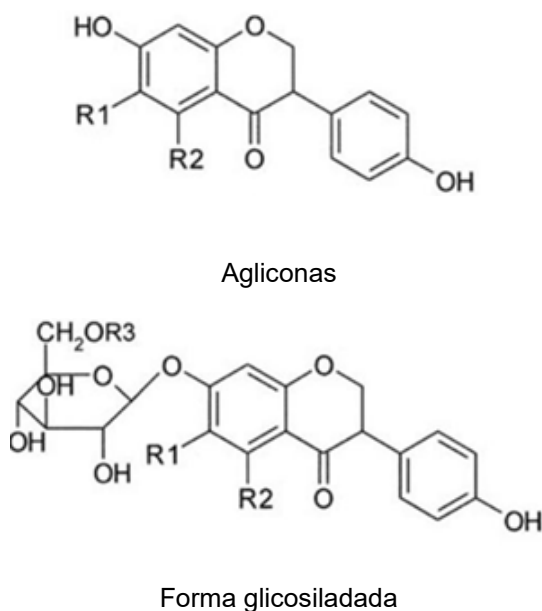
Porém, a avaliação da biodisponibilidade da isoflavona relacionada a sua atividade biológica é um desafio. O modo que foram extraídas e processadas altera as concentrações de suas diferentes formas, que geralmente já é baixa (MAHMOUD; YANG; BOSLAND, 2014). Além disso, são encontradas predominantemente conjugada com carboidratos, conhecidas como formas glicosiladas, de pouca absorção pelo organismo humano e de pouca bioatividade (LARKIN *et al.*, 2008).

Por assim ser, é interessante analisar as formas de isoflavonas que estão atreladas a melhor absorção. Desse modo, encontra-se as agliconas - de forma livre

(daidzeína, genisteína e gliciteína), e as formas glicosiladas, os b-glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), onde a isoflavonas está ligada a um carboidrato, por meio de uma ligação éster, são estas acetil glicosídeos (6 " -O-acetil dadzin, 6 " -O-acetil genistina e 6 " -O-acetil glicitina) e malonil glicosídeos (6 " -O-malonildaizina, 6 " -O-malonil genistina e 6 " -O-malonil glicitina) (DALPIZOL *et al.*, 2020), melhor representado na Figura 1. Para estes conjuntos, somente as isoflavonas livres da molécula de açúcar, as chamadas agliconas, são capazes de serem absorvidas de melhor forma pelo organismo, já que possuem atividade biológica mais potente e abrangente entre as isoflavonas por causa da sua maior atividade biológica e rápida absorção. Isso se deve à sua menor hidrofiliabilidade e pesos moleculares mais baixos. Logo, produtos que contêm maiores teores de isoflavonas aglicona são reconhecidos como de alta qualidade (SETCHELL, 1999; LEE *et al.*, 2018).

A Figura 1 abaixo mostra a estrutura química das isoflavonas agliconas, de forma livre, e estrutura glicosilada, de forma unida ao carboidrato por ligação éster.

**Figura 1 – Estrutura das isoflavonas de soja**



**Fonte: Niamnuy *et al.* (2019)**

Todavia, a menos que a soja ou alimento à base de soja tenha passado por algum processo de fermentação, haverá uma baixa proporção de formas não conjugadas (agliconas), biologicamente ativas das isoflavonas (PIMENTEL; ELIAS;

PHILIPPI, 2019), e ainda assim, são encontradas com menos frequência na soja (HSUAN-HSIAO *et al.*, 2020).

Além disso, as isoflavonas apresentam baixa solubilidade e elevada instabilidade, dificultando sua aplicação em produtos alimentícios (HOLKEM *et al.*, 2015). Similarmente, apresentam sabor amargo e adstringente da daidzeína e genisteína contidos nos grãos de soja (ALDIN; REITMEIER; MURPHY, 2006; LARKIN *et al.*, 2008), condição que determina sua menor aceitação por depreciação ao sabor (ARAÚJO *et al.*, 1997; CARRÃO-PANIZZI *et al.*, 1999; ROSIER *et al.*, 2004).

### **3.2 Composto bioativo, alimento funcional e alimento nutracêutico**

A relevância para o consumo de alimentos benéficos a saúde e bem-estar aumenta o interesse para o desenvolvimento de produtos funcionais e nutracêuticos (RAQUE; BRANDELLI, 2021), contribuindo para que a indústria alimentícia desenvolva, cada vez mais, produtos atrativos, saudáveis, sensorialmente agradáveis, com padrão de qualidade e segurança pós-processamento (GUIMARÃES *et al.*, 2020; SOBRINHO; FARIAS, 2012).

Similarmente, analisando o contexto atual enfrentado pela pandemia, medidas implementadas para o controle do Covid-19 surtiram mudanças marcantes no comportamento alimentar e vida do consumidor (SHETH, 2020), sugerindo tal período como catalisador na introdução de hábitos alimentares mais saudáveis, devido a importância do consumo de alimentos que promovem saúde (JAEGER; KALIJI; SCHIMMENTI, 2021).

Alimentos funcionais são designados para afetar positivamente a saúde (GUR *et al.*, 2018). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alimentos funcionais são alimentos ou ingredientes que se caracterizam por oferecer vários efeitos benéficos à saúde; além de suas funções nutricionais básicas, podem desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônicas degenerativas. Inclusive, as isoflavonas são registradas pela ANVISA como composto funcional de ação estrogênica, capaz de reduzir sintomas da menopausa e ser anticarcinogênico (BRASIL, 2009).

Nutracêutico ou “biocêntrico” é entendido como composto ativo de nutriente farmacêutico padronizado, que apresenta benefícios fisiológicos para a saúde e bem-

estar (RASHIDI, 2021). Esses compostos podem ser adicionados como ingredientes aos alimentos para produzir "alimentos funcionais", melhorando suas características nutricionais (PATEIRO *et al.*, 2021). Por mais que a legislação brasileira não reconhece oficialmente o termo nutracêutico, reconhece substância bioativa, que é a definição oficial mais compatível (LIRA *et al.*, 2009, LEANDRO; ALBERT; SANTOS, 2019). A Resolução RDC nº 243/2018, define substância bioativa como um nutriente ou não nutriente, contido no alimento, e que possui ação metabólica ou fisiológica específica no organismo humano. As substâncias bioativas incluem, mas não se limitam, a carotenoides, fitoesteróis, flavonoides (como no caso as isoflavonas), fosfolipídios, organossulfurados e polifenóis, e precisam ser componente natural do alimento, possuindo histórico de uso (BRASIL, 2018).

### 3.3 Microencapsulação

A microencapsulação é o processo em que pequenas partículas de um composto bioativo ou funcional são revestidas para formar pequenas cápsulas (BRASILEIRO, 2011). O material encapsulado é denominado de recheio ou núcleo e o material que forma a cápsula encapsulante, cobertura ou parede (BARRETO *et al.*, 2015), sendo este um revestimento de proteção ao composto encapsulado contra condições ambientais adversas e interações rejeitáveis do alimento (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2011).

Quando analisado o contexto atual, a tecnologia de microencapsulação tem-se mostrado de grande importância na indústria de alimentos, uma vez que soluciona limitações no emprego de ingredientes, suprindo ou atenuando *flavors* indesejáveis, reduzindo a volatilidade, reatividade e toxicidade dos compostos, prolongando a vida útil de produtos acabados e aumentando a estabilidade do encapsulado na presença de luz, oxigênio e pH extremos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013; ROSSO, *et al.*, 2019), assim, facilitando a entrega do bioativo no organismo, uma vez que aumenta sua estabilidade e biodisponibilidade (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; HOLKEM *et al.*, 2015).

Controlar a liberação dos materiais do núcleo no momento e local desejado, bem como mascarar suas propriedades depreciadas, são fatores primordiais para o encapsulamento adequado (DUBEY *et al.*, 2009). Tal fator depende da técnica de

microencapsulação utilizada, sua aplicação, propriedades físico-químicas do núcleo e compatibilidade do composto com o material de parede (RÉ, 2000). Uma vez atingido a adequação, seu uso pode ser explorado pela indústria alimentícia de modo a fornecer produtos com limitação de produção, como vitaminas, sais, gases, aminoácidos, óleos essenciais, corantes, enzimas, microrganismos, flavonoides, antioxidantes, vitaminas, ácidos graxos e probióticos (DIAS; BOTREL; FERNANDES, 2017), se direcionando principalmente ao desenvolvimento de produtos funcionais, nutricionais e nutracêuticos, visto que é um mercado atualmente rentoso pela existência da grande demanda por produtos que tragam benefícios à saúde (GUIMARÃES *et al.*, 2020; SOBRINHO; FARIAS, 2012).

As isoflavonas são polifenóis hidrofóbicos, logo possuem baixa bioacessibilidade devido à baixa solubilidade em água e instabilidade no trato digestivo superior

As isoflavonas são polifenóis hidrofóbicos, logo, possuem baixa solubilidade, que devido a esta, apresentam baixa biodisponibilidade. Além disso, o mecanismo de transporte é feito por difusão ativa, uma vez que não há receptores específicos para este tipo de compostos na superfície das células epiteliais do intestino delgado, diminuindo ainda mais a sua permeabilidade (LI *et al.*, 2015; DIAS, 2017).

O encapsulamento pode contribuir de forma efetiva para a bioacessibilidade, uma vez que melhora a solubilidade e estabilidade em água possibilitando a entrega com eficiência ao trato digestório (GRGIC *et al.*, 2022).

### **3.4 *Spray-drying* como método de microencapsulação**

A escolha do método mais adequado de microencapsulação depende do tipo do material ativo, da aplicação e da forma de liberação do composto. Basicamente, a diferença entre os métodos existentes está no tipo de envolvimento do material ativo pelo agente encapsulante, visto que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química (OZKAN *et al.*, 2019).

Entre os métodos físicos estão o de secagem por *spray-drying*, *spray cooling*, liofilização, precipitação de fluido supercrítico e evaporação de solvente. Os métodos químicos englobam a polimerização interfacial e complexação por inclusão molecular.

Para os métodos físico-químicos estão presentes a coacervação (simples ou complexa), lipossomas e gelificação iônica (TYAGI *et al.*, 2011).

O método mais comumente utilizado para alimentos é o *spray-drying*, por ser eficaz e economicamente viável (GOUIN, 2004; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007), sendo também o mais comum para aumentar a estabilidade de compostos bioativos, como no caso das isoflavonas (NIAMNUY *et al.*, 2019). Consiste na pulverização ou atomização de uma solução, emulsão ou suspensão líquida contendo o composto bioativo, em uma corrente de ar quente, formando instantaneamente um pó (RATTES; OLIVEIRA, 2007). A técnica compreende três estágios: homogeneização do líquido de alimentação, secagem da solução através de gás quente para evaporação do solvente e coleta de partículas secas (SCHAFROTH *et al.*, 2012).

A formação de inúmeras gotículas facilita a troca térmica e transferência de massa, aumentando o rendimento e rapidez do processo. Além disso, o procedimento pode ser aplicado para compostos termos sensíveis, uma vez que o tempo de contato entre o ar quente com a solução é curto, não causando danos consideráveis ao produto (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; CARMO *et al.*, 2015). O pó obtido é de boa qualidade e de baixa atividade de água, facilitando o armazenamento e protegendo o material ativo de reações indesejáveis (PEREIRA *et al.*, 2018).

### **3.5 Materiais de parede**

Um dos principais fatores que influenciam a estabilidade de compostos encapsulados é a natureza do material encapsulante. Isso porque o tipo de material de parede usado envolve as micropartículas, interferindo na eficiência do processo e no grau de proteção do núcleo ativo (ROSENBERG, KOPELMAN; TALMON, 1990; GARG *et al.*, 2006). Para escolha do material a ser utilizado, deve-se considerar uma série de fatores, como grau alimentício, compatibilidade com o núcleo, capacidade de selar e manter o núcleo no interior da cápsula e capacidade de oferecer boa formação de filme, permitindo a liberação do conteúdo no momento adequado e proporcionando máxima proteção perante condições adversas (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2011; NAZZARO *et al.*, 2012; NEDOVIC *et al.*, 2015).

Os materiais de parede utilizados podem ser polímeros naturais, como os carboidratos (gomas, celulosas, amidos, ciclodextrinas); proteínas (caseína, proteínas

de soja, gelatina); lipídeos (ceras, óleos, parafina), polímeros sintéticos e copolímeros (DUBEY *et al.*, 2009; SANGUANSRO; AUGUSTIN, 2011; MARTINS *et al.*, 2014), utilizados sozinhos ou combinados, uma vez que nem sempre um único material oferece todas as propriedades desejadas (FAVARO, 2008).

A proteína é um dos biopolímeros alimentares mais promissores para o desenvolvimento de carreadores nutracêuticos devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, sustentabilidade, baixo custo e adequação para formulações alimentícias. A proteína do soro do leite, comumente conhecida como *whey protein*, é um material de parede ideal para encapsular e fornecer nutracêuticos devido seu alto valor nutricional, poder emulsificante, estabilidade, propriedades tecnofuncionais, resistência à digestão de pepsina e solubilidade em nutracêuticos pouco solúveis ou hidrofóbicos, como no caso das isoflavonas (SINGH *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2022a). Além disso, são matérias-primas amplamente disponíveis, baratas, naturais, sensorialmente aceitas e de propriedades estruturais que as tornam altamente adequadas como veículos para entrega de bioativos (MODLER, 2000; ANTUNES, 2009). Correlativamente, a proteína de soro de leite aquecida pode fornecer melhor encapsulação e proteção aos nutracêuticos do que outros materiais devido à conformação flexível e ao aumento dos segmentos hidrofóbicos presentes em seu exterior induzidos pelo tratamento térmico (TANG, 2021).

Muitos artigos de revisão recentes oferecem uma boa visão sobre o desenvolvimento de vários sistemas de entrega de bioativos baseados em proteínas do soro de leite; no entanto, até o momento apenas Liu *et al* (2022a) direcionou o estudo da proteína ao encapsulamento de isoflavonas. Em seu estudo, a microencapsulação de isoflavonas utilizando o isolado proteico de soro de leite permitiu a modificação da estrutura do conjunto, aprimorando a solubilidade em água, propriedades espumantes, estabilidade, atividade antioxidante, atividade emulsificante e bioacessibilidade das isoflanonas.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

As isoflavonas de soja foram adquiridas comercialmente em farmácia de manipulação, compreendendo a um extrato hidroalcolico seco de *Glycine max* (L.) Merr. com 40% de isoflavonas. Para a produção das micropartículas, isolado proteico de soro do leite em pó foi utilizado como material de parede (90% de proteínas). Etanol absoluto (99,5%) e Tween-80 foram utilizados como solvente das isoflavonas e emulsificante, respectivamente. O reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), o padrão ácido gálico anidro (99,0 %, Êxodo Científica) e carbonato de sódio anidro (99,5%, Êxodo Científica) foram utilizados para a determinação de fenólicos totais. Os demais reagentes utilizados no estudo apresentaram grau de pureza analítico.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Microencapsulação das isoflavonas

Para obtenção das micropartículas preparou-se uma suspensão dos reagentes mediante o preparo de uma fase orgânica e de uma fase aquosa. A fase orgânica foi obtida pela solubilização das isoflavonas (1,067g para MP1 e 0,533 para MP2) e polissorbato 80 (0,16g) em etanol (10 mL) sob temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). A fase aquosa preparada pela solubilização da proteína do soro de leite em 200 mL de água destilada e sob agitação mecânica vigorosa utilizando vórtex por 15 minutos.

A fase orgânica foi incorporada na fase aquosa e homogeneizada por agitação mecânica em vórtex durante 15 minutos. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada em Ultra-turrax® (T18, IKA, Alemanha), a 7000 rpm por 15 min.

As micropartículas foram obtidas pela secagem da suspensão em um *spray-drying* laboratorial (MSD 1.0, Labmaq, São Paulo). O equipamento possui câmara de secagem de 500 mm x 150 mm e foi utilizado um bico atomizador de duplo fluido de orifício de 0,7 mm de diâmetro. A vazão de alimentação da amostra foi de 0,6 L h<sup>-1</sup>, a temperatura do ar de entrada foi de 150 °C, com fluxo do ar de secagem de 35 N m<sup>3</sup>

$h^{-1}$  (SCREMIN *et al.*, 2017). Para obter as microcápsulas de branco, fez-se o mesmo processo, porém sem a adição de isoflavonas.

Na Tabela 1 são apresentadas as formulações das micropartículas de isoflavona encapsulada. Foram elaborados dois ensaios variando a quantidade de isoflavona adicionada e um ensaio branco, sem adição de isoflavona.

**Tabela 1 - Formulações para elaboração das micropartículas de isoflavona encapsuladas em isolado proteico de soro de leite por *spray-drying***

Condição experimental	Massa de componentes (g)					Razão IS:WPI
	Água destilada	WPI	Tween-80	Etanol	IS	
MP1	400	12	0,16	13	1,067	1:11
MP2	400	12	0,16	13	0,533	1:22
MP Branco	400	12	0,16	13	0	0

**WPI: isolado proteico de soro de leite em pó. IS: extrato etanólico de soja seco contendo 40% de isoflavonas. MP1: concentração de isoflavonas de 0,08 g g<sup>-1</sup> de etanol. MP2: concentração de isoflavonas de 0,04 g g<sup>-1</sup> de etanol. MP Branco: sem isoflavonas.**

**Fonte: Autoria própria (2022)**

#### 4.2.2 Eficiência de encapsulação (EE%)

A determinação da EE% foi realizada avaliando o teor de compostos fenólicos das micropartículas, usando os métodos descritos por Alishahi *et al.* (2011), com modificações, determinando-se o teor de compostos fenólicos totais (FT) e o teor de compostos fenólicos de superfície ou não encapsulado (FS). As análises foram conduzidas em triplicata.

Para determinar o teor de FT, 375 mg de micropartículas (MP1, MP2 e branco) e de isoflavonas não encapsuladas foram suspensas em 15 mL de etanol:metanol (1:1 v/v), agitadas em vórtex (774, FISATOM, São Paulo, Brasil) a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) por 2 min e submetidas a agitação mecânica de 200 rpm em estufa de agitação (TE-4080, TECNAL, São Paulo, Brasil) a temperatura de 25 °C por 1 h. Em seguida, foram submetidas a centrifugação (CT5000, Cientec, São Paulo) a 6000 rpm por 15 min. Após, o sobrenadante do extrato foi coletado e utilizado para a determinação do conteúdo de fenólicos totais, segundo a metodologia de Folin-Ciocalteu (SINGLETTON *et al.*, 1999), com algumas modificações. Para tanto, os extratos obtidos (0,1 mL) foram adicionados em tubos de ensaio, adicionados de 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, 1,5 mL de carbonato de sódio anidro 20% e água

destilada (7,9 mL). A medida da absorbância das amostras foi realizada em um espectrofotômetro UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda XLS, Reino Unido), no comprimento de onda de 765 nm, após 1 hora de repouso, sob abrigo da luz. Uma curva padrão de ácido gálico com concentrações de 20 a 200 mg L<sup>-1</sup> foi construída utilizando-se as mesmas condições das amostras. O resultado foi expresso em mg equivalente de ácido gálico por 100 g de amostra (mg AG 100 g<sup>-1</sup>).

Para determinar o teor de FS, as micropartículas (375 mg) foram dispersas em 15 mL de solução etanol:metanol 1:1 (v/v), homogeneizadas levemente e imediatamente filtradas em papel filtro, coletando-se o líquido filtrado. Após, o extrato obtido foi submetido a determinação do conteúdo de fenólicos totais segundo a metodologia de Folin-Ciocalteu (SINGLETON *et al.*, 1999), conforme previamente descrito para o teor de FT.

A *EE%* das micropartículas foram calculadas de acordo com a Equações 1.

$$EE\% = \frac{FT - FS}{FT} \times 100 \quad (1)$$

Em que: FT = conteúdo de compostos fenólicos totais; FS = conteúdo de compostos fenólicos de superfície.

A recuperação percentual de isoflavonas (*REC%*) representa o conteúdo de isoflavonas total presente nas microcápsulas após o processo de encapsulação (encapsulada e não encapsulada), considerando o teor de fenólicos totais das amostras. Para isso, determinou-se o teor de compostos fenólicos totais (FT) das micropartículas e o teor de compostos fenólicos totais da isoflavona livre correspondente a sua massa inicial de isoflavonas (FI) em casa ensaio, seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente para a determinação de FT. A recuperação percentual de isoflavonas foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$REC\% = \frac{FI}{FT} \times 100 \quad (2)$$

Em que  $FT$  = conteúdo de compostos fenólicos totais nas microcápsulas;  $FI$  = conteúdo de compostos fenólicos totais equivalente a massa inicial de isoflavonas utilizada no processo de encapsulação.

### **4.2.3 Caracterização das micropartículas**

#### **4.2.3.1 Morfologia e diâmetro médio**

Para avaliar a morfologia das micropartículas, o método de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizado. As amostras foram dispersas em uma fita dupla de carbono, submetidas a deposição catódica de uma fina camada de ouro/paládio (aproximadamente 4 nm) e, em seguida, analisadas no MEV (ZEISS, modelo EVO MA10, EUA). O diâmetro médio das micropartículas foi estimado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), realizado em triplicata a 25 °C, e por meio de um analisador de tamanho de partícula Litesizer 500 (Anton Paar, Graz, Áustria), de acordo com a metodologia proposta por Ahmadian, Niazmand e Pourfarzad (2019).

#### **4.2.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em modo de refletância total atenuada (ATR)**

Para identificar a existência de possíveis interações químicas entre os materiais utilizados para o processo de microencapsulação das isoflavonas, fez-se análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com modo de refletância atenuada (FTIR-ATR, Frontier PerkinElmer, Reino Unido) com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e intervalo de número de onda de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ . Realizou-se a análise através da média de dez acumulações para cada uma das amostras de micropartículas (MP1, MP2 e branco), isoflavona livre e mistura física da microcápsula branco e isoflavona.

#### 4.2.3.3 Análises térmicas

O comportamento térmico das amostras de micropartículas (MP1, MP2 e branco), isoflavona livre e mistura física das micropartículas branco e isoflavona livre foi avaliado em um analisador térmico simultâneo (STA 6000, Perkin Elmer, Reino Unido). As amostras foram acondicionadas em um porta-amostra de platina, sendo aquecidas de 50 °C a 600 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 20 mL/min, sendo obtida sua curva termogravimétrica (TG) e sua derivada correspondente (DTG).

#### 4.2.3.4 Determinação de umidade e atividade de água

Para a determinação da atividade de água foi utilizado o equipamento Aqualab® (4TE, Decagon, Brasil). Para a análise de umidade foi utilizado o método gravimétrico em estufa a 105 °C (AOAC, 2005).

#### **4.2.4 Análise estatística**

Os dados obtidos para a eficiência de encapsulação e fenólicos totais das micropartículas de isoflavonas foram avaliados por meio do teste de *t* de *Student* para comparação de médias, considerando um nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Os dados obtidos nas análises de umidade, atividade de água e diâmetro médio foram avaliados por meio de ANOVA e teste de Tukey para comparação de médias, considerando um nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). As análises foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

## 5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 5.1 Recuperação percentual de isoflavonas (*REC%*) e eficiência de encapsulação (*EE%*)

Na Tabela 2 são apresentados os valores obtidos de fenólicos totais para os ensaios de formulações MP1, MP2 e MP branco, e seus respectivos valores de *REC%* e *EE%*.

**Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos totais teórico e real, recuperação percentual (*REC%*) e eficiência de encapsulação (*EE%*) para as amostras de isoflavonas microencapsuladas em isolado proteico de soro de leite por *spray-drying***

Amostras	Fenólicos totais teóricos (mg EAG / g amostra)	Fenólicos totais reais (mg EAG / g amostra)	<i>REC%</i>	<i>EE%</i>
MP1	1,56	4,74 <sup>a</sup> ± 0,16	304,06 <sup>a</sup> ± 10,44	59,63 <sup>a</sup> ± 0,91
MP2	0,81	2,15 <sup>b</sup> ± 0,14	271,60 <sup>b</sup> ± 13,17	47,82 <sup>b</sup> ± 0,88
MP Branco	n.d.	n.d.	-	-
Isoflavona livre	-	19,27 ± 0,49	-	-

**MP1: microcápsulas formulação 1; MP2: micropartículas formulação 2; MP Branco: micropartículas formulação branco; n.d.: não detectado.**

**Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 3).**

**Fonte: Autoria própria (2022)**

Nota-se que a *REC%* para MP1 (4,74 mg EAG g<sup>-1</sup>) foi de 304,06%, e para MP2 (2,15 mg EAG g<sup>-1</sup>) 271,60%, indicando que o processo de encapsulação resultou no aumento do teor de fenólicos totais em cerca de três vezes mais do que no pó de isoflavona pura (1,56 e 0,81 mg EAG g<sup>-1</sup>, respectivamente), antes do processo de encapsulação. Chen *et al.* (2020) e Gaya *et al.* (2016) estudaram a alteração do perfil de isoflavonas da soja a partir de processos fermentativos e relataram que a conversão das formas de isoflavonas glicosiladas em formas agliconas resultaram em maior teor de fenólicos totais, o que poderia explicar o resultado obtido no presente estudo.

Analogamente, o aumento da concentração de isoflavonas permitiu maior *EE%*, com 59,67% para MP1, e 47,82% para MP2 (p < 0,05), sugerindo que a maior concentração de isoflavonas induziu melhor *EE%* de encapsulação, nas condições estudadas. Este resultado pode estar relacionado as maiores interações moleculares entre isoflavonas e proteínas quando a concentração de isoflavonas foi superior (MP1), nas condições estudadas. A interação entre compostos fenólicos como as isoflavonas e as proteínas do leite podem ser divididas em interações covalentes e

não covalentes, sendo estas últimas relativamente fracas e reversíveis, ocorrendo por meio de interação hidrofóbica, ligação de hidrogênio, interações eletrostáticas e forças de van der Waals. A aplicação de tratamento térmico durante a encapsulação pode permitir o desdobramento das proteínas, alterando sua estrutura e permitindo estas interações intermoleculares, influenciando na eficiência e no rendimento do processo (LIU *et al.*, 2022c).

Inevitavelmente, deve-se considerar que a estrutura química das isoflavonas de soja podem ser alteradas durante várias etapas de processamento, como hidrólise, aquecimento, esterificação e secagem, e que todos os conjugados de b-glicosídeos podem ser hidrolisados para produzir isoflavonas agliconas, cuja extração pode ser acelerada por reações ácidas, alcalinas, enzimáticas e de aquecimento (como no caso o utilizado no *spray-drying* para a obtenção das micropartículas), ainda que o aquecimento seja praticamente instantâneo, conecta-se que o aumento do rendimento apresentado pode ser justificado intrinsecamente por alguns destes fatores (LEE *et al.*; 2009, RIED *et al.*; 2005, VAYDIA *et al.*; 2005).

Ademais, o uso de etanol como solvente das isoflavonas, utilizado no presente estudo, também pode ter contribuído com estas reações de interconversão, pois de acordo com Niamnuy *et al.* (2019) a hidratação em extrato aquoso etanólico pode contribuir nas reações de hidrólise das formas glicosídeas das isoflavonas em agliconas. É importante ressaltar que as formas aglicona da isoflavona, tais como a daidzeína e a genisteína, apresentam maior potencial bioativo devido a melhor biodisponibilidade e rápida absorção, associada à sua menor hidrofobicidade e menor massa molecular (NIAMNUY *et al.*, 2019).

Além disso, Niamnuy *et al.* (2019) abordam que a interconversão depende de altas temperaturas (150 a 170 °C) do ar de entrada do *spray-drying*. Isso devido à maior taxa de evaporação da água, permitindo com que as substâncias internas fiquem menos livres para se moverem a superfície quente. Assim sendo, considerando que no presente estudo utilizou-se 150 °C para o ar de entrada, é indicativo de que este fator também tenha influenciado na maior recuperação de isoflavonas, em termos de fenólicos totais.

Niamnuy *et al.* (2019) também analisam que o material de parede tem impacto significativo no rendimento do processo. Isso porque o tipo de material da parede influencia na quantidade de compostos bioativos através de vários fatores, como:

capacidade de formação de filme, capacidade de emulsificante, solubilidade, peso molecular, tolerância ao meio ambiente e estrutura (WANDREY *et al.*, 2009). Além disso, o material da parede pode reter os compostos bioativos durante a evaporação da água, formando um filme fino que envolve as substâncias (ANANDHARAMAKRISHNAN *et al.*, 2015).

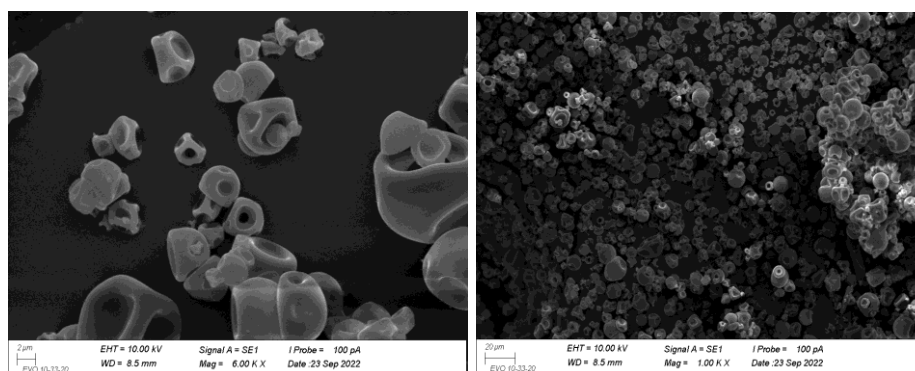
## 5.2 Caracterização das micropartículas

### 5.2.1 Morfologia e diâmetro médio

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta capaz de visualizar estruturas em escala nanométrica e de mostrar em detalhes aspectos da superfície e da morfologia. A análise permite verificar a funcionalidade e as propriedades de fluxo do pó, através da forma e a superfície das partículas em função dos adjuvantes utilizados nas formulações de secagem (AULTON, 2005).

A Figura 2 apresenta as fotomicrografias para as micropartículas de isoflavonas em formulação 1 (MP1), a Figura 3 em formulação 2 (MP2), e Figura 4, a formulação das micropartículas branco, apenas contendo o material encapsulante. As imagens evidenciam micropartículas com superfície rugosa e com diferentes dimensões, sendo as partículas grandes microesferas, enquanto as partículas menores fragmentos das microesferas que ocorrem devido ao atrito das partículas durante a secagem por pulverização (WASHINGTON, 1992).

**Figura 2 - Morfologia das micropartículas de isoflavonas para formulação 1 (MP1), com ampliação de 6000x (a) e de 1000x (b)**



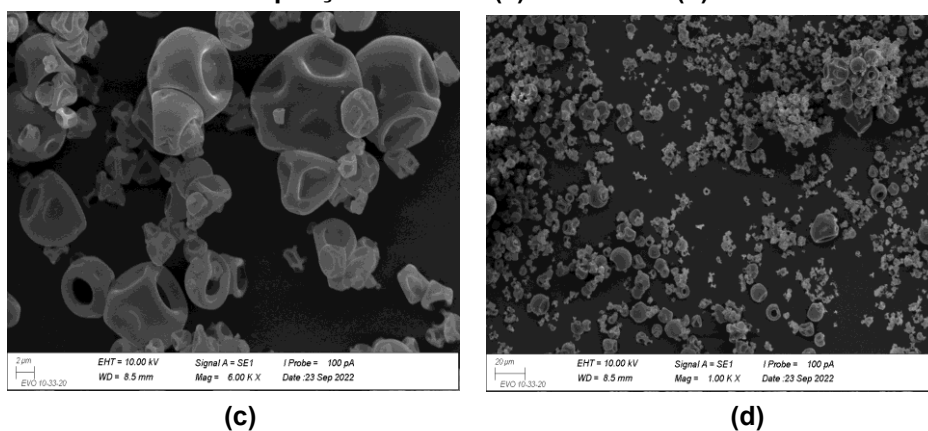
(a)

(b)

Fonte: Autoria própria (2022)



**Figura 3 - Morfologia das micropartículas de isoflavonas para formulação 2 (MP2), com ampliação de 6000x (c) e de 1000x (d)**

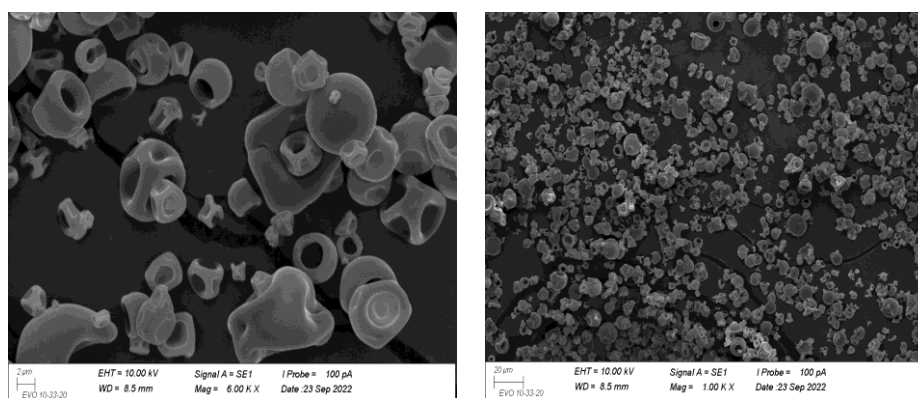


(c)

(d)

Fonte: Autoria própria (2022)

**Figura 4 - Morfologia das micropartículas da formulação branco, com ampliação de 6000x (e) e de 1000x (f)**



(e)

(f)

Fonte: Autoria própria (2022)

Na Tabela 3 são apresentados os valores de diâmetro médio das micropartículas obtidas nos diferentes ensaios por espalhamento de luz dinâmico (DLS). Pode-se observar que a incorporação de isoflavonas resultou em uma redução no diâmetro médio apresentado pelas micropartículas, sendo MP1 (2,5  $\mu\text{m}$ ) diferente significativamente de MP branco (4,3  $\mu\text{m}$ ) ( $p > 0,05$ ) e similar a MP2 (3,2  $\mu\text{m}$ ) ( $p > 0,05$ ). Estes resultados podem estar relacionados ao fato de as isoflavonas terem sido combinadas com a proteína do soro de leite, produzindo uma estrutura mais compacta, assim como reportado por Liu *et al.* (2022b). Estes resultados corroboram com os resultados de eficiência de encapsulação obtidos.

**Tabela 3 - Diâmetro médio das micropartículas da formulação branco (sem isoflavonas), micropartículas de isoflavonas formulação 1 (MP1) e micropartículas de isoflavonas formulação 2 (MP2)**

Amostras	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )
MP branco	4,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,5
MP1	2,5 <sup>b</sup> $\pm$ 0,3
MP2	3,2 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,6

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p  $\leq$  0,05).

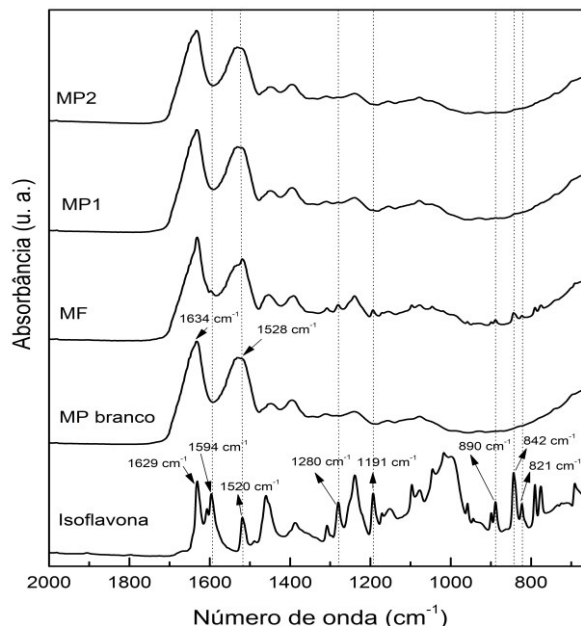
Fonte: A autoria própria (2022)

### 5.2.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em modo de refletância total atenuada (ATR)

A análise de FTIR-ATR foi utilizada para identificar grupos funcionais característicos das isoflavonas e proteínas, além de investigar interações moleculares e confirmar a eficiência de encapsulação, dado que bandas de infravermelho em comprimento de onda característico do composto bioativo em micropartículas indicam sua presença e emersão na sua superfície, sugerindo baixa eficiência de encapsulação (SCREMIN *et al.*, 2018; WORANUCH; YOKSAN, 2013).

Na Figura 5 são apresentados os espectros FTIR-ATR de isoflavonas livres, micropartículas formulação branco (MP branco), micropartículas de isoflavonas em isolado proteico de soro de leite para formulação 1 (MP1) e 2 (MP2), bem como, a mistura física (MF) das micropartículas branco e isoflavonas livres (MF). O espectro FTIR-ATR das isoflavonas demonstrou bandas similares as reportadas para isoflavonas agliconas, como a genisteína e daidzeína (YATSU *et al.*, 2016). Em 1629  $\text{cm}^{-1}$  observa-se uma banda relacionada a frequência de alongamento C=O (YATSU *et al.*, 2013; BHALLA *et al.*, 2019). A banda de vibração de C=C do anel aromático das isoflavonas pode ser observado em 1594  $\text{cm}^{-1}$  (NASEER *et al.*, 2021). Em 1520, 1280 e 1191  $\text{cm}^{-1}$  observa-se bandas características da vibração C=C do anel aromático (KRYSA *et al.*, 2022), de vibração C-O (NASEER *et al.*, 2021) e de deformação dos anéis aromáticos A e B (YASTU *et al.*, 2013; KRYSA *et al.*, 2022), respectivamente. Uma banda relacionada a ligações  $\beta$ -glicosídicas pode ser observada em 890  $\text{cm}^{-1}$  (KAMBLE; RANI, 2020), remetendo a presença de formas glicosiladas também presentes. Bandas relacionadas a substituição do C4 e fenil *p*-substituído podem ser visualizadas em 845  $\text{cm}^{-1}$  (MYKHAILENKO *et al.*, 2017) e 820  $\text{cm}^{-1}$  (YATSU *et al.*, 2013), respectivamente.

**Figura 5 - Espectros FTIR das mistura física (MF) correspondente as microcápsulas branco com isoflavona, das microcápsulas de isoflavona da formulação 1 (MP1) e 2 (MP2), das microcápsulas branco (MP branco) e da isoflavona pura (Isoflavona)**



Fonte: Autoria própria (2022)

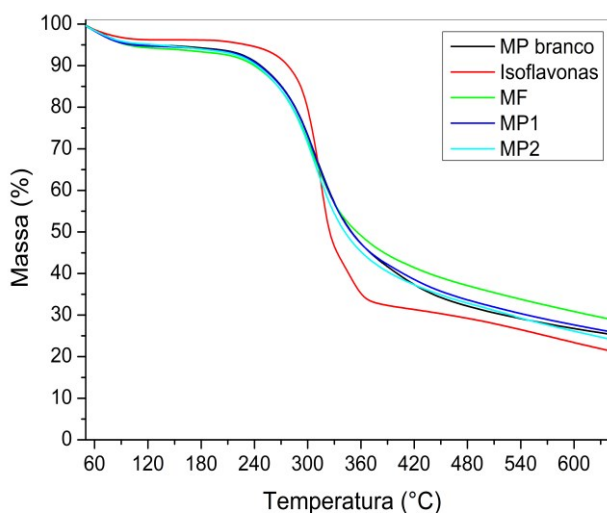
No espectro das micropartículas branco observa-se bandas características da proteína, em  $1635$  e  $1528\text{ cm}^{-1}$ , relacionadas as vibrações C=O de amida I e alongamento C-N e C-N-H da amida II, respectivamente (ANDRADE *et al.*, 2019; BAGHERI *et al.*, 2013; ESFANJANI *et al.*, 2015). As micropartículas das formulações 1 e 2 (MP1 e MP2) exibiram bandas similares à das micropartículas branco (MP branco). Já na mistura física (MF) de microcápsulas branco e isoflavonas, além das bandas características do material de parede, bandas características de isoflavonas são observadas em  $1594$ ,  $1520$ ,  $1280$ ,  $1191$ ,  $890$ ,  $842$  e  $821\text{ cm}^{-1}$ . Estas bandas não foram observadas nas amostras de micropartículas (MP1 e MP2), portanto, os resultados confirmam a eficiência de encapsulação das isoflavonas no presente estudo.

A semelhança das bandas características observadas pelas micropartículas de isoflavonas e as micropartículas branco estão associadas a interação entre o núcleo e material de parede nas micropartículas de isoflavonas. Se o núcleo forma um complexo com o material da parede por meio de interações não covalentes, tais como, interações de van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, a energia da parte incluída do núcleo será menor devido à redução das constantes de força da ligação correspondente para diminuir sua frequência de absorção (TANG *et al.*, 2002; CRUPI *et al.*, 2007).

### 5.2.3 Análises térmicas

Na Figura 6 são apresentadas as curvas termogravimétricas (TG) para as amostras de isoflavonas livres e para as formulações de micropartículas de isoflavonas e micropartículas branco (sem isoflavonas), bem como, a mistura física de isoflavonas com MP branco.

**Figura 6 - Curvas termogravimétricas (TG) das amostras de mistura física (MF) correspondente as micropartículas branco com isoflavonas livres, micropartículas de isoflavonas da formulação 1 (MP1) e 2 (MP2), das micropartículas branco (MP branco) e das isoflavonas livres**



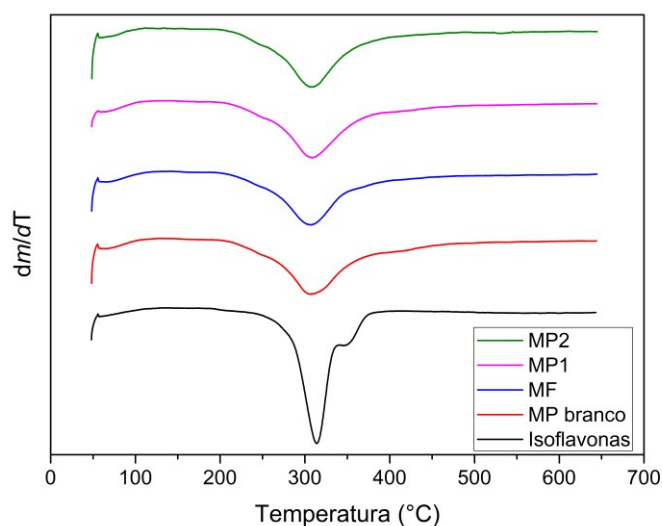
Fonte: Autoria própria (2022)

Próximo a temperatura de 100 °C foram observadas perdas de massa de 5% para as amostras de micropartículas e mistura física e de 4% para isoflavonas livres, o que corresponde a perda de água das amostras por evaporação. As micropartículas exibiram perda de massa de 10% em 245 °C sendo um indicativo do início da degradação térmica das proteínas do soro de leite (ZHOU *et al.*, 2017). Perda de massa de 10% foi observada na amostra de isoflavonas livres próximo a 285 °C, correspondendo ao início de sua decomposição térmica (DOWLING *et al.*, 2010).

As curvas derivadas (DTG) correspondentes às curvas TG das amostras (Figura 7) também foram geradas para facilitar visualização dos principais eventos térmicos registrados. Pode-se observar que as micropartículas e mistura física apresentam um evento térmico pronunciado próximo a 305 °C, correspondendo a temperatura máxima de degradação das proteínas. Já as isoflavonas puras exibem

um pico maior a 315 °C e outro menor a 350 °C, correspondendo a suas etapas de degradação térmica (DOWLING *et al.*, 2010; SANSONE *et al.*, 2013). Como o pico máximo de degradação das proteínas apresenta-se em uma região larga (entre 245 a 380 °C), o evento térmico de liberação das isoflavonas nas micropartículas acaba se sobrepondo dentro desta região. Estes resultados demonstram que as isoflavonas apresentam resistência térmica, de modo que o processo de encapsulação não afetou este comportamento, sendo que as micropartículas de isoflavonas exibiram comportamento similar ao das micropartículas sem isoflavonas. Em contrapartida, pode-se dizer que a menor presença de picos nas micropartículas evidencia a característica da matriz polimérica encapsulante, o que segundo Sansone *et al.* (2013) indica um processo de encapsulação eficiente das isoflavonas na matriz polimérica, corroborando com os resultados de eficiência de encapsulação e FTIR-ATR.

**Figura 7 - Curvas derivadas (DTG) correspondentes às termogravimétricas (TG) das amostras de mistura física (MF) correspondente as micropartículas branco com isoflavonas livres, micropartículas de isoflavonas da formulação 1 (MP1) e 2 (MP2), das micropartículas branco (MP branco) e das isoflavonas livres**



**Fonte: Autoria própria (2022)**

Ademais, a alta resistência térmica possibilita diversas aplicabilidades alimentícias que fazem o uso de temperatura, sem prejudicar os efeitos benéficos das isoflavonas. Como branqueamento, pasteurização e esterilização.

### 5.2.4 Determinação da umidade e atividade de água

Na Tabela 4 são apresentados os valores de atividade de água ( $A_w$ ) e de umidade das amostras de micropartículas. A atividade de água no produto é um parâmetro de grande importância, pois relaciona-se com a água presente no material que está disponível para o crescimento de microrganismos e para ocorrência de reações de degradação enzimática. A amostra MP2 exibiu menor valor de  $A_w$  (0,3292), diferindo das amostras MP1 (0,4216) e MP branco (0,4296) ( $p < 0,05$ ). Contudo, a  $A_w$  de todas as amostras foi inferior a 0,45, o que demonstra que o processo de secagem foi eficiente, uma vez que se recomendam valores menores que 0,6 para garantia de segurança microbiológica em produtos secos por atomização (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2010).

O teor de umidade residual é um parâmetro importante a ser determinado nas formas farmacêuticas sólidas, uma vez que, altos teores de umidade podem favorecer o crescimento microbiológico e a degradação química de constituintes reduzindo sua atividade biológica. A secagem por *spray drying* e temperatura de saída interferem nas propriedades dos produtos obtidos, inclusive na umidade residual. Os valores para o teor de umidade foram similares entre as amostras ( $p > 0,05$ ), sendo observado 1,92% para MP1, 1,98% para MP2 e 1,06% para o MP branco. De acordo com Gardiner *et al.* (2000) para o melhor armazenamento de pós é recomendado um residual de umidade de 4% ou menos, portanto, todos os ensaios apresentaram valores adequados.

**Tabela 4 - Valores de atividade de água ( $A_w$ ) e umidade para as amostras de micropartículas formulação 1 (MP1), formulação 2 (MP2) e micropartículas branco (MP Branco)**

Amostra	Umidade (%)	$A_w$
MP1	1,92 <sup>a</sup> ± 0,30	0,4216 <sup>a</sup> ± 0,0368
MP2	1,98 <sup>a</sup> ± 0,25	0,3292 <sup>a</sup> ± 0,0046
MP Branco	1,06 <sup>a</sup> ± 0,01	0,4296 <sup>b</sup> ± 0,0032

**Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 2). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).**

**Fonte: Autoria própria (2022)**

## 6 CONCLUSÃO

As isoflavonas foram eficientemente encapsuladas em isolado proteico de soro de leite por *spray-drying*, apresentando concentração triplicada de fenólicos totais em comparação a sua forma livre. A formulação de proporção 1:11 para IS:WPI se sobressaiu em relação a proporção de 1:22, demonstrando que o aumento da concentração de isoflavonas permitiu maior *EE%* e maior rendimento. Quanto a caracterização, as microcápsulas obtidas apresentaram superfície rugosa, diâmetros médios de 2,5 a 4,3  $\mu\text{m}$  e valores de atividade de água e umidade adequados quando comparados com a literatura. As análises de infravermelho e termogravimétricas permitiram confirmar a eficiência de encapsulação.

O teor de compostos fenólicos das isoflavonas encapsuladas, juntamente com os demais resultados das análises apresentadas, sugere potencial viabilidade de aplicação das micropartículas em suplementos alimentares ou produtos alimentícios. Portanto, o estudo de outras concentrações dos reagentes na microencapsulação, bem como, a aplicação das micropartículas de isoflavonas são sugeridos para trabalhos futuros. Assim como, demais testes como solubilidade, higroscopicidade, vida útil, molhabilidade, etc.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. **Boletim do centro de pesquisa de processamento de alimentos**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 324-328, 2002.
- AHMADIAN, Z.; NIAZMAND, R.; POURFARZAD, A. Microencapsulation of Saffron Petal Phenolic Extract: Their Characterization, In Vitro Gastrointestinal Digestion, and Storage Stability. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 10, p. 2745-2757, 2019.
- ALDIN, E. REITMEIER, H.A.; MURPHY, P. Bitterness of soy extracts containing isoflavones and saponins. **Journal of food Science**, v. 71, n. 3, p. S211-S215, 2006.
- ALISHAHI, A.; *et al.* Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, 935-940, 2011.
- ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; *et al.* Drying Techniques for Encapsulating. **Food Ingredients Wiley-Blackwell**, Hoboken, 2015.
- ANDRADE, J.; *et al.* FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 166-172, 2019.
- ARAÚJO, J. M. A.; *et al.* Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de B-glicosidase na formação do sabor amargo e adstringente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Brasil, v. 17, p. 137-141, 1997.
- ARISTÓTELES, A. **Metafísica**. V. I, II, III, 2ª edição. Ensaio introdutório, tradução do texto grego, sumário e comentários de Giovanni Reale. Tradução portuguesa Marcelo Perine. São Paulo: Edições Loyola. 2002.
- AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2 ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2005.
- BAGHERI, L.; *et al.* Nanoencapsulation of date palm pit extract in whey protein particles generated via desolvation method. **Food Research International**, v. 51, 866-871, 2013.
- BARBOSA, A. C. L. *et al.* Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 921-926, 2006.
- BARRETO, A.R.; *et al.* Coating Materials Used in the Microencapsulation of Probiotics. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 164-174, 2015.
- BHALLA, I.; *et al.* Daidzein cocrystals: An opportunity to improve its biopharmaceutical parameters. **Heliyon**, v. 5, 0-2669, 2019.
- BRASIL. **Biblioteca Virtual em Saúde. Ministério da Saúde**. Alimentos funcionais. 2009. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/dicas/220\\_alimentos\\_funcionais.html](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/dicas/220_alimentos_funcionais.html). Acesso em: 12 ago. 2021
- BRASIL. **Lei n. 243, de 26 de julho de 2018**. Substância bioativa. Disponível em: [https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379969/do1-2018-07-27-resolucao-da-](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379969/do1-2018-07-27-resolucao-da-)



diretoria-colegiada-rdc-n-243-de-26-de-julho-de-2018-34379917. Acesso em: 13 ago. 2021

BRASILEIRO, J. S. L. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. 2011. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de João Pessoa, Porto, Portugal, 2011.

CARMO, E. L.; *et al.* Microencapsulation by spray drying, new biopolymers and applications in the food industry. **Journal of Chemical Engineering and Chemistry**, v. 01, n. 02, p. 030-044, 2015.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; *et al.* Effects of isoflavones on beany flavour and adstringency of soymilk and cooked whole soybean granis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34 p. 1045-1052, 1999.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; *et al.* Environmental and genetic variation of isoflavones content of soybean seeds grown in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 11, p. 1444-1451, 2009.

CHAMPAGNE, C.P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Sciencedirect**, Canadá, v. 18, n. 2, p. 184-190, 2007.

CHATTERJEE, S.; JUDEH, Z. M. A. Microencapsulation of fish oil. **Lipid Technology**, v. 28, n. 1, p. 13-15, 2016.

CHEN, K. I.; *et al.* Enrichment of two isoflavone aglycones in black soymilk by using spent coffee grounds as an immobiliser for  $\beta$ -glucosidase. **Food Chemistry**, v. 139, p. 79-84, 2013.

CHEN, L.; *et al.* Intracellular signaling pathways of inflammation modulated by dietary flavonoids: The most recent evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, p. 2908-2924, 2018.

CHEN, Y.; *et al.* Bioprocessing of soybeans (*Glycine max* L.) by solid-state fermentation with *Eurotium cristatum* YL-1 improves total phenolic content, isoflavone aglycones, and antioxidant activity. **RCS Advances**, v. 10, p. 16928-16941, 2020.

CRUPI, V.; *et al.* UV-Vis and FTIR-ATR spectroscopic techniques for to study the inclusion complexes of genistein with  $\beta$ -cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 110-117, 2007.

DALPIZOL, B.; *et al.* Soy functional properties. **FAG Journal of Health**, v. 2, n. 3, p. 296-397, 2020.

DIAS, D. R.; BOTREL, D. A.; FERNANDES, R. V. D. B.; Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. **Current Opinion in Food Science**, v.13, p. 31-37, 2017.

DIAS, M. I. M. F. Cultura in vitro e técnicas de microencapsulação: aumento da produção e da estabilidade de compostos bioativos de espécies vegetais. 2017. 366 Tese (Doutorado em Química sustentável) – **Faculdade de Ciências, Universidade do Porto**, 2017.

DOWLING, S.; *et al.* The characterisation of structural and antioxidant properties of isoflavone. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, p. 1091-1098, 2010.

DUBEY, R.; *et al.* Microencapsulation Technology and Applications. **Defence Science Journal**, v. 59, n. 1, p. 82-95, 2009.

- DURU, K. C.; *et al.* The potential beneficial role of isoflavones in type 2 diabetes mellitus. **Nutrition Research**, v. 59, p. 1-15, 2018.
- ERDMAN, J. W.; *et al.* Flavonoids and heart health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 718-37, 2007.
- ESFANJANI, A. F.; *et al.* Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 165, p. 149-155, 2015.
- ESTEVEES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. Uma revisão. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 43-52, 2001.
- FATEHI-HASSANABAD, Z.; CHAN, C. B.; FURMAN, B. L. Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. **European Journal of Pharmacology**, v. 636, p. 8-17, 2010.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL. A microencapsulação a serviço da indústria alimentícia. **Revista FI**, v. 25, p. 1-4, 2013. Disponível em: [https://revista-fi.com.br/upload\\_arquivos/201606/2016060432070001464964229.pdf](https://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060432070001464964229.pdf). Acesso em: 08 ago. 2021.
- GARG, M. L.; *et al.* Means of Delivering Recommended Levels of Long Chain N-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Human Diets. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. 66-71, 2006.
- GAYA, P.; *et al.* Isoflavone metabolism by a collection of lactic acid bacteria and bifidobacteria with biotechnological interest. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 2., p. 117-124.
- GHARSALLAOUI, A. *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.
- GRGIC, J.; *et al.* Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds. **Antioxidants**, v. 09, p. 224-234, 2022.
- GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 330-347, 2004.
- GUIMARÃES, J. T.; *et al.* Impact of probiotics and prebiotics on food texture. **Current Opinion in Food Science**, v. 33, p. 38-44, 2020.
- GUR, J.; *et al.* FFC's advancement of functional food definition. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 8, n. 7, p. 385-397, 2018.
- GUTIÉRREZ, N.P.; *et al.* Identification and quantification of the main isoflavones and other phytochemicals in soy-based nutraceutical products by liquid chromatography-orbitrap high resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1348, p. 125-136, 2014.
- HARIRI, M.; *et al.* Beneficial effect of soy isoflavones and soy isoflavones plus soy protein in on serum concentration of C-reactive protein among postmenopausal women: An updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 59, p. 2-10, 2021.

HSUAN-HSIAO, Y.; HO, C. T.; PAN, M. H. Bioavailability and health benefits of major isoflavone aglycones and their metabolites. **Journal of Functional Foods**, v. 74, p. 104 - 164, 2020.

HOLKEM, A. T.; *et al.* Microencapsulação de probióticos por gelificação iônica interna. **Ciência e Natura**, Santa Maria Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, v. 37, p. 116-118, 2015.

KAMBLE, D, B.; RANI, S. Bioactive components, in vitro digestibility, microstructure and application of soybean residue (okara): a review. **Legume Science**, v. 32, p. 1-9, 2020.

KRYSA, M.; *et al.* FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids - A review. **Food Chemistry**, v. 393, p. 133-430, 2022.

LAI, X.; *et al.* Association of dietary isoflavone consumption with subclinical cardiovascular disease in middle-aged and elderly Chinese people. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 31, n. 8, p. 2302-2310, 2021.

LARKIN, T. A.; *et al.* The key importance of soy isoflavone bioavailability to understanding health benefits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 538-552, 2008.

LEANDRO, K. C.; ALBERT, A. L. M.; SANTOS, J. R. P. Importância de uma regulamentação específica com as definições e classificações dos produtos comercializados como suplementos alimentares, alimentos funcionais e nutracêuticos. **Revista de Direito Sanitário**, v. 19, n. 3, p. 54-67, 2019.

LEE, S. W.; *et al.* Effects of oven drying, roasting and explosive blowing process on the distribution of isoflavones in soybean. **Food Chemistry**, v. 112, p. 316-320, 2009.

LI, Z.; *et al.* A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 153-164, 2015.

LIRA, C. R. G.; *et al.* Nutracêuticos: aspectos sobre segurança controle de qualidade e legislação. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 1, p. 45-49, 2009. Disponível em: [http://rbfarma.org.br/files/pag\\_45a49\\_180\\_nutraceuticos.pdf](http://rbfarma.org.br/files/pag_45a49_180_nutraceuticos.pdf) Acesso em: 13 ago. 2021.

LIU, Q.; *et al.* Development of whey protein nanoparticles as carriers to deliver soy isoflavones. **LWT - Food Science and Technology**, v. 155, p. 2-8, 2022a.

LIU Q.; *et al.* Physicochemical and *in vitro* digestion properties of soy isoflavones loaded whey protein nanoparticles using a pH-driven method. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 82, p. 2-12, 2022b.

LIU, K.; *et al.* Changes in conformation and functionality of whey proteins induced by the interactions with soy isoflavones, **LWT - Food Science and Technology**, v. 163, n. 113555, p. 2-7, 2022c.

LIU, Y.; *et al.* The effect of soy isoflavone combined with calcium on bone mineral density in perimenopausal Chinese women: a 6-month randomised double-blind placebo-controlled study. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 71, n. 4, p. 473-481, 2019.

MAHMOUD, A. M.; YANG, W.; BOSLAND, M. C. Soy isoflavones and prostate cancer: a review of molecular mechanisms. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, p. 116-132, 2014.

MALLOY, K. M.; *et al.* Novasoy and genistein inhibit endometrial cancer cell proliferation through disruption of the AKT/mTOR and MAPK signaling pathways. **American Journal of Translational Research**, v. 10, n. 3, p. 784-795, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29636868/> Acesso em: 07 ago. 2021.

MANTOVANI, D.; *et al.* Chromatographic Quantification of Isoflavone Content from Soy Derivates Using HPLC Technique. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, p. 766-769, 2009.

MESSINA, M. Impact of soy foods on the development of breast cancer and the prognosis of breast cancer patients. **Forsch Koplementmed**, v. 23, n. 2, p. 75-80, 2016.

MYKHAILENKO, O.; *et al.* Isoflavonoids from the rhizomes of *Iris hungarica* and antibacterial activity of the dry rhizomes extract. **Ars Pharm**, v. 58, n. 1, p. 39-45, 2017.

NASEER, N, M.; *et al.* Isolation of Isoflavones from Iraqi *Trifolium pretense*. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 10, p. 1-15, 2021.

NAZZARO, F.; *et al.* Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 182-186, 2012.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, S. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806-1815, 2015.

NIAMNUY, C.; *et al.* Impacts of spray drying conditions on stability of isoflavones in microencapsulated soybean extract. **Drying Technology an International Journal**, v. 37, p. 1844-1862, 2019.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, PR, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

PATEIRO, M.; *et al.* Nanoencapsulation of Promising Bioactive Compounds to Improve Their Absorption, Stability, Functionality and the Appearance of the Final Food Products. **Molecules**, v. 26, p. 1547-1573, 2021.

PAVESE, J. M.; *et al.* Genistein inhibits human prostate cancer cell detachment, invasion, and metastasis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Chicago, v. 100, n. 1, p. 431S-436S, 2014.

PEREIRA, K. C.; *et al.* Microencapsulation and release controlled by the diffusion of food ingredients produced by spray drying: a review. **Brazilian Journal of Foods Technology**, Campinas, v. 21, p. 2-5, 2018.

PERON, A. P.; *et al.* Utilização das isoflavonas presentes na soja (*Glycine max* (L) Merrill) na prevenção e tratamento de doenças crônicas – uma breve revisão. **Arquivos do Mudi**, v. 12, n. 23, p. 51-57. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/19201> Acesso em: 10 ago. 2021.

- PIMENTEL, C. V. M. B.; ELIAS, M. F.; PHILIPPI, S. T. **Nutrição e Alimentação**. Alimentos funcionais e compostos bioativos. 1. ed. São Paulo, 2019.
- PUDENZ, M.; ROTH, K.; GERHAUSER, C. Impact of soy isoflavones on the epigenome in cancer prevention. **Nutrients**, v. 6, n. 10, p. 4218-72, 2014.
- RAINS, J.R.; JAIN, S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, p. 567-575, 2011.
- RAQUE, P. M.; BRANDELLI, A. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.144, p. 01-10, 2021.
- RASHID, L. Different nano-delivery systems for delivery of nutraceuticals. **Food Bioscience**, v. 101258, p. 03-64, 2021.
- RATTES, A. L. R.; OLIVEIRA. Spray Drying Conditions and Encapsulating Composition Effects on Formation and Properties of Sodium Diclofenac Microparticles. **Powder Technology**, v. 171, n. 1, p. 7-14, 2007.
- RÉ, M. I. Microencapsulação – em busca de produtos ‘inteligentes’. **Ciência Hoje**, v. 27, n. 162, p. 24-29, 2000.
- ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 38, p. 1288-1294, 1990.
- ROSIER, E. A.; *et al.* Determinação de isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “iogurte” de soja. **Alimentos Nutrição**, São Paulo, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 96-97, 2004. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/260/26024221013.pdf> Acesso em: 10 jul. 2021.
- ROSSO, A. C.; *et al.* Microencapsulação de compostos bioativos em alimentos. **Boletim Técnico Científico**, v. 5, n. 2, p. 2359-2664, 2019. Disponível em: <https://periodicos.iffarroupilha.edu.br/index.php/boletim-tecnico-cientifico/article/view/227> Acesso em: 04 ago. 2021.
- SAHIN, I.; *et al.* Soy Isoflavones in Integrative Oncology: Increased Efficacy and Decreased Toxicity of Cancer Therapy. **Integrative Cancer Therapies**, v. 18, p. 01-05, 2019.
- SANGUANSRI, L., AUGUSTIN, M. A. Microencapsulation in functional food product development. *In*: SMITH, J.; CHARTER, E. **Functional Food Product Development**, USA, v. 8, p. 3-13, 2011.
- SANSONE, S.; *et al.* Enhanced technological and permeation properties of a microencapsulated soy isoflavones extract. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 298-305, 2013.
- SCHAFROTH, N.; *et al.* Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 8-15, 2012.
- SCREMIN, F. R.; *et al.* Synthesis and characterization of protein microcapsules for eugenol storage. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 131, p. 653-660, 2018.
- SETCHELL, K. D. R., CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **The Journal Nutrition**, v. 129, p. 758S-767S, 1999.

- SETCHELL, K. D. R. The history and basic science development of soy isoflavones. **Menopause**, v. 24, n. 12, p. 1338-50, 2017.
- SHETH, J. Impact of Covid-19 on consumer behavior: Will the old habits return or die. **Journal of Business Research**, v. 117, p. 280-283, 2020.
- SILVA, C. E.; *et al.* Teores de isoflavonas em grãos inteiros e nos componentes dos grãos de diferentes cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)". **Revista Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, v. 15, p. 150-156, 2012.
- SINGH, T. K. *et al.* Influence of heat and shear induced protein aggregation on the in vitro digestion rate of whey proteins. **Food and Function**. v. 5, p. 2686-2698, 2014.
- SINGH, H. Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1938-1944, 2011.
- 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. 152-178, 1999.
- SOBRINHO, E. C. S., FARIAS, M. C. A microencapsulação na indústria alimentícia. **Infarma**, v. 24, n. 1-3, p 85-86, 2012. Disponível em: <http://revistas.cff.org.br/infarma/article/view/364> Acesso em: 11 jul. 2021
- SONG, T.; *et al.* Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 1474S-1479S, 1998.
- TANG, B.; *et al.* Study on the supramolecular interaction of curcumin and  $\beta$ -cyclodextrin by spectrophotometry and its analytical application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1355-1361, 2002.
- TANG, C-H. Assembly of food proteins for nano- encapsulation and delivery of nutraceuticals (a mini-review). **Food Hydrocolloids**, v. 117, p. 1-12, 2021.
- TYAGI, V.; *et al.* Development of phase change materials based microencapsulated technology for buildings: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 2, p. 1373-1391, 2011.
- WANDREY, C.; *et al.* Encapsulation Materials. In **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**. Springer, v. 3, p. 31-100, 2009.
- WORANUCH, S.; YOKSAN, R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p. 578-585, 2013.
- YATSU, F, K, J.; *et al.* Multiple complexation of cyclodextrin with Soy isoflavones present in an enriched fraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 226-235, 2013.
- YATSU, F. K. J.; *et al.* Isoflavone-aglycone fraction from *Glycine max*: a promising raw material for isoflavone-based pharmaceutical or nutraceutical products. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, p. 259-267, 2016.
- ZHOU, D.; *et al.* Preparation of walnut oil microcapsules employing soybean protein isolate and maltodextrin with enhanced oxidation stability of walnut oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 83, p. 292-297, 2017.