

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

THANISE ANTUNES DIAS

**Estudo *in vitro* de ações biológicas da ficocianina livre e
microencapsulada**

Passo Fundo

2021

Thanise Antunes Dias
Engenheira de Alimentos

**Estudo *in vitro* de ações biológicas da ficocianina livre e
microencapsulada**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa

Coorientadora: Profa. Dra. Telma Elita Bertolin

Linha de pesquisa: Qualidade e Propriedades Funcionais de Alimentos

Passo Fundo

2021

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

“Estudo *in vitro* de ações biológicas da ficocianina livre e microencapsulada”

Elaborada por
Thanise Antunes Dias

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comissão Examinadora



**Jorge Alberto Vieira Costa, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)**



**Telma Elita Bertolin, Dra., UPF
(Orientadora)**



Laura Beatriz Rodrigues, Dra., UPF



Vania Zanella Finto, Dra., UFFS

**Passo Fundo, RS, Brasil
2021**

CIP – Catalogação na Publicação

D541e Dias, Thanise Antunes
Estudo *in vitro* de ações biológicas da ficocianina livre e microencapsulada [recurso eletrônico] / Thanise Antunes Dias. – 2021.
4 MB ; PDF.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.
Coorientadora: Profa. Dra. Telma Elita Bertolin.
Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2021.

1. Antiinflamatório. 2. Compostos bioativos.
3. Ficocianina. 4. Antioxidantes. I. Costa, Jorge Alberto Vieira, orientador. II. Bertolin, Telma Elita, coorientadora.
III. Título.

CDU: 664

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer aqui às pessoas que muito me ajudaram a tornar este estudo uma realidade.

Por sua orientação, confiança e ensinamentos, sou grata ao Prof. Jorge Alberto Vieira Costa.

Por sua coorientação, sua amabilidade e sensibilidade, sou grata a Profa Telma Elita Bertolin.

Por terem me encontrado nesse caminho, me aceitado e decidido caminhar ao meu lado, obrigada Caroline Vicenzi, Franciele Gottardo, Guilherme Giubel, Ruth Campomanes e Stefani Werlang. Vocês fizeram meus dias mais felizes!

Pelo apoio incondicional, por terem feito parte do que me tornei e serem minha fortaleza, obrigada família: Mariom Dias, Isabel Antunes, Tath Dias e Adrian Rodrigues. Amo vocês!

Por ter me acolhido, me ensinado tanto e ser luz na minha vida, obrigada Bárbara Biduski. Você é excepcional!

Pela amizade, pelo apoio emocional, por ter me ajudado tantas vezes a levantar e seguir em frente, obrigada Jaqueline Rumão. Sem você não sei o que eu faria, você é incrível!

Pela cumplicidade, por ser um grande colaborador e incentivador do meu trabalho e por dividir a vida comigo, obrigada Arthur Sbardelotto. Você foi essencial em cada um dos meus passos!

Gratidão!

O saber se aprende com os mestres e os livros.

A sabedoria, só com o corriqueiro da vida.

Cora Coralina

RESUMO

A busca por terapias alternativas naturais tem aumentado o uso de compostos bioativos na indústria alimentícia e nutracêutica. A ficocianina é um composto bioativo com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras, potencial anticâncer, entre outros. No entanto, sua baixa estabilidade quanto a luminosidade, temperatura e acidez limita sua aplicação. A microencapsulação é uma técnica utilizada para preservar compostos bioativos e aumentar sua biodisponibilidade. Este estudo objetivou avaliar a influência da proporção material de parede e núcleo sobre a biodisponibilidade da ficocianina e sua ação anti-inflamatória *in vitro*. A ficocianina foi microencapsulada nas proporções 0,75% e 1%, através de gelificação iônica, utilizando alginato de sódio como material de parede nas proporções 1% e 1,5%. As capsulas foram avaliadas quanto a morfologia, eficiência de encapsulação (EE), grupos funcionais, estabilidade térmica, perfil de liberação em simulação do sistema digestório (pHs ácido e básico) além do perfil antioxidante e anti-inflamatório. As proporções de núcleo/material de parede não influenciaram significativamente a EE. O aumento de alginato de sódio ocasionou aumento na solubilidade em água das capsulas, porém, o aumento da concentração de ficocianinas acarretou em diminuição deste parâmetro. Além disso, a microencapsulação da ficocianina promoveu a manutenção da estabilidade antioxidante durante o armazenamento, na forma de microcápsulas (5 semanas). A ficocianina microencapsulada apresentou inibição de desnaturação proteica de 95,96%, inibição de protease de 72,5%, inibição de hemólise induzida por solução hipotônica e por calor de 96,64% e 96,56%, respectivamente. Em geral, as microcápsulas apresentaram resistência térmica e ao pH estomacal, possibilitando a liberação da ficocianina em pH intestinal, conferindo sua biodisponibilidade e preservando suas propriedades funcionais. Diante disso, a ficocianina microencapsulada apresentou potencial para reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Palavras-chave: Anti-inflamatório. Biocomposto. Biodisponibilidade. Compostos bioativos.

ABSTRACT

The search for alternative therapies has increased the use of bioactive compounds in the food and nutraceutical industry. Phycocyanin is a bioactive compound with antioxidant, anti-inflammatory, hepatoprotective, anti-cancer potential, among others. However, its low stability in terms of luminosity, temperature and acidity limits its application. Microencapsulation is a technique used to preserve bioactive compounds and increase their bioavailability. This study aimed to evaluate the core:wall material ratio on the bioavailability of phycocyanin and its anti-inflammatory action in vitro. Phycocyanin was microencapsulated in the proportions 0.75% and 1%, through ionic gelation, using sodium alginate as wall material in the proportions 1% and 1.5%. The capsules were evaluated for morphology, encapsulation efficiency (EE), functional groups, thermal stability, release profile in simulation of the digestive system (acidic and basic pHs) in addition to the antioxidant and anti-inflammatory profile. The core:wall material ratio did not significantly influence the EE. The increase in sodium alginate caused an increase in the water solubility of the capsules, however, the increase in the concentration of phycocyanins resulted in a decrease. In addition, phycocyanin microencapsulation promoted the conservation of antioxidant stability during storage, in the form of microcapsules (5 weeks). The microencapsulated phycocyanin showed inhibition of protein denaturation of 95.96%, protease inhibition of 72.5%, inhibition of hemolysis induced by hypotonic solution and heat of 96.64% and 96.56%, respectively. In general, the microcapsules showed thermal and stomach pH resistance, enabling the release of phycocyanin at intestinal pH, ensuring its bioavailability and preserving its functional properties. Therefore, the microencapsulated phycocyanin showed potential to reduce the expression of pro-inflammatory cytokines.

Keywords: Anti-inflammatory. Biocomposite. Bioavailability. Bioactive compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 . Mecanismo da inflamação.....	18
Figura 2 . Estrutura do ficobilisoma (PBS), composta por ficobiliproteínas (PBP) em uma ordem específica que permite a transferência eficiente de energia unidirecionalmente para o centro de reação. A cascata de transferência de energia começa com ficoceritrina (discos acoplados à PC) em ficocianina (PC) e aloficocianina (esferas) e finalmente no centro de reação nos fotossistemas II (elipse maior e central) e I (elipses laterais).....	21
Figura 3 . Estrutura de ficocianina (PC). (A) Estrutura cristalina do PC da cyanobacterium <i>S. platensis</i> na forma de hexâmero. (B) Representação esquemática da montagem do PC. É composto por duas subunidades proteicas, cadeias α e β , uma ficocianobilina (PCB) está ligada à subunidade α e dois PCBs estão ligados à subunidade β . (C) Estrutura química do PCB, o cromogênio responsável pela cor azul do PC.....	22
Figura 4 . Esquema do processo de desenvolvimento de microencapsulação de compostos bioativos para aplicação em matrizes alimentares e preservação da bioatividade.....	24
Figura 5 .- Representação esquemática do processo de microencapsulação por gelificação iônica.....	25
Figura 6 . Espectros de infravermelho da ficocianina livre, da microcápsula de alginato e das microcápsulas de alginato carregadas com ficocianina.....	33
Figura 7 . Deconvolução de bandas dos espectros de infravermelho das microcápsulas carregadas de ficocianina.	34
Figura 8 . Curvas termogravimétricas da ficocianina livre, da microcápsula de alginato de sódio e das microcápsulas de alginato de sódio carregadas de ficocianina.....	35
Figura 9 . Perfil de liberação de ficocianina microencapsulada com diferentes concentrações de material de parede/núcleo.....	37
Figura 10 . Inibição da desnaturação proteica da ficocianina livre (0,05%), microencapsulada e do diclofenaco de sódio (controle).....	39
Figura 11 . Disperção de tamanho de partícula da microcápsula.....	48
Figura 12 . Espectros de infravermelho das microcápsulas de alginato de sódio (Controle), das microcápsulas de alginato carregadas com ficocianina e da ficocianina livre.....	49
Figura 13 . Curvas termogravimétricas da microcápsula de alginato vazia (controle), ficocianina livre e microencapsulada.....	50
Figura 14 . Perfil de liberação da ficocianina microencapsulada.....	51

Figura 15 . Estabilidade das microcápsulas de alginato de sódio carregadas com ficocianina	53
Figura 16 . Ação anti-inflamatória da ficocianina livre e encapsulada.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 . Eficiência de encapsulação e solubilidade em água das microcápsulas.....	32
Tabela 2 . Atividade antioxidante da ficocianina livre e microencapsulada.....	38
Tabela 3 . Atividade antioxidante da ficocianina livre e microencapsulada.....	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 INFLAMAÇÃO E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS.....	17
2.1.1 Mecanismo de inflamação.....	17
2.2 FICOCIANINA.....	20
2.2.1 Estrutura da ficocianina.....	20
2.2.2 Propriedades da ficocianina.....	22
2.3 MICROENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	24
3 ENCAPSULAÇÃO DE FICOCIANINA-ALGINATO: CARACTERIZAÇÃO E AÇÕES BIOLÓGICAS.....	27
3.1 INTRODUÇÃO.....	27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.2.1 Material.....	28
3.2.2 Microencapsulação por gelificação iônica.....	28
3.2.3 Eficiência de microencapsulação.....	28
3.2.4 Solubilidade em água.....	29
3.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	29
3.2.6 Análise termogravimétrica (TGA).....	29
3.2.7 Perfil de liberação de ficocianina.....	29
3.2.8 Perfil antioxidante.....	30
3.2.8.1 Capacidade antioxidante pelo radical ABTS.....	30
3.2.8.2 Compostos fenólicos totais.....	30
3.2.9 Perfil anti-inflamatório <i>in vitro</i>	31
3.2.9.1 Inibição da desnaturação de proteína.....	31
3.2.10 Análise estatística.....	31
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.3.1 Eficiência de encapsulação.....	31
3.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	32
3.3.3 Análise termogravimétrica (TGA).....	34
3.3.4 Perfil de liberação de ficocianina microencapsulada.....	36
3.3.5 Atividade antioxidante.....	37

3.3.6 Atividade anti-inflamatória.....	38
<i>Inibição da desnaturação da albumina.....</i>	<i>38</i>
3.4 CONCLUSÃO.....	39
4 AÇÃO ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DE FICOCIANINA LIVRE E MICROENCAPSULADA.....	41
4.1 INTRODUÇÃO.....	41
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.2.1 Material.....	42
4.2.2 Microencapsulação por gelificação iônica.....	42
4.2.3 Eficiência de microencapsulação.....	42
4.2.4 Solubilidade em água.....	43
4.2.5 Distribuição do tamanho de partícula.....	43
4.2.6 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	43
4.2.7 Análise termogravimétrica (TGA).....	43
4.2.8 Perfil de liberação de ficocianina.....	44
4.2.9 Estabilidade de armazenamento das microcápsulas.....	44
4.2.10 Perfil antioxidante.....	44
4.2.10.1 Capacidade antioxidante pelo radical ABTS.....	44
4.2.10.2 Compostos fenólicos totais.....	45
4.2.11 Perfil anti-inflamatório <i>in vitro</i>	45
4.2.11.1 Inibição da desnaturação de proteína.....	45
4.2.11.2 Hemólise induzida por solução hipotônica.....	46
4.2.11.3 Hemólise induzida pelo calor.....	46
4.2.11.4 Inibição da protease.....	46
4.2.12 Análise estatística.....	47
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.3.1 Eficiência de encapsulação, solubilidade e tamanho das microcápsulas.....	47
4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	49
4.3.3 Análise termogravimétrica (TGA).....	50
4.3.4 Perfil de liberação de ficocianina microencapsulada.....	51
4.3.5 Estabilidade das microcápsulas durante armazenamento.....	52
4.3.6 Atividade anti-inflamatória.....	53
4.4 CONCLUSÃO.....	55

5 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) tem se tornado uma ameaça à saúde humana devido ao crescente número de mortes decorrentes dessas doenças. Entre as DCNT que mais causam mortes no mundo encontram-se as doenças do aparelho circulatório, câncer, diabetes mellitus e doenças neurodegenerativas (WHO, 2019). Além disso, diversas dessas doenças estão associadas à inflamação crônica (KISHORE et al., 2019; BAI et al., 2021).

A inflamação é um mecanismo fisiológico de defesa contra estímulos exógenos e endógenos, como infecções, patógenos e lesões teciduais. Apesar da inflamação ter sua importante função no organismo, pode tornar-se uma inflamação crônica e, assim, contribuir com o desenvolvimento de doenças como obesidade (VILLARROYA et al., 2018), aterosclerose (KASIKARA et al., 2018), artrite reumatoide (CHIMENTI et al., 2015), doença inflamatória intestinal, doença de Alzheimer (HENEKA et al., 2015), depressão (KOOPMAN et al., 2017), doença de Parkinson (JOSHI; SINGH, 2018) e câncer (COUSSENS; WERB, 2002). A busca por terapias alternativas como o uso compostos bioativos tem aumentado (BAI et al., 2021).

A ficocianina é um pigmento de natureza proteica, característico por sua coloração azul intensa e por suas propriedades funcionais, como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras, proteção anticâncer, entre outros (PATEL et al., 2005; FERNÁNDEZ-ROJAS et al., 2014; BERTOLIN et al., 2017; LIMA et al., 2018; HSIEH-LO et al., 2019). Apesar da ficocianina ser utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia por sua cor, seu uso ainda é limitado devido sua instabilidade à luz e à outros fatores, como baixos valores de pH, fortes forças iônicas, altas temperaturas e presença de álcoois (CHAIKLAHAN et al., 2012; FALKEBORG et al., 2018). Dessa forma, durante a ingestão, sua bioatividade é facilmente perdida devido ao pH estomacal extremamente baixo. Para preservar as propriedades bioativas dos compostos funcionais, utiliza-se o método de microencapsulação, no qual o composto é retido dentro de um material polimérico protetor (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015). A microencapsulação permite que os compostos bioativos sejam submetidos à situações adversas garantindo a estabilidade e a biodisponibilidade para absorção no intestino (JOYE, DAVIDOV-PARDO; McCLEMENTS, 2014; LI et al., 2015; WANG et al., 2014).

O grande potencial da ficocianina já estudado e a escassez de resultados científicos sobre o efeito das propriedades funcionais da ficocianina microencapsulada, como suas

propriedades anti-inflamatórias, evidenciam a necessidade de estudos, caracterizando esta proposta como inovadora.

Diante disso, este estudo, que está inserido na linha de pesquisa 2 do Programa de pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) e trabalha a Qualidade e Propriedades Funcionais de Alimentos, incluído na temática de Avaliação de Propriedades Funcionais e Nutracêuticas de Bioprodutos e Compostos, tem como objetivo analisar a ação antioxidante e anti-inflamatória da ficocianina livre e microencapsulada, além de caracterizar as microcápsulas quanto à interações com meio, estabilidade térmica e liberação no pH intestinal, visando a preservação das propriedades do biocomposto e sua biodisponibilidade. Portanto, este estudo é conduzido pelos seguintes questionamentos: o processo de microencapsulação preserva a bioatividade da ficocianina em condições adversas? A ficocianina microencapsulada possui liberação do composto bioativo em pH intestinal? O efeito anti-inflamatório da ficocianina é preservado pela microencapsulação?

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INFLAMAÇÃO E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS

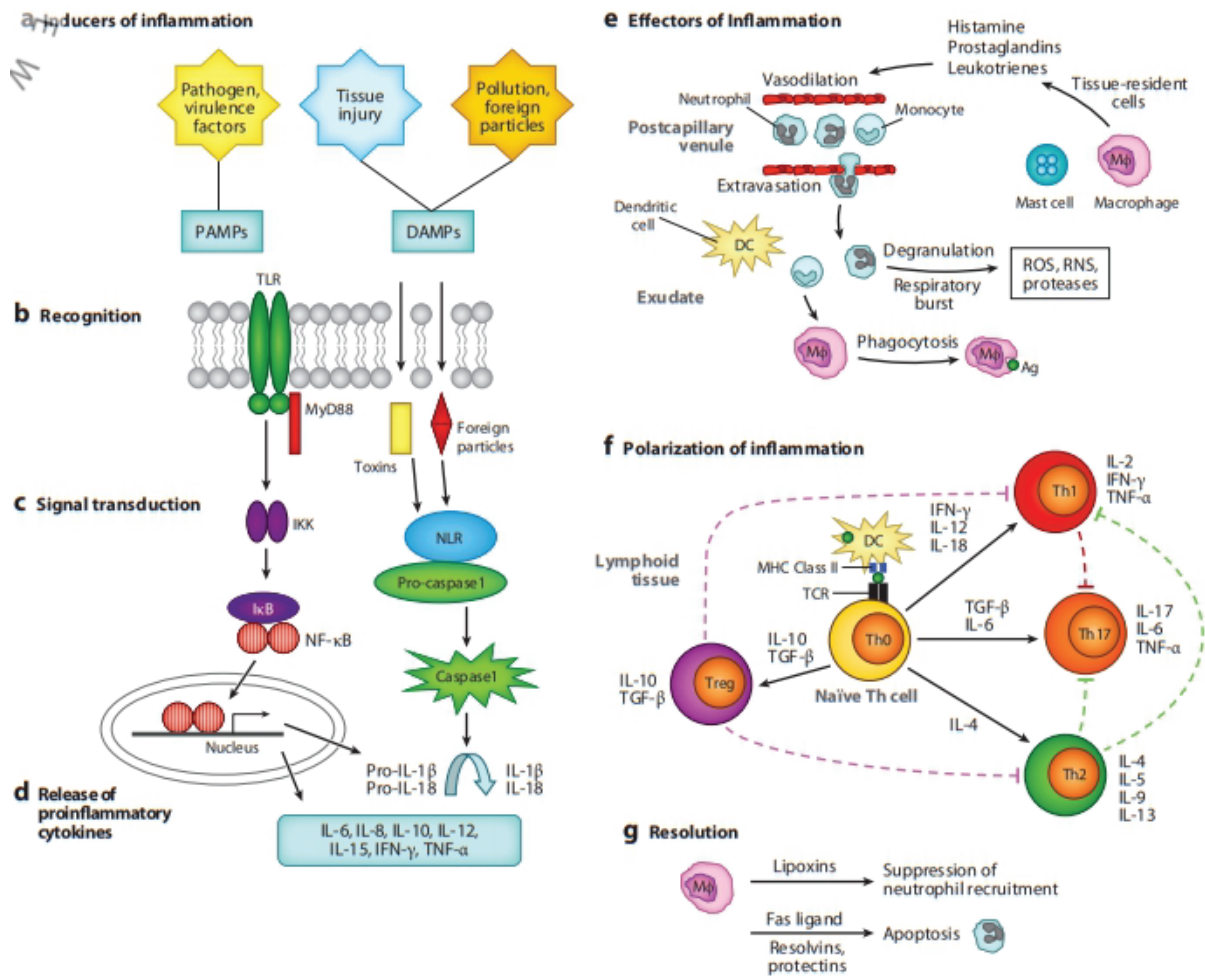
Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), as doenças não transmissíveis tornaram-se mais proeminentes nos últimos anos. A cardiopatia isquêmica foi a principal causa de mortes entre os anos de 2000 e 2019, subindo de mais de 2 milhões para quase 9 milhões de mortes, nesse período. Entre as 10 principais causas de morte, 7 são doenças não transmissíveis, como acidente vascular encefálico, doença pulmonar obstrutiva crônica, câncer de traqueia, brônquio e pulmão, doença de Alzheimer e outras formas neurodegenerativas, diabetes e doenças renais (WHO, 2019).

Diversas doenças não transmissíveis como obesidade (VILLARROYA et al., 2018), aterosclerose (KASIKARA et al., 2018), artrite reumatoide (CHIMENTI et al., 2015), doença inflamatória intestinal, doença de Alzheimer (HENEKA et al., 2015), depressão (KOOPMAN et al., 2017), doença de Parkinson (JOSHI; SINGH, 2018) e câncer (COUSSENS; WERB, 2002) estão associadas à inflamação crônica. A inflamação é um processo fisiológico que responde, através de um mecanismo de defesa, contra estímulos exógenos e endógenos, como infecções, patógenos e lesões teciduais (CHAN et al., 2019). Este processo fisiológico consiste na vasodilatação e no recrutamento de granulócitos e leucócitos para os tecidos inflamados, para remover o estímulo e restaurar a homeostase. Apesar da sua importante função fisiológica, a inflamação pode tornar-se um processo crônico, se a resposta inflamatória aguda não eliminar a estimulação (BAI et al., 2021; LUCENA et al., 2018).

2.1.1 Mecanismo de inflamação

A inflamação é um procedimento bastante complicado a nível molecular, associada a alvos específicos e ao envolvimento de várias expressões pró-inflamatórias (KISHORE et al., 2019). A produção de mediadores pró-inflamatórios durante a inflamação é promovida por macrófagos que incluem fator de necrose tumoral (TNF- α), várias interleucinas, prostaglandinas (PGs), óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Figura 1a). As doenças crônico-degenerativas como asma, câncer, artrite e outras doenças relacionadas estão associadas à superprodução desses mediadores pró-inflamatórios (ROCK; KONO, 2008).

Figura 1. Mecanismo da inflamação.



Fonte: Ashley et al. (2002).

A inflamação consiste em um conjunto de processos imunológicos, fisiológicos e comportamentais, rigidamente regulados e comandados por moléculas de sinalização imunológica, chamadas citocinas. A primeira etapa da inflamação envolve o reconhecimento da infecção ou dano (Figura 1b). Isso é tipicamente alcançado pela detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) são moléculas endógenas que sinalizam danos ou necrose e também são reconhecidas pelo sistema imunológico inato (JANEWAY et al., 2005).

Uma vez que ocorre o reconhecimento, os receptores transmembrana Toll-like (TLRs) ativam as vias de sinalização comuns que culminam na ativação de NF- κ B (fator nuclear kappa-light-chain-enhancer de células B ativadas (Figura 1c). Este fator de transcrição é encontrado em todos os tipos de células e permanece em um estado inativado ligado a uma proteína inibidora, I κ B (GHOSH et al., 1998). Após a transdução do sinal, NF- κ B é liberado

de I κ B e translocado para o núcleo, onde a transcrição é regulada positivamente através da ligação a genes alvo. Os NLRs intracelulares respondem a um número crescente de DAMPs que alertam o sistema imunológico sobre lesão celular e fornecem uma via próxima para detectar a exposição a possíveis toxinas ou poluentes no ambiente.

A transcrição e tradução de genes levam ao terceiro estágio da inflamação, que é a expressão induzível de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1-beta (IL-1 β), IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e outros (Figura 1d). Em conjunto com quimiocinas (atrativos) e várias moléculas coestimulatórias, essas proteínas solúveis facilitam o recrutamento de células efetoras (Figura 1e), como monócitos e neutrófilos para o local da perturbação. Os neutrófilos criam um ambiente citotóxico ao liberar substâncias químicas nocivas dos grânulos citoplasmáticos (um processo denominado degranulação). A liberação rápida desses produtos químicos requer consumo de glicose e oxigênio, conhecido como explosão respiratória. Os produtos químicos tóxicos liberados incluem espécies altamente reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS, respectivamente) e várias proteases. Essas substâncias são destrutivas para patógenos e hospedeiros e essencialmente induzem a liquefação do tecido circundante para evitar a metástase microbiana (NATHAN, 2002). Esses mecanismos efetores são, portanto, os principais contribuintes para os danos colaterais no indivíduo.

O efeito dessas interações culmina nos sinais estereotipados de inflamação local: calor, inchaço, vermelhidão, dor e perda de função. As funções efetoras da inflamação são posteriormente reguladas pelo sistema imune adaptativo (Figura 1f). A última fase da inflamação é sua resolução (Figura 1g), que é crítica para limitar o dano colateral ao indivíduo (SERHAN; SAVILL, 2005). Após as primeiras horas de inflamação, um programa coordenado de resolução é colocado em movimento por macrófagos residentes em tecidos. Durante a inflamação aguda, essas células produzem prostaglandinas e leucotrienos pró-inflamatórios, mas mudam rapidamente para lipoxinas, que bloqueiam o recrutamento de neutrófilos e, em vez disso, favorecem a infiltração aumentada de monócitos importantes para a cicatrização de feridas.

Em tratamentos de doenças humanas associadas à inflamações, são utilizados, principalmente, medicamentos anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs) e anti-citocinas biológicas, no entanto, apresentam alto risco de efeitos colaterais e são de custo elevado (PANG et al., 2020; KISHORE et al., 2019). Devido a isso, nas últimas duas décadas, formulações à base de plantas tem ganhado ampla aceitação pelo público e por especialistas médicos para melhorar a saúde e a qualidade de vida humana (KISHORE et al., 2019).

A modulação da dieta tem sido a principal ferramenta terapêutica para afetar inflamações e doenças metabólicas crônicas, contribuindo potencialmente para efeitos benéficos, apesar das interferências que podem ocorrer devido a diferentes estilos de vida, estrutura e função da comunidade microbiana intestinal (TANG et al., 2019; ZHOU et al., 2020). Alguns compostos bioativos são utilizados na modulação da microbiota intestinal, devido a capacidade de aumentar a diversidade da microbiota intestinal, regular microbiota intestinal e prevenir inflamações (CAO et al., 2019).

2.2 FICOCIANINA

A busca por compostos bioativos nas últimas décadas aumentou e levou a um crescente interesse no estudo de biocompostos devido à possibilidade de aplicação em várias áreas, como nutrição, saúde humana e animal, produção das indústrias química e farmacêutica, entre outras. Mais especificamente, estudos sobre ficobiliproteínas e ficobilinas mostraram o potencial desses compostos como antioxidante, anticâncer, antimicrobiano, anti-inflamatório, entre outros. Atualmente, as ficobiliproteínas são produtos naturais de alto valor agregado, provenientes de cianobactérias, que têm atraído atenção por seu potencial (MANIRAFASHA et al., 2016; PAGELS et al., 2019).

2.2.1 Estrutura da ficocianina

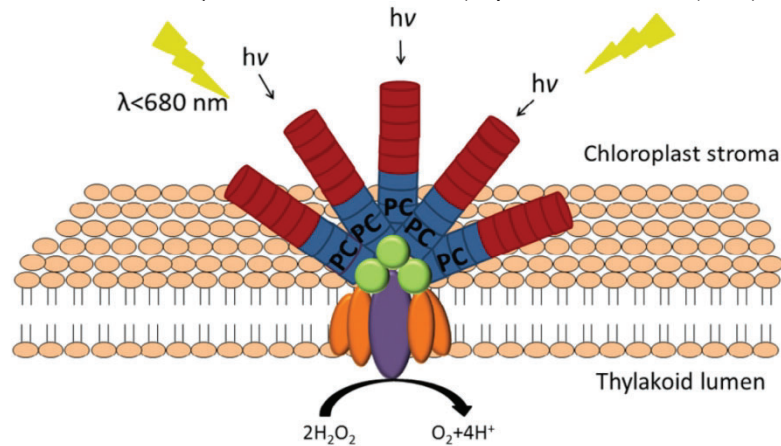
A ficocianina é um pigmento de natureza protéica, característico por sua coloração azul intensa, pertencente à família das ficobiliproteínas, que são complexos coletores de luz em cianobactérias, phyta, criptomonadas e cianella (PATEL et al., 2005). As ficobiliproteínas são um grupo de proteínas solúveis em água com um cromóforo associado, responsável pela coleta de luz nas cianobactérias, e estão localizadas no exterior da superfície das membranas tilacóides, compreendendo até 40-60% da proteína solúvel total nas células. As ficobiliproteínas dividem-se, baseadas na estrutura da proteína e absorção da qualidade da luz, em quatro classes principais: ficoceritrina, ficocianina, ficoceritrocianina e aloficocianina (PAGELS et al., 2019).

As cianobactérias têm sido estudadas por sua morfologia, mecanismo de fotossíntese, fixação de nitrogênio e também por certos aspectos de sua estrutura (YADAV et al., 2011). O aparato fotossintético de cianobactérias é formado por três sistemas de captação principais de luz: dois fotossistemas principais (comuns em outros organismos fotossintéticos) e um

ficobilisoma (PBS) (MASOJIDEK; KOBLIZEK; TORZILLO, 2013). O ficobilisoma é muito característico desses organismos e é composto principalmente de ficobiliproteínas (SIDLER, 1994; PAGELS et al., 2019).

As cianobactérias não possuem clorofila b, por isso absorvem luz principalmente nas regiões azul e vermelha do espectro visível, devido a presença da clorofila. Para compensar o espaço de absorção e otimizar essa coleta de energia luminosa, há ficobilisomas (PBS) na membrana do tilacóide, com absorção de 500-660 nm. A ficobilisoma é composta de proteínas coloridas chamadas ficobiliproteínas (PBP), como a ficocianina de cor azul, a ficeritrina de cor vermelha e aloficocianina de cor verde, que são dispostas em forma de antena (como mostra a Figura 1), a fim de que a energia absorvida seja canalizada para a reação do fotossistema II de maneira eficiente (FERNÁNDEZ-ROJAS et al., 2014; HSIEH-LO et al., 2019).

Figura 2. Estrutura do ficobilisoma (PBS), composta por ficobiliproteínas (PBP) em uma ordem específica que permite a transferência eficiente de energia unidirecionalmente para o centro de reação. A cascata de transferência de energia começa com ficeritrina (discos acoplados à PC) em ficocianina (PC) e aloficocianina (esferas) e finalmente no centro de reação nos fotossistemas II (elipse maior e central) e I (elipses laterais).



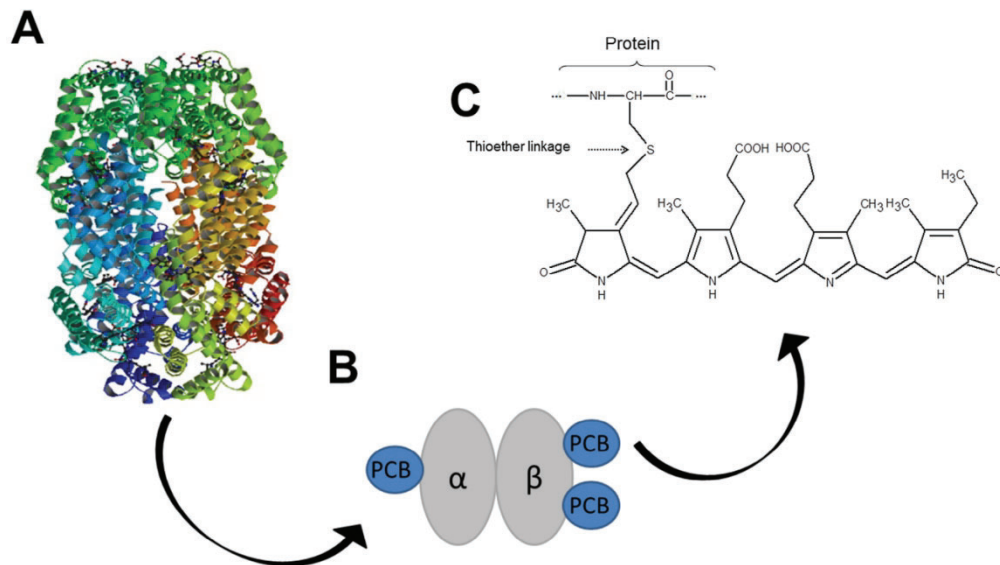
Fonte: Fernández-Rojas et al. (2014).

As ficobiliproteínas são compostas por várias subunidades, cada uma com um esqueleto proteico e uma ficobilina ligada por ligação covalente. Cada um dos quatro tipos de ficobilina possui características espectrais únicas que podem ser ainda modificadas por interações das subunidades e do cromóforo (MANIRAFASHA et al., 2016). A cor dessas moléculas é dada pelo cromóforo (grupo protético) da PBP, que é um grupo tetrapirrol linear que liga a apoproteína através de uma ligação tioéter aos resíduos de cisteína e seu espectro de absorção depende da proteína à qual está ligada. O grupo protético ligado à apoproteína pode ser uma ficocianobilina (ficocianina) ou ficeoeritrobilina (ficeritrina). Cada ficobiliproteína é

formada por dois polipeptídeos diferentes, denotados α e β , que são semelhantes em sequência e derivados de eventos de duplicação de genes antigos. Cada subunidade α ou β carrega pelo menos uma ficobilina. As ficobiliproteínas são geralmente apresentadas como trímeros ($\alpha\beta$)³ ou hexâmeros ($\alpha\beta$)⁶, ligados por proteínas específicas, como mostra a Figura 2 (GLAZER, 1994; SCHLUCHTER et al., 2010; HSIEH-LO et al., 2019; PAN-UTAI; IAMTHAM, 2019). O único cromóforo presente nesta biliproteína é a ficocianobilina (DUMAY; MORANÇAIS, 2016; GLAZER, 1994; PAGELS et al., 2019).

Figura 3. Estrutura de ficocianina (PC). (A) Estrutura cristalina do PC da cyanobacterium *S. platensis* na forma de hexâmero. (B) Representação esquemática da montagem do PC. É composto por duas subunidades proteicas, cadeias α e β , uma ficocianobilina (PCB) está ligada à subunidade α e dois PCBs estão ligados à subunidade β .

(C) Estrutura química do PCB, o cromogênio responsável pela cor azul do PC.



Fonte: Fernández-Rojas et al. (2014).

A ficocianina representa o principal grupo de ficobiliproteínas, seguida pela ficoceritrina e aloficocianina (WILDMAN; BOWEN, 1974; PAN-UTAI; IAMTHAM, 2019). Além disso, classifica-se em três grupos, conforme sua fonte de extração, C-PC (obtidas a partir de cianobactérias), R-PC (obtidas a partir de algas vermelhas) e R-PCII (obtida a partir de diferentes espécies de *Synechococcus*) (KUDDUS et al., 2013; WANG et al., 2012).

2.2.2 Propriedades da ficocianina

A ficocianina tem sido usada na indústria farmacêutica e alimentícia por sua cor e propriedades de valor agregado, além de estar associada à benefícios à saúde por suas

propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, hepatoprotetora e potencial anticâncer em células cancerígenas do pulmão, fígado, cólon e mama (FERNÁNDEZ-ROJAS et al., 2014; LIMA et al., 2018; HSIEH-LO et al., 2019). Segundo OU et al., (2012), a maior dose utilizada com efeitos adversos não observados (NOAEL) foi de 5g/kg, via oral.

A ficocianina possui ainda potencial quimioterapêutico. A quimioterapia age de maneira não específica, atingindo tecidos saudáveis, enfraquecendo o sistema imunológico e, assim, reduzindo a qualidade de vida do paciente. Então, a ficocianina pode ser acumulada no tecido do tumor, aumentando a especificidade do tratamento, além de atuar na proliferação de células não cancerígenas e na prevenção de metástase (SILVA et al., 2018; LI et al., 2010; WANG et al., 2007). Pode ser utilizada para retardar doença renal crônica, pois impede a progressão da doença e previne complicações cardiovasculares associadas. Durante a doença renal crônica ocorre uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando ao estresse oxidativo e a progressão da doença (SIGNORINI et al., 2017; MEMIJE-LAZARO et al., 2018).

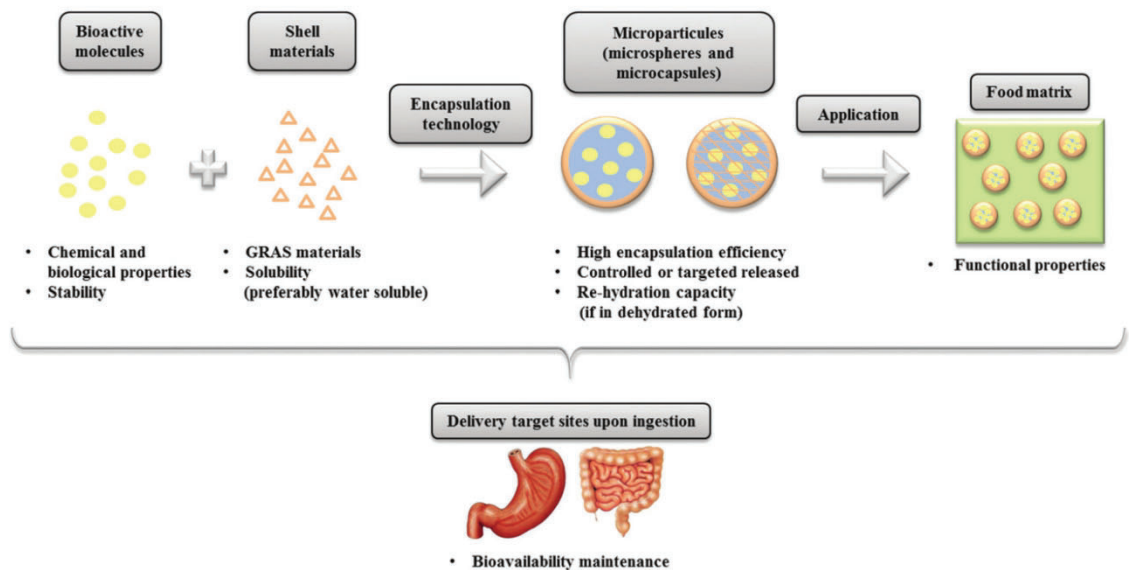
O potencial antioxidante da ficocianina também foi confirmado em uma análise de danos causados por reperfusão e isquemia, durante transplantes de fígado, onde os resultados obtidos sugerem que o tratamento com adição de ficocianina preserva a integridade das membranas celulares, obtendo maior efetividade na maior concentração de ficocianina quanto à atividade alcalina fosfatase. A ficocianina reduziu o estresse oxidativo, seguido de um aumento do nível de grupo tiol que resultou na eliminação de radicais livres (GDARA et al., 2018). Assim como outros compostos antioxidantes, a ficocianina impede a produção de espécies reativas de oxigênio e elimina as existentes, reduzindo a incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como câncer, diabetes mellitus, doenças inflamatórias e doenças neurodegenerativas. A ficocianobilina remove a maioria dos radicais livres, o oxigênio singlete é estabilizado pela oxidação de ligações duplas do tetrapirrol. A ficocianobilina também pode eliminar os radicais peroxinitrito, hipocloroso, hidroxil e peroxil (GDARA et al., 2018; MOHAMMADI-GOURAJI et al., 2019).

Dentre as diversas ações biológicas da ficocianina C, a atividade antiinflamatória é uma das mais descritas. Estudos *in vitro* associaram C-ficocianina com a inibição de COX-2 e mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral- α (REDDY et al., 2000). É importante ressaltar que a C-ficocianina atenuou a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina, destacando seu potencial analgésico durante condições inflamatórias (SHIH et al., 2009; LEMOS et al., 2020).

2.3 MICROENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A microencapsulação é uma metodologia amplamente utilizada para a preservação e estabilização de compostos funcionais sensíveis a condições ambientais adversas para aplicações alimentícias, farmacêuticas e cosméticas, na qual o composto é retido dentro de um material polimérico protetor (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015). A aplicação dessa tecnologia na indústria de alimentos permite estabilizar as propriedades funcionais dos compostos bioativos no processamento e armazenamento, aumentar biodisponibilidade e garantir a liberação do biocomposto no tempo desejado (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; JANISZEWSKA-TURAK, 2017; CORRÊA-FILHO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019). A Figura 3 mostra a cadeia lógica da escolha de bioativos, materiais e processo de microencapsulação às aplicações finais, evidenciando os pontos cruciais envolvidos em cada etapa (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015).

Figura 4. Esquema do processo de desenvolvimento de microencapsulação de compostos bioativos para aplicação em matrizes alimentares e preservação da bioatividade.

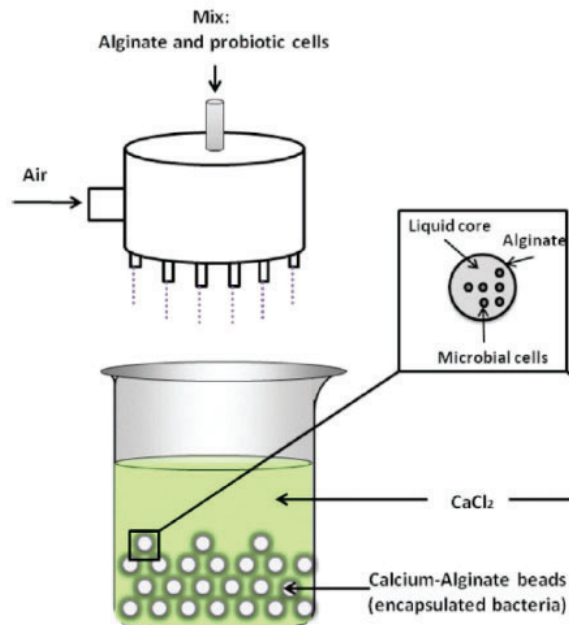


Fonte: Dias; Ferreira e Barreiro (2015).

No processo de microencapsulação, pequenas gotículas do ingrediente ativo, também chamado de material do núcleo, são revestidas por um material polimérico, chamado de agente encapsulante ou material de parede, produzindo pequenas partículas chamadas de microcápsulas ou microesferas, com diâmetros variando de 1 a 1000 micrômetros (VINCEKOVIĆ et al., 2017; PAULO; SANTOS, 2017; CORRÊA-FILHO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

São vários os métodos de microencapsulação já estudados, como secagem por pulverização, coacervação, liofilização, eletropulverização, gelificação iônica, extrusão, revestimento por leito fluidizado, entre outros (QV; ZENG; JIANG, 2011). A gelificação iônica é uma das metodologias mais usadas para encapsular extratos e compostos bioativos para aplicação em alimentos, podendo ser interna ou externa. A gelificação iônica externa ocorre principalmente na superfície da partícula, podendo também ser utilizada juntamente ao método de extrusão, que compreende a passagem do polímero fundido com o bioativo solubilizado através de um bico, levando à formação de partículas com alta densidade e eficiência de encapsulamento, como mostra a Figura 5 (KUANG; OLIVEIRA; CREAN, 2010; NEDOVIC et al., 2011; DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015).

Figura 5.- Representação esquemática do processo de microencapsulação por gelificação iônica.



Fonte: Burgain et al. (2011).

O material de parede escolhido deve apresentar propriedades reológicas adequadas e capacidade de manter o material do núcleo dentro da sua estrutura no processo e armazenamento e garantir o objetivo para o qual as microcápsulas são produzidas (KUANG; OLIVEIRA; CREAN, 2010; CHANG; VARANKOVICH; NICKERSON, 2016). Vários tipos de materiais de revestimento são utilizados na produção de microcápsulas, como polissacarídeos, lipídios, proteínas, e misturas entre si (CORRÊA-FILHO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019). O alginato, um dos polissacarídeos aniônicos lineares e derivado de algas marinhas marrons, é um polímero biodegradável muito utilizado como material de parede na microencapsulação. Além do alginato formar facilmente grânulos de gel em

soluções sem uso de solvente e à temperatura ambiente, é vantajoso por apresentar baixo custo, formação de matrizes ideais para capturar materiais sensíveis e não apresentar toxicidade, sendo aceito com segurança em alimentos (CHÁVARRI et al., 2010; HADIYANTO et al., 2017). O cloreto de cálcio se conecta facilmente ao alginato, devido a ligação dos íons Ca^{2+} ao componente ácido gulurônico do alginato, sendo utilizado como uma formação cruzada adequada com microesferas de alginato de polímero (HADIYANTO et al., 2017; DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015; YAN et al., 2014).

O sistema de microencapsulação, além de proporcionar a garantia das propriedades dos bioativos durante o processamento e armazenamento de alimentos e após a ingestão, ainda aumenta a absorção fitoquímica de compostos nas células epiteliais devido às nano e micropartículas (JOYE, DAVIDOV-PARDO; McCLEMENTS, 2014; LI et al., 2014).

3 ENCAPSULAÇÃO DE FICOCIANINA-ALGINATO: CARACTERIZAÇÃO E AÇÕES BIOLÓGICAS

3.1 INTRODUÇÃO

A ficocianina é um pigmento de natureza protéica, característico por sua coloração azul intensa, pertencente à família das ficobiliproteínas (PATEL et al., 2005). A ficocianina está associada à diversos benefícios à saúde devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, hepatoprotetora e potencial anticâncer em células cancerígenas do pulmão, fígado, cólon e mama (FERNÁNDEZ-ROJAS et al., 2014; LIMA et al., 2018; HSIEH-LO et al., 2019). Assim como outros compostos antioxidantes, a ficocianina impede a produção de espécies reativas de oxigênio e elimina as existentes, reduzindo a incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como câncer, diabetes mellitus, doenças inflamatórias e doenças neurodegenerativas (GDARA et al., 2018; MOHAMMADI-GOURAJI et al., 2019).

Apesar da ficocianina já ser utilizada na indústria alimentícia e nutracêutica, seu uso ainda é limitado devido sua instabilidade à luz e a outros fatores, como baixos valores de pH, fortes forças iônicas, altas temperaturas e presença de álcoois (CHAIKLAHAN et al., 2012; FALKEBORG et al., 2018). Para preservar as propriedades bioativas dos compostos funcionais, utiliza-se o método de microencapsulação, no qual o composto é retido dentro de um material polimérico protetor (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015).

O método de encapsulação de gelificação iônica é baseado em interações iônicas entre polímeros carregados de forma oposta (SARAVANAN; RAO, 2010). A qualidade da microencapsulação irá depender do aumento da capacidade de carga, da eficiência do encapsulamento e do rendimento obtido das microesferas (CHAN, 2011). O alginato de sódio é um polímero biodegradável comumente utilizado como material de revestimento, devido a sua facilidade em formar grânulos de gel na presença de íons multivalentes em uma solução sem o uso de solventes orgânicos e em temperatura ambiente (BENAVIDES et al., 2016).

Diante disso, este estudo objetiva avaliar a influência da concentração do material de revestimento e núcleo nas propriedades das microcápsulas, como estabilidade térmica, solubilidade em água, interações com o meio, e no controle de liberação do composto bioativo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material

A ficocianina foi gentilmente doada pela Parry Nutraceuticals, Índia. O alginato de sódio foi adquirido da empresa Dinâmica. Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica.

3.2.2 Microencapsulação por gelificação iônica

Para a microencapsulação através de gelificação iônica por extrusão, utilizou-se alginato de sódio como material encapsulante, reticulado com solução de CaCl_2 2,5%, segundo Hadyanto et al. (2017) e Yan et al. (2014).

Um planejamento experimental foi utilizado para avaliar a influência da relação alginato:ficocianina na eficiência de encapsulação, propriedades físico-química e atividade biológica das microcápsulas (Tabela 1). As soluções aquosas de alginato de sódio e ficocianina foram preparadas sob agitação por 24 h e submetidas à aspersão em atomizador. As microcápsulas atomizadas foram recolhidas em uma solução de cloreto de cálcio, sob agitação, por 30 min, para reticulação. Na sequência, as microcápsulas foram separadas da solução através de filtração e foram liofilizadas. As amostras foram codificadas pela primeira letra do material de parede e núcleo – Alginato de sódio (A) e Ficocianina (F) - seguida pela porcentagem da concentração.

3.2.3 Eficiência de microencapsulação

A eficiência de microencapsulação foi calculada, conforme Ge et al. (2009), medindo a massa de ficocianina não revestida e a massa de ficocianina adicionada no início do processo de microencapsulação. A concentração de ficocianina (PC) foi determinada por espectrofotometria nas absorvâncias 615 nm (A_{615}) e 652 nm (A_{652}), conforme a Equação 1.

$$PC \text{ (mg. mL}^{-1}\text{)} = \frac{A_{615} - 0,474 * A_{652}}{5,34} \quad (1)$$

A partir da determinação da massa de ficocianina, foi calculada a eficiência de microencapsulação, através da Equação 2.

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{m_{\text{inical}} - m_{\text{não revestida}}}{m_{\text{inical}}} * 100 \quad (2)$$

3.2.4 Solubilidade em água

A solubilidade das microcápsulas em água foi determinada seguindo o método descrito por Cano-Chauca et al. (2005). Para as análises, 1 g de amostra foi suspenso em 100 mL de água e promovida a agitação durante 5 min, em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 3000 g durante 10 min e uma porção de 25 mL do sobrenadante foi transferida para placa de Petri (previamente tarada) e submetida à secagem em estufa a 105 °C por 5 h. O percentual de solubilidade foi calculado por meio de diferença de massa.

3.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A ficocianina pura, agente encapsulante e as microcápsulas foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho sob refletância total atenuada (ATR-FTIR), com as seguintes condições operacionais: região de varredura 4000-400 cm^{-1} , número de acumulações 16 $\text{scans} \cdot \text{min}^{-1}$, resolução de 1 cm^{-1} e o registro dos espectros será em transmitância (%T).

3.2.6 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica da ficocianina, agentes encapsulantes e as microcápsulas foi avaliada utilizando um analisador termogravimétrico (TA-60 WS, Perkin Elmer, EUA). As amostras (± 5 mg) foram aquecidas na faixa de temperatura de 30-600 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min).

3.2.7 Perfil de liberação de ficocianina

Para analisar a liberação da ficocianina no sistema digestivo, fez-se uma simulação em solução ácida (pH 1,2) e em solução básica (pH 7,4), utilizando temperatura de 37°C e

agitação de 150 rpm, mimetizando os fluídos estomacal e intestinal, de acordo com Cruz (2004). Foi utilizado 1g de microcápsulas em 100 mL do fluído estomacal. Após, as microcápsulas foram filtradas e colocadas no fluído intestinal. O acompanhamento da liberação foi realizado a cada 60 min, sendo um período de 2 h em meio ácido e 2 h em meio básico. O perfil foi avaliado pela liberação do teor de ficocianina das microcápsulas para o meio fluído e expresso em porcentagem.

Os meios ácido e básico foram compostos por solução de HCl com ajuste do pH para 1,2 e tampão fosfato de sódio com pH de 7,4, respectivamente. O ajuste de pH foi realizado utilizando soluções de NaOH e HCl.

3.2.8 Perfil antioxidante

3.2.8.1 Capacidade antioxidante pelo radical ABTS

A análise da capacidade antioxidante pelo método do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiasolína-6-ácido sulfônico)) baseia-se na metodologia adaptada de Re et al. (1999). Foi preparada uma solução de radical ABTS e persulfato de potássio 1:1, que permaneceu em ambiente escuro, por 16 horas. Posteriormente, foram adicionados 980 µL desta solução com 20 µL de amostra. Após 6 minutos de reação no escuro, a leitura foi realizada em 734 nm com um espectrofotômetro UV-Vis. Os resultados foram interpretados utilizando uma curva padrão expressa µmol equivalente de Trolox/L de amostra.

3.2.8.2 Compostos fenólicos totais

O conteúdo total de polifenóis dos extratos foi determinado baseado no método descrito por Souza e Correia (2012), com modificações. Para realização dos testes, foi utilizada uma diluição apropriada para a concentração da solução, que foi oxidada utilizando 0,5mL de Folin-Ciocalteu. Logo após, a reação foi neutralizada utilizando 1mL de carbonato de sódio 7,5%. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis a 765 nm, após repouso de 60 minutos em ambiente com abrigo de luz. Para quantificação foi empregada uma curva padrão com solução de ácido gálico. O resultado da análise foi expresso como equivalentes de ácido gálico em miligramas por 1 mL de extrato (mg GAE/mL).

3.2.9 Perfil anti-inflamatório *in vitro*

3.2.9.1 Inibição da desnaturação de proteína

Neste ensaio, foi usada albumina sérica bovina (BSA) como proteína. A desnaturação foi induzida mantendo a reação mistura a 70 °C em banho por 10 min. A reação mistura consistiu em 1000 µL de ficocianina (100-500 µg/mL), 450 µL (5% w/v) BSA, 1400 µL de tampão salino de fosfato pH 7,4. Depois de resfriadas em água corrente, suas absorbâncias foram medidas em 660 nm (OSMAN et al., 2016; RESHMA et al., 2014). O percentual de inibição da desnaturação da proteína foi calculado pela Equação 4.

$$\% \text{Inibição} = \left(1 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}}\right) * 100 \quad (4)$$

Sendo:

A_{amostra} : absorbância da amostra;

A_{controle} : absorbância do controle negativo.

3.2.10 Análise estatística

Os resultados serão apresentados como valores médios e erro padrão da média de pelo menos três ensaios independentes. As análises estatísticas serão determinadas usando ANOVA e o teste de médias Tukey. O valor de (p) inferior a 0,05 será considerado como uma diferença significativa.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Eficiência de encapsulação e solubilidade em água

O aumento da concentração de ficocianina na solução de encapsulação não interferiu estatisticamente ($p > 0,05$) na eficiência de encapsulação (%) (Tabela 1). A microcápsula com maior teor de alginato e menor teor de ficocianina apresentou uma maior solubilidade em água, enquanto que a microcápsula com maior teor de ficocianina e menor teor de alginato

apresentou a menor solubilidade em água. Isso pode ter ocorrido devido à um excesso de íons de alginato de sódio na solução de cloreto de cálcio durante a reticulação da microcápsula.

Tabela 1. Eficiência de encapsulação e solubilidade em água das microcápsulas.

Amostra	Alginato de sódio (%)	Ficocianina (%)	Eficiência de encapsulação (%)	Solubilidade em água (%)
A1F075	1,0	0,75	85,68 ± 13,51 ^a	32,92 ± 0,15 ^{ab}
A15F075	1,5	0,75	87,42 ± 11,82 ^a	37,62 ± 4,47 ^b
A1F1	1,0	1,0	79,74 ± 0,02 ^a	20,94 ± 0,70 ^a
A15F1	1,5	1,0	76,25 ± 0,04 ^a	32,51 ± 4,87 ^{ab}

Fonte: Autora (2021). Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ao nível de 95% de confiança (média±dp).

O aumento do teor da ficocianina e a redução do teor de alginato de sódio podem reduzir a solubilidade em água, visto que a microcápsula A1F1 apresentou menor solubilidade em água. Para aplicação de microcápsulas na indústria alimentícia, a baixa solubilidade em água é de grande importância, já que a microencapsulação tem como objetivo a construção de uma barreira entre o composto bioativo e os componentes presentes no meio, evitando que haja interações que possam danificar o composto (MORTAZAVIAN et al., 2007). Sendo assim, uma amostra com menor concentração de material encapsulante e maior concentração de núcleo seria a proporção mais adequada para aplicações.

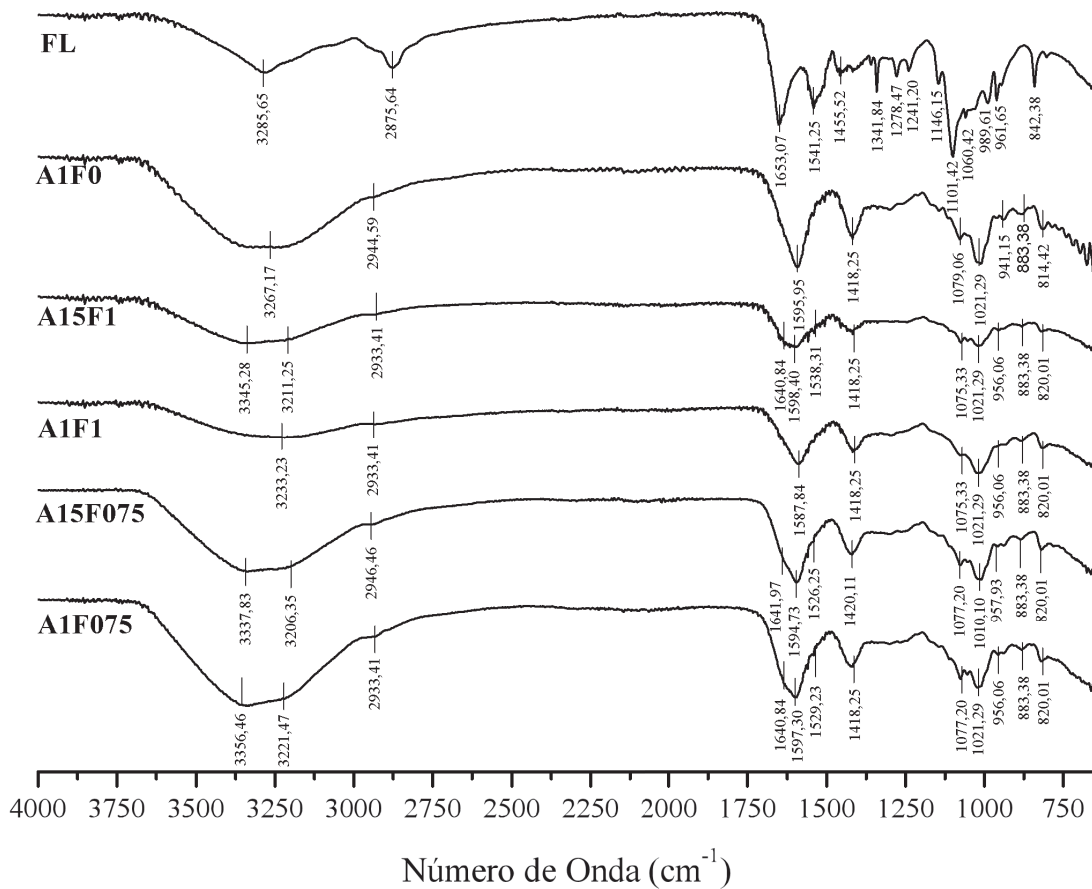
3.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho da ficocianina livre (FCL), microencapsulada (A1F075, A15F075, A1F1, A15F1) e da microcápsula de alginato de sódio (A1F0) estão apresentadas na Figura 4. A ficocianina apresenta diversas bandas de absorção características em 3285 cm⁻¹ (NH), 1653 cm⁻¹ (amida I), 1541 cm⁻¹ (amida II e alongamento da ligação C=O) e 1455 cm⁻¹ (CN). As bandas de absorção estreitas entre 1000-1100 cm⁻¹ estão relacionadas à presença de sulfato inorgânico derivado do processo de purificação da ficocianina (MUNAWAROH et al., 2020).

O alginato de sódio apresenta bandas de absorção na faixa de 3000–3600 cm⁻¹ (alongamento das ligações O-H), 2920–2850 cm⁻¹ (alongamento de C – H alifático). As bandas de vibração em 1596 e 1418 cm⁻¹ foram atribuídas ao alongamento assimétrico e

simétrico do íon de carboxilato, respectivamente. As bandas entre 1107 e 935 cm^{-1} são de grande importância para caracterizar a estrutura do alginato, pois estão atribuídas ao alongamento da ligação C-O do anel piranosil e ao alongamento C-O com contribuições da deformação C-C-H e C-O-H (DAEMI; BARIKANI, 2012).

Figura 6. Espectros de infravermelho da ficocianina livre, da microcápsula de alginato e das microcápsulas de alginato carregadas com ficocianina.

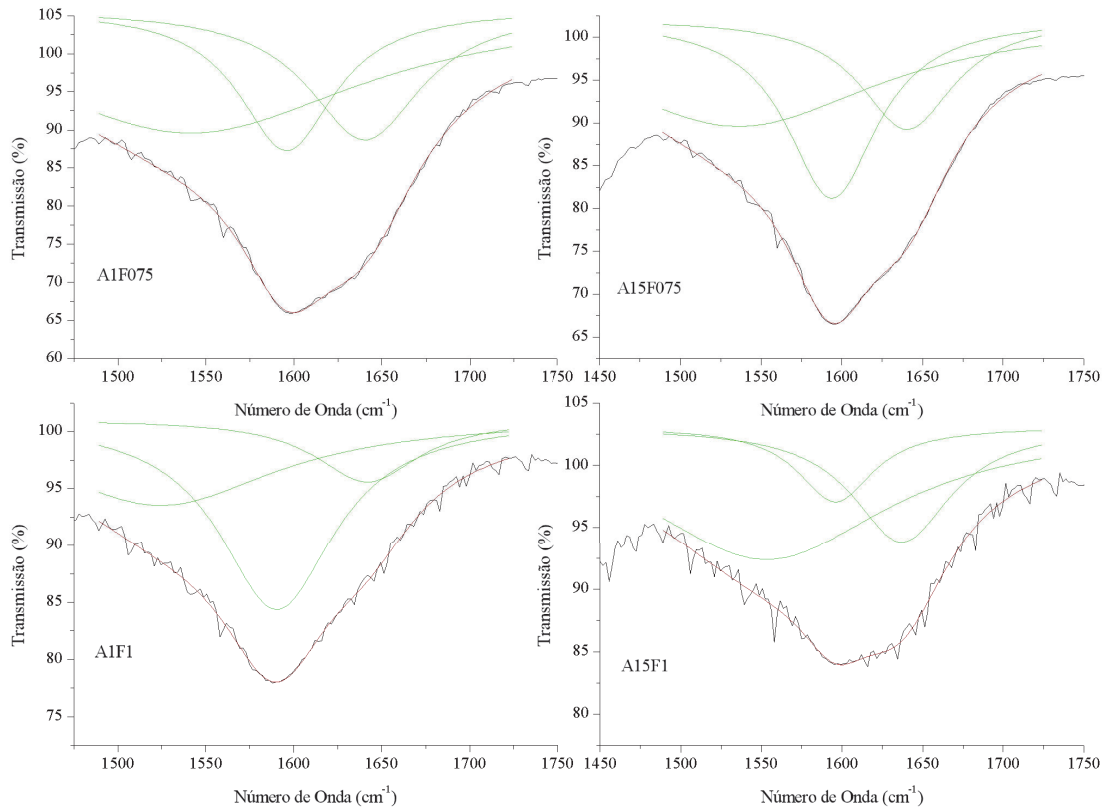


Fonte: Autora (2021). FL: Ficocianina livre. A1F0: microcápsulas de alginato de sódio. A15F1: microcápsulas formadas a partir de 1,5% de alginato de sódio e 1% de ficocianina A1F1: 1% de alginato de sódio e 1% de ficocianina. A15F075: 1,5% de alginato de sódio e 0,75% de ficocianina A1F075: 1% de alginato de sódio e 0,75% de ficocianina.

O espectro da microcápsula A1F1 é o mais próximo do espectro da microcápsula vazia de alginato, sugerindo o melhor recobrimento da ficocianina pelo material de parede (YAN et al., 2014). Nas demais microcápsulas de ficocianina observamos a deformação da banda de vibração assimétrica do íon carboxilato da microcápsula do alginato vazia, tal efeito ocorre devido a sobreposição das banda de absorção amida I e amida II + alongamento C=O. Através da deconvolução de bandas (Figura 7), identificamos que as mesmas estão deslocadas para

menores e maiores números de onda, respectivamente, sendo um indício de interações de natureza eletrostáticas entre o material de núcleo e a parede da microcápsula (LEE, 2000).

Figura 7. Deconvolução de bandas dos espectros de infravermelho das microcápsulas carregadas de ficocianina.

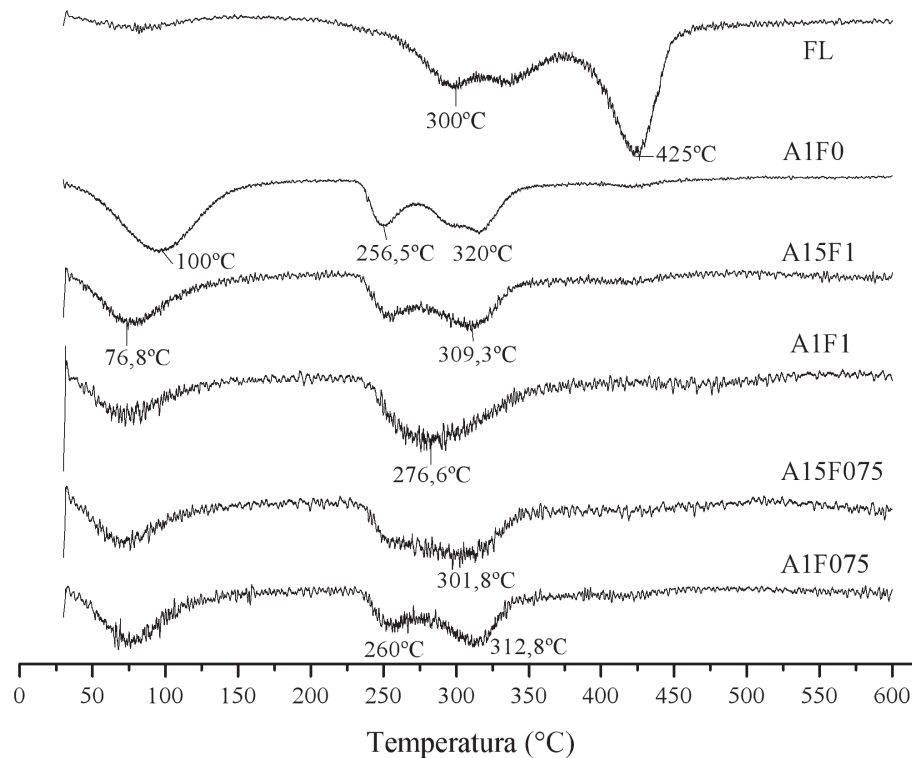


Fonte: Autora (2021).

3.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)

A microcápsula vazia de alginato de sódio (A1F0) apresentou quatro eventos térmicos, sendo eles a 100 °C, 265 °C e 320 °C (Figura 5). Segundo Parikh e Madamwar (2006), esses estágios estão relacionados a dessorção de água absorvida fisicamente, a remoção de água estrutural, a despolimerização e, por fim, a formação de estruturas polinucleares, aromáticas e grafíticas.

Figura 8. Curvas termogravimétricas da ficocianina livre, da microcápsula de alginato de sódio e das microcápsulas de alginato de sódio carregadas de ficocianina.



Fonte: Autora (2021). FL: Ficocianina livre. A1F0: microcápsulas de alginato de sódio. A15F1: microcápsulas formadas a partir de 1,5% de alginato de sódio e 1% de ficocianina. A1F1: 1% de alginato de sódio e 1% de ficocianina. A15F075: 1,5% de alginato de sódio e 0,75% de ficocianina. A1F075: 1% de alginato de sódio e 0,75% de ficocianina.

A curva termogravimétrica da ficocianina livre (FL) apresenta três estágios de decomposição, sendo que o primeiro estágio está relacionado a perda de água e de compostos de baixo peso molecular (JESUS et al., 2018). Entre 150 e 400 °C, ocorre o segundo estágio de decomposição da FL, que pode estar atribuído a desnaturação da proteína (BRAHATHEESWARAN, 2012). Um terceiro estágio de decomposição é observado a 425 °C, provavelmente relacionado à presença de impurezas na amostra, já que tal evento não é observado para as amostras encapsuladas, sendo um indício de que o processo de solubilização e encapsulação da ficocianina removeram a impureza.

As microcápsulas de ficocianina apresentaram o início da decomposição próximo ao observado na cápsula vazia de alginato, mantendo-se entre 260 °C e 280 °C. Entretanto, para as cápsulas A1F1 e A15F075 observamos um pico largo, ao contrário dos dois picos bem distintos observados para as demais microcápsulas. O alargamento do pico pode indicar uma maior exposição do material de núcleo ao ambiente, resultando na degradação mais significativa da ficocianina. Todavia, observamos que a microcápsula de alginato fornece uma

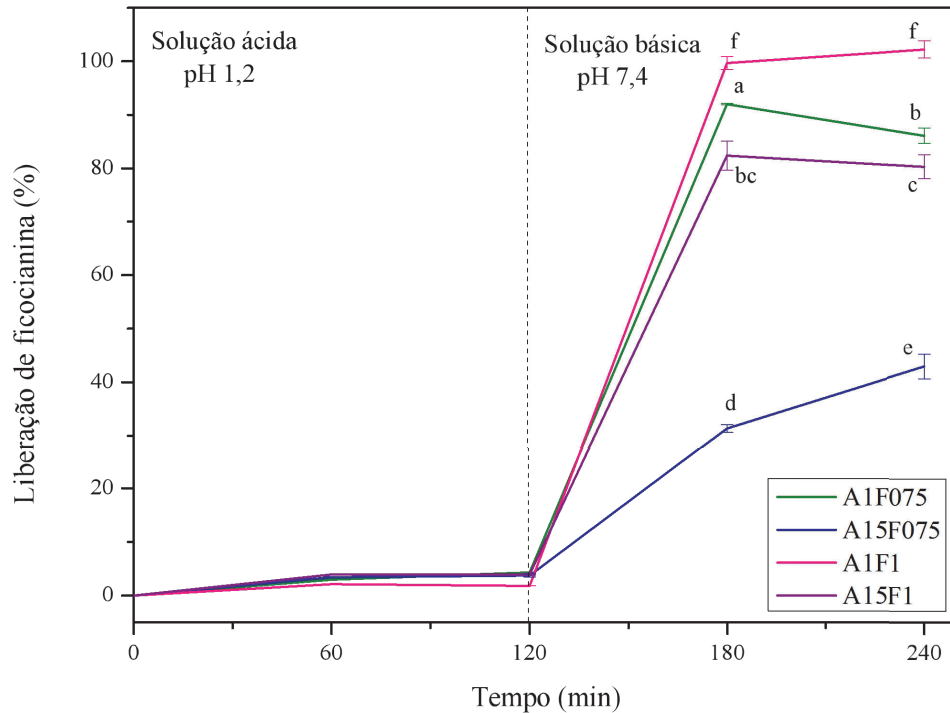
barreira térmica para a ficocianina para temperaturas até 260 °C protegendo-a da desnaturação e preservando a sua atividade.

3.3.4 Perfil de liberação de ficocianina microencapsulada

A Figura 6 apresenta o perfil de liberação da ficocianina encapsulada em meio ácido (pH 1,2) e meio básico (pH 7,4). Nos primeiros 120 min, em meio ácido, a liberação de ficocianina de todas as amostras não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), com máximo de liberação de 4,32%. A baixa liberação em meio ácido permite que o composto alcance o intestino e seja absorvido pelo organismo. Em pH ácido, o inchamento das esferas de alginato ocorre lentamente e por isso não há liberação do material ativo. Isso ocorre devido ao aumento da atração entre o grupo amina na ficocianina protonada e o grupo carboxila do alginato e à ligação de hidrogênio entre $-COOH$ e $-OH$ da cadeia do polímero (TAVAKOL et al., 2009; ZHANG et al, 2004).

Em pH básico, a amostra A1F1 apresentou 100% de liberação, seguida das amostras A1F075 (86,03%), A15F1 (80,26%) e A15F075 (42,88%). Ao entrarem em contato com o meio básico, as microcápsulas incham e abrem poros, resultando na liberação da ficocianina (GEORGE; ABRAHAM, 2006; PATEL et al., 2017). O inchaço e a porosidade são decorrentes da troca iônica entre o íon Ca^{+2} presente nas microcápsulas e os íons de Na^{+} presentes no tampão fosfato (BAJPAI; SHARMA, 2004). As amostras com menor teor de alginato (A1F075 e A1F1) apresentaram maior liberação, isso ocorre devido a dissolução da matriz do alginato.

Figura 9. Perfil de liberação de ficocianina microencapsulada com diferentes concentrações de material de parede/núcleo.



Fonte: Autora (2021). A1F0: microcápsulas de alginato de sódio. A15F1: microcápsulas formadas a partir de 1,5% de alginato de sódio e 1% de ficocianina A1F1: 1% de alginato de sódio e 1% de ficocianina. A15F075: 1,5% de alginato de sódio e 0,75% de ficocianina A1F075: 1% de alginato de sódio e 0,75% de ficocianina. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ao nível de 95% de confiança (média±dp).

Em estudo de Kim et al. (2008), cápsulas de alginato de cálcio apresentaram-se instáveis em fluidos biológicos, devido a presença de moléculas quelantes de cátions, como o fosfato, induzindo a liberação da ficocianina, no meio básico, em razão da troca de íons de cálcio por íons de sódio, presentes no tampão pH 7,4. A ficocianina apresenta baixa estabilidade, principalmente em mudanças de pH (MAULIASARI et al., 2019). Assim, a microencapsulação apresentou-se eficaz através da baixa degradação da ficocianina em pH ácido, o que sugere que o processo de microencapsulação utilizado pode ser capaz de proteger o composto bioativo durante sua passagem pelo estômago e garantir sua biodisponibilidade no intestino (WU et al., 2016).

3.3.5 Atividade antioxidante

Todas as concentrações de material encapsulante e núcleo utilizadas apresentaram retenção de compostos fenólicos e de atividade antioxidante (Tabela 2). A menor

concentração de ficocianina microencapsulada não diferiu estatisticamente, apresentando retenção de compostos independente da concentração de alginato de sódio. A ficocianina livre 1% apresentou maior teor de compostos fenólicos totais e maior atividade antioxidante devido a presença de uma maior concentração de ficocianina, visto que a atividade antioxidante é diretamente proporcional a concentração da solução. Assim, com a atividade antioxidante protegida, as microcápsulas podem minimizar o estresse oxidativo e danos associados, atrasando ou diminuindo o risco de desenvolver doenças induzidas por radicais livres (RENUGADEVI et al., 2018).

Tabela 2. Atividade antioxidante da ficocianina livre e microencapsulada

	Compostos fenólicos totais (mg EAG/mL)	ABTS ($\mu\text{mol Trolox/L}$)
FL 1%	0,086 \pm 0,0020 ^a	633,81 \pm 0 ^a
A1F075	0,012 \pm 0,0008 ^b	341,44 \pm 58,85 ^b
A15F075	0,012 \pm 0,0015 ^b	229,67 \pm 24,89 ^b
A1F1	0,007 \pm 0,0007 ^c	264,08 \pm 2,26 ^b
A15F1	0,016 \pm 0,0004 ^d	287,03 \pm 72,43 ^b

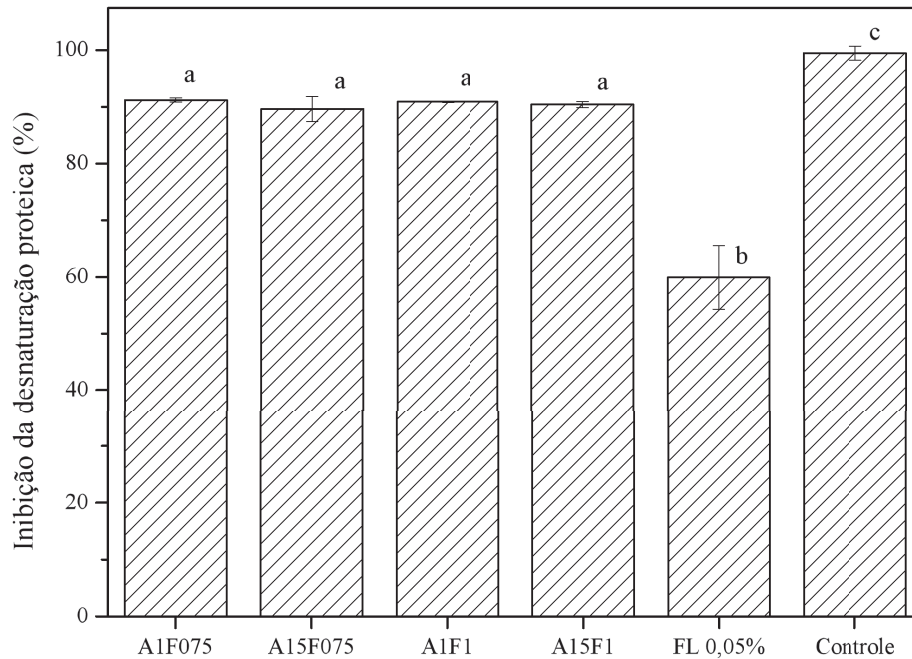
Fonte: Autora (2021). FL: ficocianina livre. A15F1: microcápsulas formadas a partir de 1,5% de alginato de sódio e 1% de ficocianina A1F1: 1% de alginato de sódio e 1% de ficocianina. A15F075: 1,5% de alginato de sódio e 0,75% de ficocianina A1F075: 1% de alginato de sódio e 0,75% de ficocianina. Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem significativamente ao nível de 95% de confiança (média \pm dp)..

3.3.6 Atividade anti-inflamatória

Inibição da desnaturação da albumina

As microcápsulas contendo ficocianina apresentaram uma média de inibição de desnaturação proteica de 90,54 \pm 0,68%, não diferindo entre elas ($p > 0,05$) (Figura 10). A ficocianina livre (0,05%) apresentou inibição de desnaturação estatisticamente inferior à ficocianina microencapsulada, isso se deve à presença do agente microencapsulante confere ao composto bioativo, independente da variação de material de parede e núcleo. Diante disso, pode-se afirmar que a ficocianina livre e microencapsulada apresentam potencial anti-inflamatório devido ao seu poder de inibição de desnaturação proteica, que é uma das principais causas da inflamação pois resulta em perda de propriedades biológicas das moléculas de proteínas (SANGEETHA; VIDHYA, 2016).

Figura 10. Inibição da desnaturação proteica da ficocianina livre (0,05%), microencapsulada e do diclofenaco de sódio (controle).



Fonte: Autora (2021). FL: ficocianina livre. A15F1: microcápsulas formadas a partir de 1,5% de alginato de sódio e 1% de ficocianina A1F1: 1% de alginato de sódio e 1% de ficocianina. A15F075: 1,5% de alginato de sódio e 0,75% de ficocianina A1F075: 1% de alginato de sódio e 0,75% de ficocianina. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ao nível de 95% de confiança (média±dp).

Segundo Wu et al. (2016), a microencapsulação da ficocianina aumenta a estabilidade do composto, já que a estabilidade da ficocianina pode ser afetada pelo pH, temperatura e luz. Além disso, o material encapsulante pode agir também como agente estabilizador, protegendo a estrutura das cadeias proteicas, assim como outros agentes estabilizantes comumente usados, como ácido cítrico, ácido sórbico, cloreto de sódio, ácido ascórbico, entre outros (WU et al., 2016).

3.4 CONCLUSÃO

A variação de concentração do núcleo e do material encapsulante não influenciou significativamente a eficiência de microencapsulação, apresentando uma boa eficiência em todas as variações utilizadas no estudo. As propriedades funcionais estudadas também não apresentaram influência da variação de concentrações de material encapsulante e núcleo. Em geral, as microcápsulas apresentaram resistência em água, resistência térmica e ao pH estomacal, devido à barreira criada pela cápsula, possibilitando a liberação da ficocianina em

pH intestinal, conferindo sua biodisponibilidade e preservando suas propriedades funcionais, como ação antioxidante e ação anti-inflamatória.

4 AÇÃO ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DE FICOCIANINA LIVRE E MICROENCAPSULADA

4.1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças crônicas não transmissíveis, como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes mellitus e doenças neurodegenerativas, são as principais causas de mortes no mundo (WHO, 2019). Apesar de ser uma resposta biológica complexa dos tecidos do corpo a estímulos nocivos, como agentes patogênicos, células danificadas, radicais livres ou irritantes, a inflamação prolongada, conhecida como inflamação crônica, leva a uma mudança progressiva no tipo de células presentes no local da inflamação, como as células mononucleares, e, assim, contribui para o desenvolvimento de obesidade (VILLARROYA et al., 2018), aterosclerose (KASIKARA et al., 2018), artrite reumatoide (CHIMENTI et al., 2015), doença inflamatória intestinal, doença de Alzheimer (HENEKA et al., 2015), depressão (KOOPTMAN et al., 2017), doença de Parkinson (JOSHI; SINGH, 2018) e câncer (COUSSENS; WERB, 2002).

O uso de compostos bioativos naturais como compostos fenólicos em diferentes campos, incluindo áreas biomédicas, cosméticas e farmacêuticas, tem mostrado um crescimento considerável (MANDAL et al., 2009). Compostos bioativos, como a ficocianina, possuem potencial ação anti-inflamatória. A ficocianina é um pigmento de natureza proteica, característico por sua coloração azul intensa e por suas propriedades funcionais, como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras, proteção anticâncer, entre outros (PATEL et al., 2005; FERNÁNDEZ-ROJAS et al., 2014; BERTOLIN et al., 2017; LIMA et al., 2018; HSIEH-LO et al., 2019). No entanto, devido à instabilidade desses compostos à pH baixos, altas temperaturas, entre outros, seu uso é limitado (KUSUMAWATI; GUNAWAN, 2013).

Dessa forma, durante a ingestão, sua bioatividade é facilmente perdida devido ao pH estomacal extremamente baixo. Para preservar as propriedades bioativas dos compostos funcionais, utiliza-se o método de microencapsulação, no qual o composto é retido dentro de um material polimérico protetor (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015). A microencapsulação permite que os compostos bioativos sejam submetidos às situações adversas garantindo a estabilidade e a biodisponibilidade para absorção no intestino (JOYE, DAVIDOV-PARDO; McCLEMENTS, 2014; LI et al., 2015; WANG et al., 2014).

Diante disso, objetivamos estudar a ação antioxidante e anti-inflamatória da ficocianina livre e microencapsulada, visando sua biodisponibilidade, além da caracterização da microcápsula quanto à estabilidade térmica, estabilidade de armazenamento, interações entre material encapsulante e núcleo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material

A ficocianina (referência E18200815) utilizada neste estudo foi adquirida da empresa Zhejiang Binmei Biotechnology Co., China. O alginato de sódio foi adquirido da empresa Dinâmica. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2.2 Microencapsulação por gelificação iônica

Para a microencapsulação através de gelificação iônica, utilizou-se alginato de sódio como material encapsulante, reticulado com solução de CaCl_2 2,5%, segundo Hadyanto et al. (2017) e Yan et al. (2014). A partir de testes preliminares, a microcápsula foi composta de 1:1 (material encapsulante:ficocianina). As soluções aquosas de alginato de sódio e ficocianina foram preparadas sob agitação por 24h e submetidas à aspensão em atomizador. As microcápsulas atomizadas foram recolhidas em uma solução de cloreto de cálcio, sob agitação, por 30 minutos, para reticulação. Na sequência, as microcápsulas foram separadas da solução através de filtração e foram liofilizadas.

4.2.3 Eficiência de microencapsulação

A eficiência de microencapsulação foi calculada, conforme Ge et al. (2009), medindo a massa de ficocianina não revestida e a massa de ficocianina adicionada no início do processo de microencapsulação. A concentração de ficocianina (PC) foi determinada por espectrofotometria, utilizando a Equação 1.

$$\text{PC (mg. mL}^{-1}\text{)} = \frac{A_{615} - 0,474 * A_{652}}{5,34} \quad (1)$$

A partir da determinação da massa de ficocianina, foi calculada a eficiência de microencapsulação, através da Equação 2.

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{m_{\text{inical}} - m_{\text{não revestida}}}{m_{\text{inical}}} * 100 \quad (2)$$

4.2.4 Solubilidade em água

A solubilidade das microcápsulas em água foi determinada seguindo o método descrito por Cano-Chauca et al. (2005). Para as análises, 1 g de amostra foi suspenso em 100 mL de água e promovida a agitação durante 5 min, em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 3000 g durante 10 min e uma porção de 25 mL do sobrenadante foi transferida para placa de Petri (previamente tarada) e submetida à secagem em estufa a 105 °C por 5 h. O percentual de solubilidade foi calculado por meio de diferença de massa.

4.2.5 Distribuição do tamanho de partícula

O tamanho das partículas das amostras foi determinado pela técnica de espalhamento de luz (Laser Particle Size Analyzer, Bettersizer S2-WD, EUA), utilizando sistema de dispersão a seco.

4.2.6 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A ficocianina pura, agentes encapsulantes e as microcápsulas foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho sob refletância total atenuada (ATR-FTIR), com as seguintes condições operacionais: região de varredura 4000-400 cm⁻¹, número de acumulações 16 scans.min⁻¹, resolução de 1 cm⁻¹ e o registro dos espectros foi em transmitância (%T).

4.2.7 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica da ficocianina, agentes encapsulantes e as microcápsulas foi avaliada utilizando um analisador termogravimétrico (TA-60 WS, Perkin Elmer, EUA). As

amostras (± 5 mg) foram aquecidas na faixa de temperatura de 30-600 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min).

4.2.8 Perfil de liberação de ficocianina

Para analisar a liberação da ficocianina no sistema digestivo, fez-se uma simulação em solução ácida (pH 1,2) e em solução básica (pH 7,4), utilizando temperatura de 37°C e agitação de 150 rpm, mimetizando os fluidos estomacal e intestinal, de acordo com Cruz (2004). Foi utilizado 1g de microcápsulas em 100 mL do fluido estomacal. Após, as microcápsulas foram filtradas e colocadas no fluido intestinal. O acompanhamento da liberação foi realizado a cada 60 min, sendo um período de 2 h em meio ácido e 2 h em meio básico. O perfil foi avaliado pela liberação do teor de ficocianina das microcápsulas para o meio fluido e expresso em porcentagem.

Os meios ácido e básico foram compostos por solução de HCl com ajuste do pH para 1,2 e tampão fosfato de sódio com pH de 7,4, respectivamente. O ajuste de pH foi realizado utilizando soluções de NaOH e HCl.

4.2.9 Estabilidade de armazenamento das microcápsulas

As microcápsulas foram armazenadas no escuro, em temperatura ambiente, por 6 semanas. A estabilidade foi analisada através do teor de ficocianina (descrito no item 4.2.3), análise de capacidade antioxidante pelo radical ABTS (descrita no item 4.2.10.1) e compostos fenólicos totais (descrita no item 4.2.10.2) após o rompimento da microcápsula em pH básico (7,4), durante 2 h..

4.2.10 Perfil antioxidante

4.2.10.1 Capacidade antioxidante pelo radical ABTS

A análise da capacidade antioxidante pelo método do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiasolína-6-ácido sulfônico)) baseia-se na metodologia adaptada de Re et al. (1999). Foi preparada uma solução de radical ABTS e persulfato de potássio 1:1, que permaneceu em ambiente escuro, por 16 horas. Posteriormente, foram adicionados 980 μ L desta solução com 20 μ L de amostra. Após 6 minutos de reação no escuro, a leitura foi

realizada em 734 nm com um espectrofotômetro UV-Vis. Para obtenção do resultado foi utilizada uma curva padrão de Trolox.

4.2.10.2 *Compostos fenólicos totais*

O conteúdo total de polifenóis dos extratos foi determinado baseado no método descrito por Souza e Correia (2012), com modificações. Para realização dos testes, foi utilizada uma diluição apropriada para a concentração da solução, que foi oxidada utilizando 0,5mL de Folin-Ciocalteu. Logo após, a reação foi neutralizada utilizando 1mL de carbonato de sódio 7,5%. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis a 765 nm, após repouso de 60 minutos em ambiente com abrigo de luz. Para quantificação foi empregada uma curva padrão com solução de ácido gálico. O resultado da análise foi expresso como equivalentes de ácido gálico em miligramas por 1 mL de extrato (mg GAE/mL).

4.2.11 **Perfil anti-inflamatório *in vitro***

4.2.11.1 *Inibição da desnaturação de proteína*

Neste ensaio, foi usada albumina sérica bovina (BSA) como proteína. A desnaturação foi induzida mantendo a reação mistura a 70 °C em banho por 10 min. A reação mistura consistiu em 1000 µL de ficocianina (100-500 µg/mL), 450 µL (5% w/v aqueous solution) BSA, 1400 µL de tampão salino de fosfato pH 7,4. Depois de resfriadas em água corrente, suas absorbâncias foram medidas em 660 nm (OSMAN et al., 2016; RESHMA et al., 2014). O percentual de inibição da desnaturação da proteína foi calculado pela Equação 4.

$$\% \text{Inibição} = \left(1 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}}\right) * 100 \quad (4)$$

sendo:

A_{amostra} : absorbância da amostra;

A_{controle} : absorbância do controle negativo.

4.2.11.2 *Hemólise induzida por solução hipotônica*

Vários agentes podem ser usados como soluções hipotônicas, incluindo hipo salina (50 mM NaCl em 10mM de tampão salino fosfato de sódio - pH 7,4) e água destilada. A reação mistura conteve suspensão de hemácias, extrato de ficocianina e solução hipotônica. Diclofenaco de sódio foi usado como medicamento padrão. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos e centrifugada a 3000 rpm por 20 minutos. O teor de hemoglobina da solução sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 560 nm (LABU et al., 2015; RASHID et al., 2011). A porcentagem de inibição de lise da membrana dos glóbulos vermelhos foi calculada através da Equação 5.

$$\% \text{Inibição} = \left(\frac{100 - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) * 100 \quad (5)$$

4.2.11.3 *Hemólise induzida pelo calor*

A reação mistura (2 mL) consiste de 1 mL da solução de ficocianina em diferentes concentrações (de 100 a 600µg/mL) e 1 mL de suspensão de hemácias 10%. Esta reação mistura foi agitada gentilmente por inversão. Todos os tubos contendo reação mistura foram incubados em banho quente a 60°C, 20 minutos. No fim da incubação os tubos foram resfriados em água corrente. A reação mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 5 min e a absorbância do sobrenadante foi lida a 560 nm (PATEL; DESAI, 2019; RASHID et al., 2011). A porcentagem de inibição de hemólise foi calculada pela Equação 6.

$$\% \text{Inibição} = (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) * 100 \quad (6)$$

4.2.11.4 *Inibição da protease*

O meio reacional (2 mL) contém 0.06 mg de proteinase, 1 mL de tampão 20 mM Tris HCl (pH 7,4) e 1 mL da solução de ficocianina. A mistura foi incubada à 37°C por 5 min e então 1 mL de BSA 4% foi adicionado. A mistura foi incubada por 20 min adicionais. Após, 2 mL de uma solução 70% ácido perclórico foi adicionada para interromper a reação.

A suspensão turva foi centrifugada à 3000 rpm por 10 min e a absorbância do sobrenadante foi lida a 210 nm (JYOTHILAKSHMI et al., 2017; PATEL; DESAI, 2016). A porcentagem de inibição da atividade inibitória da proteinase foi calculada usando a seguinte Equação 7.

$$\% \text{Inibição} = (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) * \left(\frac{100}{A_{\text{controle}}} \right) \quad (7)$$

4.2.12 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como valores médios e erro padrão da média de pelo menos três ensaios independentes. As análises estatísticas foram determinadas usando ANOVA e o teste de médias Tukey. O valor de (p) inferior a 0,05 foi considerado como uma diferença significativa.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Eficiência de encapsulação, solubilidade em água, atividade antioxidante e tamanho das microcápsulas

A encapsulação apresentou eficiência de $76,19 \pm 1,23$. Segundo Hadiyanto et al. (2019), quanto maior a concentração do material encapsulante maior a eficiência de encapsulação. No entanto, pesquisas conduzidas por Hadiyanto et al. (2017) e Yan et al. (2014) apresentaram eficiência de 71,75% e 53,84%, respectivamente, em microencapsulação utilizando 2,5% de alginato como material encapsulante.

A solubilidade em água de $22,93 \pm 0,008$. Segundo Mortazavian et al. (2017), a solubilidade em água foi um fator de grande importância na aplicação de microcápsulas na indústria de alimentos, a fim de evitar interações com demais partículas ou ingredientes.

A microencapsulação apresentou retenção da atividade antioxidante (Tabela 3). A atividade antioxidante da ficocianina microencapsulada através de ABTS foi estatisticamente superior a ficocianina livre (0,5%). Quanto a ficocianina livre, a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos apresentaram relação direta com a concentração da solução.

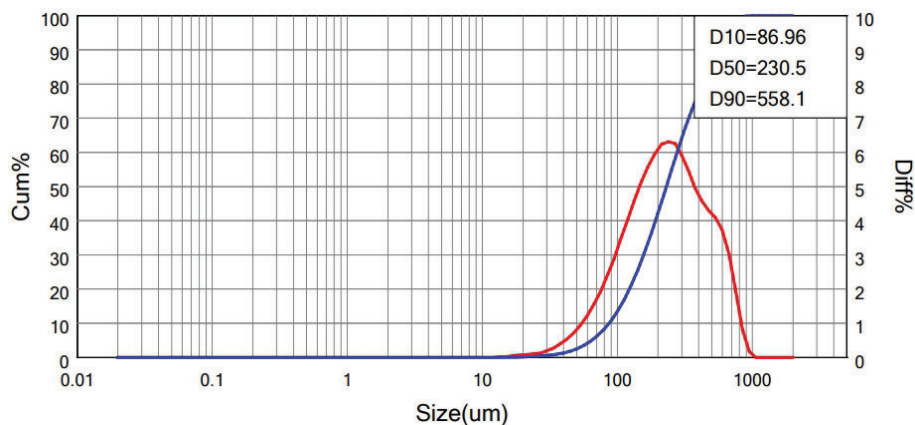
Tabela 3. Atividade antioxidante da ficocianina livre e microencapsulada

Ficocianina	ABTS ($\mu\text{mol trolox/L}$)	Compostos fenólicos totais (mg EAG/mL)
livre 0,5%	112,036 \pm 13,58	0,100 \pm 0,007
livre 1%	715,444 \pm 11,31	0,348 \pm 0,006
microencapsulada	412,940 \pm 9,05	0,011 \pm 0,001

Fonte: Autora (2021).

As microcápsulas apresentaram 64,22 % de partículas com tamanho inferior a 300 μm , sendo $D_{10}=86,96 \mu\text{m}$, $D_{50}=230,5 \mu\text{m}$ e $D_{90}=558,1 \mu\text{m}$ (Figura 11). O diâmetro encontrado foi maior que o reportado por Kurniasih et al. (2018) que, utilizando maltodextrina e maltodextrina + alginato como material encapsulante, obtiveram 82,8% de partículas com diâmetro menor que 1,853 μm e 52,5% menor que 3,104 μm , respectivamente.

Os diferentes tamanhos das microcápsulas de ficocianina são influenciados pelo método de encapsulação, tipo de encapsulante e proporção entre o encapsulante e o composto ativo (MIRHOJATI et al., 2017). O maior diâmetro da microcápsula indica uma parede mais espessa e maior quantidade de material de núcleo (BRIONES; SATO, 2010). Segundo Sharipei (2017), o aumento do tamanho das partículas da microcápsula está relacionado ao número de compostos ativos que podem ser encapsulados. Entretanto o maior diâmetro resulta em uma menor superfície específica, afetando a solubilidade das microcápsulas e a liberação de compostos ativos (EL-HELW; NIXON, 2008).

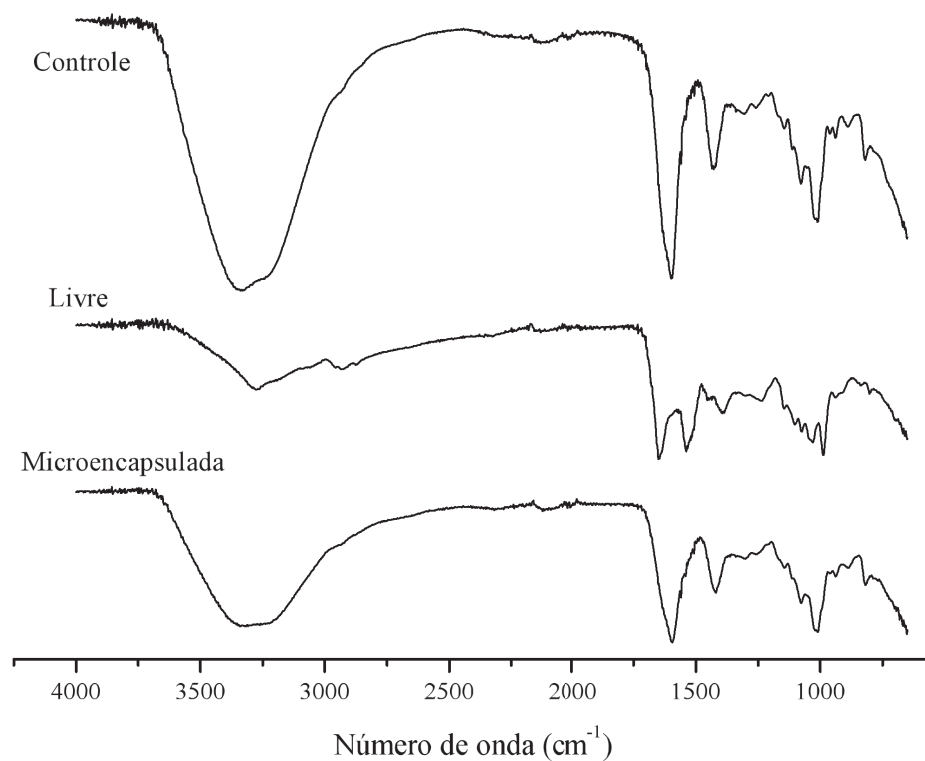
Figura 11. Dispersão de tamanho de partícula da microcápsula.

Fonte: Autora (2021).

4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

No espectro da ficocianina livre são observadas as bandas de absorção em 3285 cm^{-1} (NH), 1653 cm^{-1} (amida I), 1541 cm^{-1} (amida II e alongamento da ligação C=O) e 1455 cm^{-1} (CN) que são características da ficocianina (Figura 11). De acordo com Munawaroh et al. (2020), as bandas de absorção estreitas entre $1000\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ indicam a presença de sulfato inorgânico, que deriva do processo de purificação da ficocianina.

Figura 12. Espectros de infravermelho das microcápsulas de alginato de sódio (Controle), das microcápsulas de alginato carregadas com ficocianina e da ficocianina livre.



Fonte: Autora (2021).

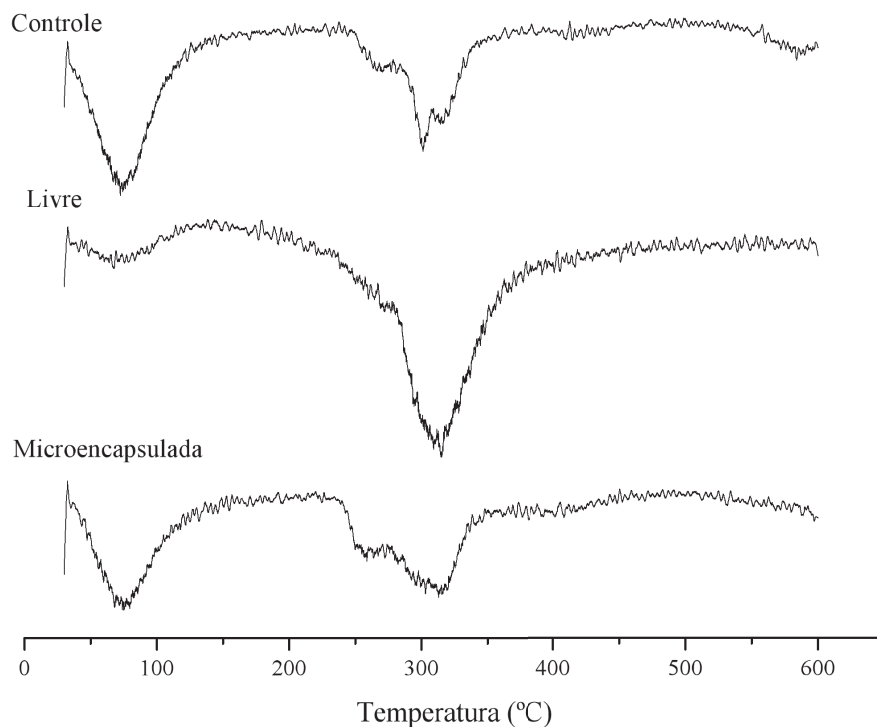
A estrutura do alginato de sódio é caracterizada pelas bandas entre 1107 e 935 cm^{-1} , que estão atribuídas ao alongamento da ligação C-O do anel piranosil e ao alongamento C-O com contribuições da deformação C-C-H e C-O-H. O alginato apresenta bandas de absorção na faixa de $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ (alongamento das ligações O-H), $2920\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ (alongamento de C – H alifático). As bandas de vibração em 1596 e 1418 cm^{-1} estão atribuídas ao alongamento assimétrico e simétrico do íon de carboxilato, respectivamente (DAEMI; BARIKANI, 2012).

O espectro da microcápsula de alginato carregada de ficocianina apresenta-se muito semelhante ao espectro da microcápsula de alginato, o que sugere um total recobrimento da ficocianina pelo material de parede (YAN et al., 2014).

4.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)

O primeiro estágio de decomposição da ficocianina (Figura 13) está relacionado a perda de água e de compostos de baixo peso molecular presentes na amostra (JESUS et al., 2018). O segundo estágio de decomposição, entre 150 e 400°C, pode estar atribuído à desnaturação da proteína, da qual resulta a ruptura de ligações intermoleculares de baixa energia e, subsequentemente, perda da conformação, queda na estabilidade térmica e transformação da proteína em compostos voláteis, como observou Brahatheeswaran (2012).

Figura 13. Curvas termogravimétricas da microcápsula de alginato vazia (controle), ficocianina livre e microencapsulada.



Fonte: Autora (2021).

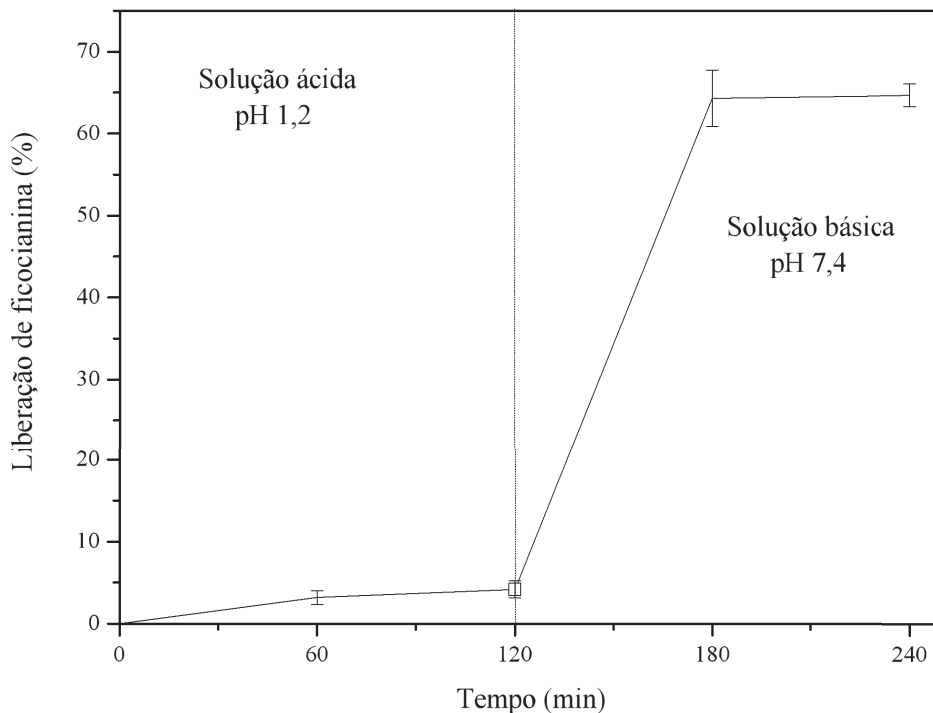
A decomposição térmica do alginato, assim como de outros polissacarídeos, seguem processos que incluem a desorção de água absorvida fisicamente, a remoção de água estrutural, a despolimerização e, por fim, a formação de estruturas polinucleares, aromáticas e grafíticas (PARIKH; MADAMWAR, 2006). A desnaturação desses compostos ocorre em

temperaturas mais baixas do que o ponto de degradação máximo da ficocianina (315 °C). Considerando que as cápsulas de alginato carregadas de ficocianina apresentaram início de degradação a 263 °C, não é possível afirmar que o material de parede tenha mantido uma barreira térmica para a ficocianina (SCHMATZ et al., 2020).

4.3.4 Perfil de liberação de ficocianina microencapsulada

Nos primeiros 120 min, a liberação máxima foi de 4,32%, permitindo que a ficocianina microencapsulada mantenha suas propriedades (Figura 14). Na solução básica, a liberação da ficocianina foi crescente durante todo o período analisado, atingindo uma liberação de 67,12%, aos 240 min. Resultados similares foram encontrados por Yan et al. (2014), onde a microcápsula de ficocianina, utilizando alginato de sódio, apresentou liberação lenta de cerca de 10% em meio ácido e, ao transferir as microcápsulas para o meio alcalino, atingiu uma liberação de 74,14%

Figura 14. Perfil de liberação da ficocianina microencapsulada.



Fonte: Autora (2021).

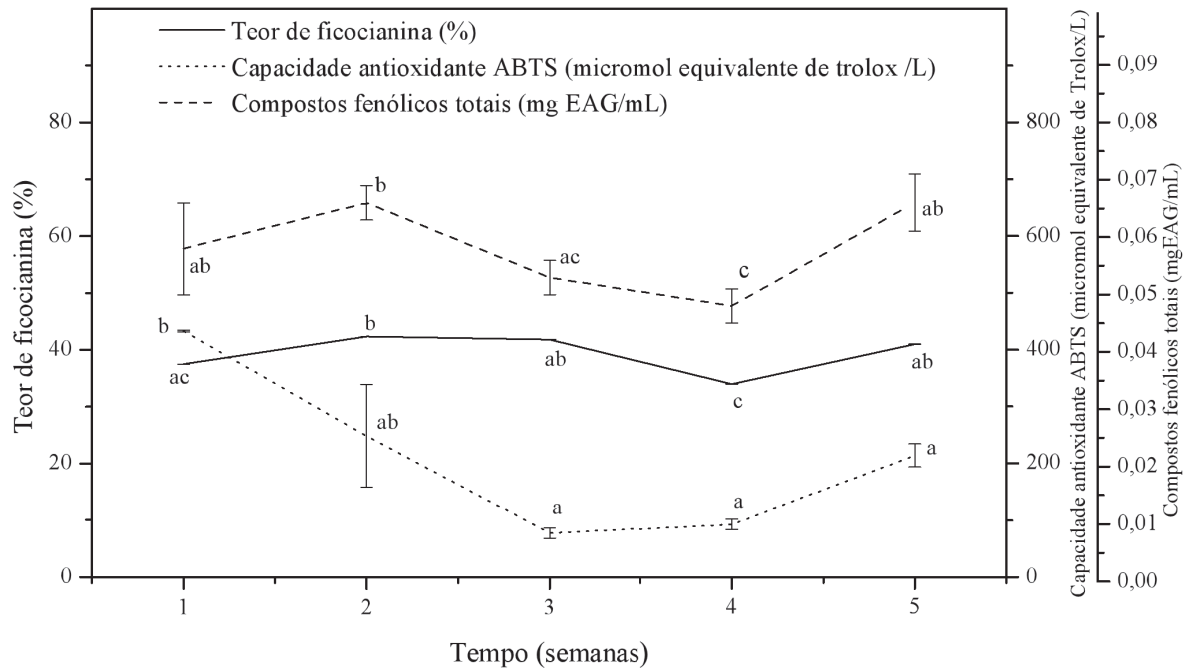
Em pH ácido, o inchamento das esferas de alginato ocorre lentamente e por isso não há liberação do material ativo. Isso ocorre devido ao aumento da atração entre o grupo amina

na ficocianina protonada e o grupo carboxila do alginato e à ligação de hidrogênio entre -COOH e -OH da cadeia do polímero (TAVAKOL et al., 2009; ZHANG et al., 2004). No entanto, no pH alcalino, as cápsulas tornam-se inchadas e porosas, devido a dissolução da matriz do alginato, resultando na liberação da ficocianina (GEORGE; ABRAHAM, 2006; PATEL et al., 2017). As cápsulas de alginato de sódio incham mais rapidamente em pH alcalino devido a troca iônica entre o íon Ca^{2+} na cápsula e os íons de Na^{+} presentes no tampão fosfato (BAJPAI; SHARMA, 2004). Em estudo de Kim et al. (2008), cápsulas de alginato de cálcio apresentaram-se instáveis em fluidos biológicos, devido a presença de moléculas quelantes de cátions, como o fosfato, induzindo a liberação da ficocianina em razão da troca de íons de cálcio por íons de sódio, presentes no tampão (KIM et al., 2008).

A ficocianina apresenta baixa estabilidade, principalmente em mudanças de pH (MAULIASARI et al., 2019). Assim, a microencapsulação apresentou-se eficaz através da baixa degradação da ficocianina em pH ácido, o que sugere que o processo de microencapsulação utilizado pode ser capaz de proteger o composto bioativo durante sua passagem pelo estômago e garantir sua biodisponibilidade no intestino (WU et al., 2016).

4.3.5 Estabilidade das microcápsulas durante armazenamento

As microcápsulas apresentaram estabilidade quanto ao teor de ficocianina e quanto aos compostos fenólicos (Figura 15). Houve uma redução significativa da capacidade antioxidante através de ABTS, a partir da terceira semana, com redução de aproximadamente 49%. Segundo Zapata et al., (2021), isso significa que a perda de atividade antioxidante ocorre antes da degradação dos compostos fenólicos totais, quando armazenado em temperatura ambiente.

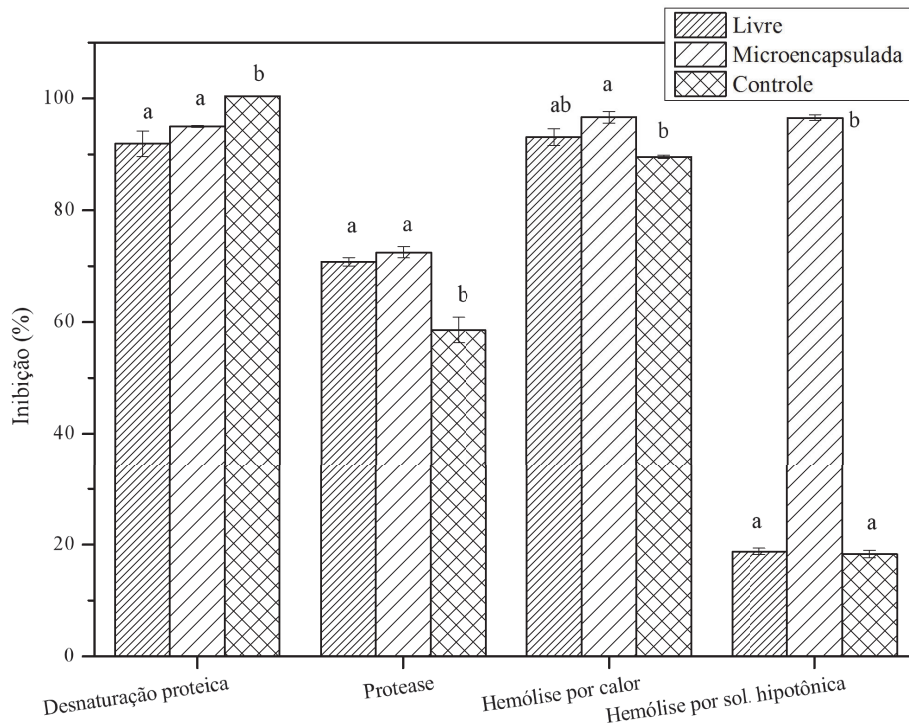
Figura 15. Estabilidade das microcápsulas de alginato de sódio carregadas com ficocianina

Fonte: Autora (2021). As letras iguais acima das barras identificam que as amostras não apresentaram diferença significativa. A análise estática foi realizada entre os pontos de uma curva, não foi realizada entre as curvas.

Essas observações indicam que a estrutura do alginato de sódio foi capaz de preservar o teor de ficocianina e evitar danos aos compostos fenólicos durante o armazenamento por cinco semanas, assim como observou também Wang et al. (2014). Segundo Wu et al. (2016), o método de microencapsulação da ficocianina aumenta a estabilidade do composto, já que a estabilidade da ficocianina pode ser afetada pelo pH, temperatura e luz. Além disso, o material encapsulante pode agir também como agente estabilizador, protegendo a estrutura das cadeias proteicas, assim como outros agentes estabilizantes comumente usados, como ácido cítrico, ácido sórbico, cloreto de sódio, ácido ascórbico, entre outros (WU et al., 2016).

4.3.6 Atividade anti-inflamatória

A ficocianina livre apresentou uma inibição de desnaturação protéica de 95,96%, sem diferença significativa da ficocianina micrencapsulada, que inibiu 98,35% de desnaturação. Diante disso, observa-se que o processo de microencapsulação protegeu o composto bioativo, mantendo-o disponível e ativo, com potencial anti-inflamatório, uma vez que a desnaturação da proteína resulta em perda de propriedades biológicas das moléculas de proteínas, sendo uma das principais causas da inflamação (RESHMA; ARUN; BRINDHA, 2014).

Figura 16. Ação anti-inflamatória da ficocianina livre e encapsulada.

Fonte: Autora (2021). Letras iguais não apresentaram diferença significativa, entre as amostras, para cada análise separadamente.

Quanto a inibição de protease, a ficocianina livre apresentou uma inibição de 70,8%, sem diferença significativa quanto a ficocianina microencapsulada, que inibiu 72,5% de protease. A ficocianina apresentou inibição significativamente superior à inibição de protease do medicamento (diclofenaco de sódio) utilizado como controle, demonstrando seu potencial em reduzir danos nos tecidos causados pela protease durante reações inflamatórias (GOVINDAPPA et al., 2011).

Durante a indução da hemólise por solução hipotônica, a ficocianina livre e a ficocianina microencapsulada inibiram em 93,09% e 96,64%, respectivamente, a lise da membrana lisossômica que ocorre durante a inflamação. A ficocianina microencapsulada apresentou uma inibição significativamente superior à amostra de ficocianina livre e à amostra controle, que pode ser devido à presença de sais oriundos do meio intestinal e do material encapsulante que impediram a ocorrência da lise (LABU et al., 2015; RASHID et al., 2011).

Na indução de hemólise por calor, a ficocianina microencapsulada inibiu 96,56% a ocorrência de lise da membrana lisossômica, que libera seus componentes enzimáticos, produzindo uma variedade de distúrbios (PATEL; DESAI, 2019; RASHID et al., 2011). A ficocianina livre e a amostra controle apresentaram baixo potencial de inibição, 18,78% e

18,30%, respectivamente. O alto potencial de inibição da ficocianina microencapsulada se deve à proteção que a microcápsula confere ao composto bioativo, possibilitando sua maior disponibilidade e ação em condições adversas, como na presença de calor. Dessa forma, a ficocianina possui ação anti-inflamatória ao produzir o efeito de inibir a liberação de enzimas lisossômicas ou estabilizar as membranas lisossômicas, que se assemelham às membranas humanas dos glóbulos vermelhos que sofrem hemólise durante inflamações.

Além disso, a ficocianina pode diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-2, interferon- γ e o fator de necrose tumoral- α , fatores de transcrição, nomeadamente Janus quinase 3, transdutores de sinal e ativadores da transcrição 3 (stat3) e também induz a expressão de citocinas antiinflamatórias IL -4 (PRABAKARAM et al., 2020). As respostas da citocina mostram-se envolvidas na iniciação, evolução e, em última instância, na resolução de algumas formas de doenças inflamatórias em humanos (KISHORE et al., 2019, ASHLEY et al., 2002). Em consonância com essa ideia, os inibidores da produção de citocinas têm sido considerados uma estratégia terapêutica superior para doenças inflamatórias, considerando que podem apresentar perfil modificador de doenças (BAI et al., 2021).

4.4 CONCLUSÃO

A microencapsulação apresentou eficácia na prevenção da degradação da ficocinina, mantendo sua atividade bioativa ao longo do tempo, além de possibilitar que a ficocianina resista ao sistema digestivo, apresentando liberação no intestino, como desejado, visando sua bioacessibilidade.

Com isso, a encapsulação permitiu que a ficocianina apresentasse uma ação anti-inflamatória semelhante a medicamentos já utilizados e apresentados como controle neste estudo.

5 CONCLUSÃO

A ficocianina livre e microencapsulada apresentou ação antioxidante e anti-inflamatória. As microcápsulas proporcionaram à ficocianina estabilidade térmica, estabilidade antioxidante durante o armazenamento e liberação no pH intestinal

A microencapsulação preserva a bioatividade da ficocianina em condições adversas, permitindo a liberação do composto bioativo no intestino e contribuindo para a bioacessibilidade da ficocianina.

REFERÊNCIAS

- ASHLEY, N.T.; WEIL, Z.M.; NELSON, R.J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 43, p. 385–406, 2012. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530
- BAI, R.; YAO, C.; ZHONG, Z.; GE, J.; BAI, Z.; YE, X.; XIE, Y. Discovery of natural anti-inflammatory alkaloids: Potential leads for the drug discovery for the treatment of inflammation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 213, 2021.
- BAJPAI, S. K.; SHARMA, S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions. **Reactive and Functional Polymers**, v. 59, p. 129–140, 2004.
- BENAVIDES, S.; CORTÉS, P.; PARADA, J.; FRANCO, W. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, v. 204, p. 77-83, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.02.104
- BERTOLIN, T.E.; MACEDO, D.; ORO, T.; BACKES, L.T.H.; BRÁS, I.C.; SANTOS, C.N.; TENREIRO, S.; OUTEIRO, T.F. Phycocyanin protects against Alpha-Synuclein toxicity in yeast. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 553–560, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.044>
- BRAHATHEESWARAN, D.; MATHEW, A.; ASWATHY, R. G.; NAGAOKA, Y.; VENUGOPAL, K.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; SAKTHIKUMAR, D. **Biomed. Mater.**, v. 7, 2012.
- BRIONES, A.V.; SATO, T. Encapsulation of glucose oxidase (GOD) in polyelectrolyte complexes of chitosan–carrageenan. **Reactive and Functional Polymers**, v.70, p. 19-27, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2009.09.009>
- BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467–483, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>
- CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n. 4, p. 420-428, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>
- CAO, S.; ZHAO, C.; XU, X.; TANG, G.; CORKE, H.; GAN, R.; LI, H. Dietary plants, gut microbiota, and obesity: Effects and mechanisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 92, p. 194-204, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.004>
- CHAIKLAHANA, R.; CHIRASUWAN, N.; BUNNAG, B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina sp.*: Influence of temperature, pH and preservatives. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 659-664, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.010>

- CHAMPAGNE, C.P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Curr Opin Biotechnol**, v. 18, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.001>
- CHAN, B. D.; WONG, W.; LEE, M. M.; CHO, W. C.; YEE, B. K.; KWAN, Y. W.; TAI, W. C. Exosomes in Inflammation and Inflammatory Disease. **Proteomics**, v. 19, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.201800149>
- CHAN, E.S. Preparação de contas ca-alginato contendo alto teor de óleo: Influência de variáveis de processo sobre eficiência de encapsulamento e propriedades. **Polímeros de Carboidratos**, v. 84, p. 1267-1275, 2011. DOI: [10.1016/j.carbpol.2011.01.015](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.015)
- CHANG, C.; VARANKOVICH, N.; NICKERSON, M.T. Microencapsulation of canola oil by lentil protein isolate-based wall materials. **Food Chemistry**, v. 212, p. 264-273, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.136>
- CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F.C.; MARZO, F.; VILLARÁN, M.C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1–2, p. 185-189, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022>
- CHIMENTI, M. S.; TRIGGIANESE, P.; CONIGLIARO, P.; CANDI, E.; MELINO, G.; PERRICONE, R. The interplay between inflammation and metabolism in rheumatoid arthritis. **Cell Death & Disease**, v. 6, p. 1887, 2015.
- CORRÊA-FILHO, L.C.; MOLDÃO-MARTINS, M.; ALVES, V.D. Advances in the Application of Microcapsules as Carriers of Functional Compounds for Food Products. **Appl. Sci.**, v. 9, n. 571, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/app9030571>
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860–867, 2002.
- CRUZ, M. C. P. **Influência do polietilenoglicol (PEG) no processo de microencapsulação da oxitetraciclina no sistema alginato/quitosana: modelamento “in vitro” da liberação oral.** 157 p. Tese (Doutorado Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, SP, 2004.
- DAEMI, H.; BARIKANI, M. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. **Scientia Iranica**, v. 19, p. 2023-2028, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scient.2012.10.005>
- DIAS, M.I.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARREIRO, M.F. Microencapsulation of bioactives for food applications. **Food Funct.**, v. 6, p. 1035–1052, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1039/c4fo01175a>
- DUMAY, J.; MORANÇAIS, M. **Proteins and pigments seaweed in health and disease prevention.** In: FLEURENCE, J.; LEVINE, I. (eds) *Seaweed in Health and Disease Prevention*. Editora Academic Press, p. 275-318, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02206-X>

- EL-HELW, A. M.; NIXON, J. R. Specific surface area measurement of ethyl cellulose-walled microcapsules containing theophylline. **Journal of Microencapsulation**, p. 111-119, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3109/02652048709021805>
- FALKEBORG, M.F.; RODA-SERRAT, M.C.; BURNAES, K.L.; NIELSEN, A.L.D. Stabilising phycocyanin by anionic micelles. **Food Chemistry**, v. 239, p. 771-780, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.007>
- FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HERNÁNDEZ-JUÁREZ, J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **Journal of Functional Foods**. V. 11, p. 375-392, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.011>
- GDARA, N. B., BELGACEM, A., KHEMIRI, I., MANNAI, S., BITRI, L. Protective effects of phycocyanin on ischemia/reperfusion liver injuries. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 196-202, 2018.
- GE, X.; WAN, Z.; SONG, N.; FAN, A.; WU, R. Efficient methods for the extraction and microencapsulation of red pigments from a hybrid rose. **J. Food Eng.**, v. 10, p. 122–128, 2009.
- GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 1-14, 2006.
- GHOSH, S., MAY, M.J.; KOPP, E.B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.** 16:225–60, 1998,
- GLAZER, A. Phycobiliproteins - A Family of Valuable, Widely Used Fluorophores. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 2, p.105-112, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02186064>
- GOVINDAPPA, M.; CHANNABASAVA, R.; SOWMYA, D.V.; MEENAKSHI, J.; SHREEVIDYA, M.R.; LAVANYA, A.; SANTOYO, G.; SADANANDA, T.S. Phytochemical Screening, Antimicrobial and in vitro Antiinflammatory Activity of Endophytic Extracts from *Loranthus sp.* **Pharmacognosy Journal**, v. 3, p.82-90, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5530/pj.2011.25.15>
- HADIYANTO; SUZERY, M.; SETYAWAN, D.; MAJID, D.; SUTANTO, H. Encapsulation of Phycocyanin-Alginate for High Stability and Antioxidant Activity. **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**, v. 55, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/55/1/012030>
- HENEKA, M. T.; GOLENBOCK, D. T.; LATZ, E. Innate immunity in Alzheimer's disease. **Nature Immunology**, v. 16, p. 229–236, 2015.
- HSIEH-LO, M., CASTILLO G., OCHOA-BECERRA, M. A., MOJICA, L. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. **Algal Research**, v. 42, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101600>
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **J. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. New York: Garland Sci. 2005.

JANISZEWSKA-TURAK, E. Carotenoids microencapsulation by spray drying method and supercritical micronization. **Food Res Int.**, v. 99, p. 891-901, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.001>

JESUS, C.S.; UEBEL, L.S.; COSTA, S.S.; MIRANDA, A.L.; MORAIS, E.G.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.; NUNES, I.L.; FERREIRA, E.S.; DRUZIAN, J.I. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB 18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 86-94, 2018.

JOSHI, N.; SINGH, S. Updates on immunity and inflammation in Parkinson disease pathology. **Journal of Neuroscience Research**, v. 96, p. 379-390, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/jnr.24185>

JOYE, I.J.; DAVIDOV-PARDO, G.; McCLEMENTS, D.J. Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, n. 2, p. 168-182, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.006>

JYOTHILAKSHMI, M.; JYOTHIS, M.; NARAYANAN, G.N.; LATHA, M.S. Antidermatophytic and protease-inhibiting activities of zerumbone: A natural sesquiterpene from the rhizome of *Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex J.E. Smith. **Pharmacognosy magazine**, v. 13, n. 49, p. 2-5, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4103/0973-1296.197649>

KASIKARA, C.; DORAN, A. C.; CAI, B.; TABAS, I. The role of non-resolving inflammation in atherosclerosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 128, p. 2713-2723, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI97950>.

KIM, W. T.; CHUNG, H.; SHIN, I. S.; YAM, K. L.; CHUNG, D. Characterization of calcium alginate and chitosan-treated calcium alginate gel beads entrapping allyl isothiocyanate. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 4, p. 566-573, 2008.

KISHORE, N.; KUMAR, P.; SHANKER, K.; VERMA, A. K. Human disorders associated with inflammation and the evolving role of natural products to overcome. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 179, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.034>

KOOPMAN, M.; AIDY, S.; CONSORTIUM, M. Depressed gut? The microbiota-diet-inflammation triad in depression. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 30, p. 369-377, 2017. DOI: [10.1097/YCO.0000000000000350](https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000350)

KUANG, S.S.; OLIVEIRA, J.C.; CREAN, A.M. Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v.50, n. 10, p. 951-68, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408390903044222>.

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoyanin. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/742859>. 2013.

KURNIASSIH, R.A.; PURNAMAYATIL, L.; AMALIA, U.; DEWI, E.N. Formulation and Characterization of Phycocyanin Microcapsules within Maltodextrin Alginate. **AgriTech**, v. 38, p. 23-29, 2018. DOI: <http://doi.org/10.22146/agritech.16752>

LABU, Z.K.; LABONI, F.R.; TARAFDAR, M.; HOWLADER, M.S.I.; RASHID, M.H. Membrane stabilization as a mechanism of anti-inflammatory and thrombolytic activities of ethanolic extract of arial parts of *Spondias pinanata* (Family: Anacardiaceae). **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 44-51, 2015.

LEE, S. H. Preparation and Evaluation of Crosslinked Polyelectrolyte Complex Membranes. **Polymer Journal**, v. 32, p. 726-721, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1295/polymj.32.716>

LEMOS, P. V. F.; OPRETZKA, L.C.F.; ALMEIDA, L.S.; CARDOSO, L.G.; SILVA, J.B.A.; SOUZA, C.O.; VILLAREAL, C.F.; DRUZIAN, J.I. Preparation and characterization of C-phycoyanin coated with STMP/STPP cross-linked starches from different botanical sources

LI, B.; CHU, X.; GAO, M.; LI, W. Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycoyanin. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 42, p. 80, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/abbs/gmp104>

LI, Z.; JIANG, H.; XU, C.; GU, L. A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 153-164, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.010>

LIMA, G.M.; TEIXEIRA, C.N.; TEIXEIRA, C.M.L.L.; FILÓCOMO, D.; LAGE, C.L.S. Influence of spectral light quality on the pigment concentrations and biomass productivity of *Arthrospira platensis*. **Algal Research**, v. 31, p. 157-166, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.012>

LUCENA, A.M.M.; SOUZA, C.R.M.; JALES, J.T.; GUEDES, P.M. M; MIRANDA, G.E.C.; MOURA, A.M.A.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; NASCIMENTO, G.J.; SCORTECCI, K.C.; SANTOS, B.V.O.; SOUTO, J.T. The bisindole alkaloid caulerpin, from seaweeds of the genus caulerpa, attenuated colon damage in murine colitis model. **Drugs**, v. 16, 2018.

MANDAL, S.; HAZRA, B.; SARKAR, R.; BISWAS, S.; NRIPENDRANATH. Hemidesmus indicus, an age-old plant: Study of its in vitro Antioxidant and free radical scavenging potentials. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 604-617, 2009.

MANIRAFASHA, E.; NDIKUBWIMANA, T.; ZENG, X.; LU, Y.; JING, K. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 282-296, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.025>

MASOJÍDEK, J.; KOBLÍŽEK, M.; TORZILLO, G. **Photosynthesis in microalgae**. In: Richmond A, Hu Q (eds) Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Wiley Blackwell, p. 20–39, 2013.

MAULIASARI, E. S.; AGUSTINI, T. W.; AMALIA, U. Stabilisasi fikosiani *Spirulina platensis* dengan perlakuan mikroenkapsulasi dan pH. **Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia**, v. 22, 2019. DOI: <https://doi.org/10.17844/jphpi.v22i3.29121>

MEMIJE-LAZARO, I.N.; BLAS-VALDIVIA, V.; FRANCO-COLÍN, M.; CANO-EUROPA, E. *Arthrospira maxima* (*Spirulina*) and C-phycoyanin prevent the progression of chronic

kidney disease and its cardiovascular complications. **Journal of Functional Foods**, v. 43, p. 37-43, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.01.013>

MIRHOJATI, H.; SHARAYEI, P.; GHAVIDEL, R.A. Microencapsulation of anthocyanin pigments obtained from seedless barberry (*Berberis vulgaris* L.) fruit using freeze drying. **Iranian Food Science and Technology Research Journal**, v. 13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v1396i3.58661>

MOHAMMADI-GOURAJIA, E.; SOLEIMANIAN-ZADA, S.; GHIACI, M. Phycocyanin-enriched yogurt and its antibacterial and physicochemical properties during 21 days of storage. **LWT - Food Science and Technology**, v.102, p. 230-236, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.057>

MORTAZAVIAN, A.; RAZAVI, S.H.; EHSANI, M.R.; SOHRABVANDI, S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1-18, 2007.

MUNAWAROH, H. S. H.; GUMILAR, G. G.; ALIFIA, C. R.; MARTHANIA, M.; STELLASARY, B.; YULIANI, G.; WULANDARI, A. P.; KURNIAWAN, I.; HIDAYAT, R.; NINGRUM, A.; KOYANDE, A. K.; SHOW, P. Photostabilization of phycocyanin from *Spirulina platensis* modified by formaldehyde. **Process Biochemistry**, v. 94, p. 297-304, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.021>.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p 846–52, 2002.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806-1815, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.266>

OSMAN, N.I.; SIDI, N.J.; AWAL, A.; ADAM, N.A.M.; REZALI, N.I. In vitro xanthine oxidase and albumin denaturation inhibition assay of *Barringtonia racemosa* L. and total phenolic content analysis for potential anti-inflammatory use in gouty arthritis. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 343-349 2016. DOI: <https://doi.org/10.5455/jice.20160731025522>

PAGELS, F.; GUEDES, A.C.; AMAROA, H.M.; KIJOA, A.; VASCONCELOS, V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 37, p. 422–443, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.010>

PANGA, L.; LIU, C.; GONG, G.; QUAN, Z. Synthesis, in vitro and in vivo biological PAN-UTAI, W.; IAMTHAM, S. Extraction, purification and antioxidant activity of phycobiliprotein from *Arthrospira platensis*. **Process Biochemistry**, v. 82, p. 189–198, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.04.014>

PARIKH, A.; MADAMWAR, D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 97, 2006.

PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P. K. Purification and characterization of C-phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein**

Expression and Purification, v. 40, p. 248–255, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.10.028>

PATEL, D.; DESAI, S. Phytochemical screening, in vitro anti-microbial and anti-inflammatory activity of methanolic extract of aster lanceolatus willd leaves. **International Journal of Medicine Research**, v. 1, n. 1, p. 26-30, 2019. DOI: <https://doi.org/doi.org/10.22271/medicine>

PATEL, H.; ABOUGHALY, M. H. H.; SCHRYER-PRAGA, J.; CHADWICK, K. The effect of ionotropic gelation residence time on alginate cross-linking and proprieties. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 362-371, 2017.

PAULO, F.; SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 77, p. 1327-1340, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.219>

PRABAKARAN, G.; SAMPATHKUMAR, P.; KAVISRI, M. Extraction and characterization of phycocyanin from Spirulina platensis and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.009>

QV, X.; ZENG, Z.; JIANG, J. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1596-1603, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.006>

RASHID, M. A.; SIKDER, A. A.; KAISAR, M. A.; MIAH, K.; PARVEZ, M.; HOSSIAN, A.K.M.N. Membrane stabilizing activity - A possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of two Bangaladeshi medicinal plants: Mesua nagassarium (Burm.F.) and Kigelia pinnata (Jack) DC. **International Journal of Pharmaceutical**

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic Biol Med.**, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

REDDY, C.M.; BHAT, V.B.; KIRANMAI, G.; REDY, M.N.; REDDANNA, P.; MADYASTHA, K.M. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycocyanin, a lipoprotein from Spirulina platensis, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 277, p. 599–603, 2000.

RENUGADEVI, K.; NACHIYAR, C.V.; SOWMIYA, P.; SUNKAR, S. Antioxidant activity of phycocyanin pigment extracted from marine filamentous cyanobacteria Geitlerinema sp TRV57. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 237-242, 2018. **Research and Development**, v. 3, n. 3, p. 1-5, 2011.

RESHMA; ARUN, K. P.; BRINDHA, P. In vitro anti-inflammatory, antioxidant and nephroprotective studies on leaves of Aegle marmelos and Ocimum sanctum. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, n. 4, p. 121-129, 2014.

ROCK, K.L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 3, p. 99-126, 2008.

- SANGEETHA, G.; VIDHYA, R. In vitro anti-inflammatory activity of different parts of *Pedaliium murex* (L.). **International Journal of Herbal Medicine**, v. 4, n. 3, p. 31-36, 2016.
- SARAVANAN, M.; RAO. 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. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.12.036
- SCHLUCHTER, W.M.; SHEN, G.; ALVEY, R.M.; BISWAS, A.; SAUNÉE, N.A.; WILLIAMS, S.R.; MILLE, C.A.; BRYANT, D.A. Phycobiliprotein biosynthesis in cyanobacteria: structure and function of enzymes involved in post-translational modification. **Adv Exp Med Biol.**, 2010. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1528-3_12.
- SCHMATZ, D.A.; MASTRANTONIO, D.J.S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M.G. Encapsulation of phycocyanin by electrospraying: A promising approach for the protection of sensitive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 119, p. 206–215, 2020.
- SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat. Immunol.**, v. 6, p.1191–97, 2005.
- SHARIAEI, P. Microencapsulation of anthocyanin pigments obtained from seedless barberry (*berberis vulgaris* L.) fruit using freeze drying. **Iranian Journal of Food Science and Technology Researches**, v. 13, p. 14-27, 2017. DOI: 10.22067/IFSTRJ.V1396I3.58661
- SHIH, C.M.; CHENG, C.S.; KUO, Y.L.; CHOU, T.C. Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycocyanin. **Anesth. Analg.**, v. 108, p. 1303–1310, 2009.
- SIDLER, W.A. **Phycobilisome and phycobiliprotein structures**. In: Bryant, D.A. The Molecular Biology of Cyanobacteria, Chap 7, p. 139–216. Kluwer Academic Publishers, 1994.
- SIGNORINI, L.; GRANATA, S.; LUPO, A.; ZAZA, G. Naturally Occurring Compounds: New Potential Weapons against Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18071481>
- SILVA, E. F., FIGUEIRA, F. S., LETTNIN, A. P., CARRET-DIAS, M., FILGUEIRA, D. M. V. B., KALIL, S., TRINDADE, G. S., VOTTO, A. P. S. C-Phycocyanin: Cellular targets, mechanisms of action and multidrug resistance in cancer. **Pharmacological Reports**, v. 70, p. 75-80, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.07.018>
- TANG, W.H.W.; BÄCKHED, F.; LANDMESSER, U.; HAEN, S. Intestinal Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 73, n. 16, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.03.024>
- TAVAKOL, M., VASHEGHANI-FARAHANI, E., DOLATABADI-FARAHANI, T., HASHEMI-NAJAFABADI, S. Sulfasalazine release from alginate-N,O-carboxymethyl chitosan gel beads coated by chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 326–330, 2009.
- VILLARROYA, F.; CEREIJO, R.; GAVALDÀ-NAVARRO, A.; VILLARROYA, J.; GIRALT, M. Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease.

Journal of Internal Medicine, v. 284, p. 492-504, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/joim.12803>

VINCEKOVIĆ, M.; VISKIĆ, M.; JURIC, S.; GIACOMETTI, J.; KOVAČEVIĆ, D.B.; PUTNIK, P.; DONSI, F.; BARBA, F.J.; JAMBRAK, A.R. Innovative technologies for encapsulation of Mediterranean plants extracts. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 1-12, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.001>

WANG, C.; WANG, X.; WANG, Y.; ZHOU, T.; BAI, Y.; LI, Y.; HUANG, B. Photosensitization of phycocyanin extracted from *Microcystis* in human hepatocellular carcinoma cells: Implication of mitochondria-dependent apoptosis. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 117, p. 70–79, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.09.001>

WANG, H.; LIU, Y.; GAO, X.; CARTER, C. L.; LIU, Z. The recombinant β subunit of C-phycocyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. **Cancer Letters**, v. 247, p. 150-158, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.04.002>

WANG, S.; SU, R.; NIE, S.; SUN, M.; ZHANG, J.; WU, D.; MOUSS-MOUSTAID, N. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 363-376, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.002>

WHO - World Health Organization. **Newsroom, statistics and spotlights**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/spotlight>. Acesso em: 05 out. 2019.

WILDMAN, R.B.; BOWEN, C.C. **Phycobilisomes in blue-green algae**. **J. Bad.**, v. 117, p. 866-881, 1974.

WU, H. L.; WANG, G. H.; XIANG, W. Z.; LI, T.; HE, H. Stability and antioxidant activity of food-grade phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. **International Journal of Food Properties**, v. 19, p. 2349-2362, 2016.

YADAV, R.K.; PERALES, M.; GRUEL, J.; GIRKE, T.; JÖNSSON, H.; REDDY, G.V. WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. **Genes & Dev.**, v. 25, p. 2025-2030, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.17258511>

cZHANG, L., GUO, J., PENG, X., JIN, Y. Preparation and release behavior of carboxymethylated chitosan/alginate microspheres encapsulating bovine serum albumin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 92, p. 878–882, 2004.

ZHOU, L.; XIE, M.; YANG, F.; LIU, J. Antioxidant activity of high purity blueberry anthocyanins and the effects on human intestinal microbiota. **LWT - Food Science and Technology**, v. 117, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108621>