

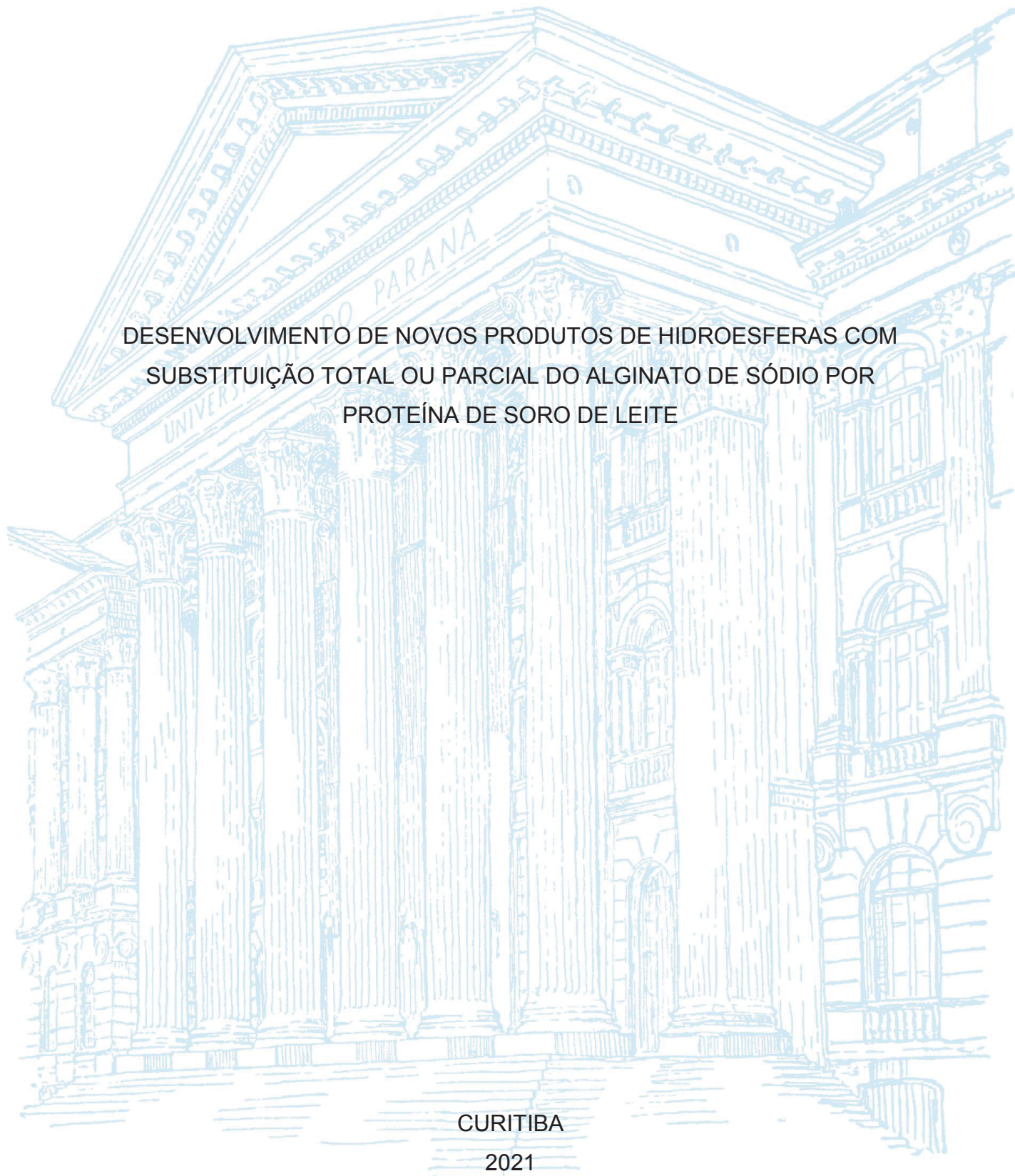
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO VILLAVERDE CENDON

DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS DE HIDROESFERAS COM
SUBSTITUIÇÃO TOTAL OU PARCIAL DO ALGINATO DE SÓDIO POR
PROTEÍNA DE SORO DE LEITE

CURITIBA

2021



FERNANDO VILLAVERDE CENDON

DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS DE HIDROESFERAS COM
SUBSTITUIÇÃO TOTAL OU PARCIAL DO ALGINATO DE SÓDIO POR
PROTEÍNA DE SORO DE LEITE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Luiz Mathias

Coorientadora: Prof. Dr. Regina M. Matos Jorge

CURITIBA

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE – SIBI/UFPR

C395d Cendon, Fernando Villaverde

Desenvolvimento de novos produtos de hidroesferas com substituição total ou parcial do alginato de sódio por proteína de soro de leite [recurso eletrônico]/ Fernando Villaverde Cendon - Curitiba, 2021.

Tese (Doutorado) apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Luiz Mathias
Coorientadora: Prof. Dr. Regina Maria Matos Jorge

1. Hidrogel. 2. Composto orgânico. 3. Erva-mate. I. Mathias, Alvaro Luiz. II. Jorge, Regina Maria Matos. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDD 547.7

Bibliotecária: Vilma Machado CRB9/1563



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FERNANDO VILLAVERDE CENDON** intitulada: **DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS DE HIDROESFERAS COM SUBSTITUIÇÃO TOTAL OU PARCIAL DO ALGINATO DE SÓDIO POR PROTEÍNA DE SORO DE LEITE**, sob orientação do Prof. Dr. ALVARO LUIZ MATHIAS, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 24 de Março de 2021.

Assinatura Eletrônica
25/03/2021 14:23:11.0
ALVARO LUIZ MATHIAS
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
25/03/2021 14:18:04.0
MARIA FILOMENA FILIPE BARREIRO
Avaliador Externo (INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA)

Assinatura Eletrônica
25/03/2021 14:18:17.0
MARCOS ROGÉRIO MAFRA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
26/03/2021 16:15:15.0
LICÍNIO MANUEL GANDO DE AZEVEDO FERREIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE COIMBRA)

Assinatura Eletrônica
25/03/2021 15:07:11.0
DANIEL GRANATO
Avaliador Externo (NATURAL RESOURCES INSTITUTE FINLAND)

RESUMO

O soro de leite é um subproduto da indústria queijeira e seu descarte irregular é nocivo ao meio ambiente, sendo que metade da quantidade gerada é usada na alimentação animal e a outra metade é tratada em estação de efluente industrial. Ainda, o alginato é um dos biopolímeros mais utilizados no mundo para a produção de hidrogéis pela reticulação de sua estrutura através da reação com cátions divalentes. Alternativamente, soluções de proteína de soro de leite também são capazes de formar hidrogéis como o alginato, podendo substituí-lo ou ser usado em associação após um processo de desnaturação térmica e resfriamento. Neste estudo, hidrogéis de proteína de soro de leite e de alginato produzidos com diferentes sais de cátions divalentes foram caracterizados mecânica e ópticamente, bem como a retenção de água e a termoestabilidade dos biopolímeros *in natura*, dos filmes e hidrogéis secos produzidos com Ca^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} . A aplicação de hidroesferas de ambos biopolímeros reticulados com cálcio também foi avaliada para a liberação dirigida de compostos fenólicos com atividade antioxidante de extrato da erva-mate. Na avaliação dos hidrogéis da proteína, a maioria dos hidrogéis levou a uma alta absorbância da radiação ultravioleta, sendo que apenas com o uso de CaGluc , NiCl_2 , MnCl_2 e CuCl_2 os hidrogéis não absorveram nesse espectro. Com o alginato, o uso do zinco e alguns outros cátions levaram a esse comportamento, que é uma característica desejável para protetores solares e para o encapsulamento de microrganismos ou compostos sensíveis à radiação ultravioleta. As esferas de proteína produzidas com gluconato e lactato de cálcio foram as mais rígidas entre todas, e dentre as esferas produzidas com alginato, as de gluconato de cálcio ficaram entre as mais resistentes. Cátions com maiores números atômicos produziram esferas de alginato mais rígidas, e o comportamento oposto foi observado para a proteína de soro de leite devido aos diferentes mecanismos de reticulação iônica envolvidos. A proteína do soro de leite é mais estável termicamente do que o alginato, apresentando também uma maior capacidade de retenção de água. Portanto, a proteína pode atuar como um melhor agente retardador de chamas do que o alginato. Por outro lado, apenas as esferas de alginato foram adequadas para a produção de carvão ativado ($190,0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) e para a recuperação de óxidos metálicos. A

liberação de compostos fenólicos e a atividade antioxidante em cada etapa da digestão gastrointestinal foram comparadas quando amostras diferentes são ingeridas (extrato de erva-mate puro ou sua versão encapsulada em proteína de soro do leite ou em alginato). Tanto a proteína quanto o alginato preservaram os compostos antioxidantes do extrato na região do cólon, onde ocorre a melhor absorção, quando comparadas ao extrato bruto utilizando-se da metodologia ABTS de atividade antioxidante. Finalmente, os resultados demonstram que as proteínas de soro de leite apresentam propriedades que permitem produção de uma grande variedade de produtos de hidropartículas de alginato e no desenvolvimento de produtos inovadores nas indústrias de alimentos, farmacêutica, ambiental e biotecnológica.

Palavras-chave: Hidrogéis. Rigidez. Termogravimetria. Erva-mate. Atividade antioxidante. Digestão gastrointestinal *in vitro*.

ABSTRACT

Whey is a by-product of the cheese industry and irregular disposal is harmful to the environment. Only half of the generation is used in animal feed, and the other half is treated in industrial effluent stations. Alginate is one of the most widely used biopolymers in the world for the production of hydrogels by the reticulation of its structure by the reaction with divalent cations. Alternatively, whey protein solutions are also capable of forming hydrogels such as alginate's, which can be substituted or used in combination, after a process of thermal denaturation and cooling. In this study, whey protein and alginate hydrogels produced with different salts of divalent cations were characterized mechanically and optically, as well as the water retention and thermostability of fresh biopolymers, films and dry hydrogels produced with Ca^{2+} , Zn^{2+} and Cd^{2+} . The application of both biopolymers hydrogels reacted with Ca^{2+} was also evaluated for the oriented release of phenolic compounds with antioxidant capacity found in yerba mate extract. When evaluating protein hydrogels, most of them led to a high absorbance of ultraviolet radiation, and only the hydrogels produced with CaGluc, NiCl_2 , MnCl_2 and CuCl_2 did not absorb in this spectrum. With alginate, the use of zinc and some other cations led to this behavior, which is a desirable characteristic for sunscreens and for the encapsulation of microorganisms or compounds that are sensitive to ultraviolet radiation. The spheres of protein produced with gluconate and calcium lactate were the most rigid of all, and among the spheres produced with alginate, those of calcium gluconate were among the most resistant. Cations with higher atomic numbers produced more rigid alginate spheres, and the opposite behavior was observed for whey protein due to the different crosslinking mechanisms involved. Whey protein is more thermally stable than alginate, and presented higher water retention capacity. Therefore, the protein can act as a better flame retardant agent than alginate. On the other hand, only the alginate spheres were suitable for the production of activated carbon ($190.0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) and for the recovery of metal oxides. The amount of phenolic compounds and the antioxidant capacity at each stage of a simulation of gastrointestinal digestion were compared when different samples are ingested (pure extract or its version encapsulated in whey

protein or alginate). Both protein and alginate preserved the extract's antioxidant compounds in the colon region, where the best absorption occurs, when compared to the crude extract using the methodology ABTS for quantification of antioxidant capacity. Finally, the results demonstrate that whey proteins have properties that allow the production of a wide variety of alginate hydroparticles products and the development of innovative products in the food, pharmaceutical, environmental and biotechnology industries.

Keywords: Hydrogels. Stiffness. Thermogravimetry. Yerba Mate. Antioxidant capacity. *In vitro* gastrointestinal digestion.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 – INTERAÇÃO MOLECULAR DO ALGINATO E ÍON CÁLCIO REVELANDO DETALHES DA “CAIXA DE OVOS”	26
FIGURA 2.2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DURANTE A FORMAÇÃO DOS MONOCOMPLEXOS, DÍMEROS E MULTÍMEROS PARA a) CADEIAS CURTAS E b) LONGAS	27
FIGURA 2.3 – REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA ESTRUTURA QUATERNÁRIA DA β -LACTOGLOBULINA	30
FIGURA 2.4 – CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE MEDICAMENTOS DE LIBERAÇÃO: 1) CONVENCIONAL, 2) SUSTENTADA, 3) RETARDADA, 4) REPETIDA E 5) PROLONGADA	33
FIGURA 2.5 – SISTEMA a) RESERVATÓRIO E b) MATRICIAL	34
FIGURA 2.6 – PARTÍCULAS DE a) ALGINATO E b) PECTINA CONTENDO ÓLEO DE GIRASSOL RECOBERTAS COM OVOALBUMINA E PROTEÍNA ISOLADA DE SORO DE LEITE	34
FIGURA 2.7 – ESQUEMA DO SISTEMA UTILIZADO PARA A IONTOFORESE DE LIDOCAÍNA EM HIDROGÉIS DE ALGINATO DE CÁLCIO	35
FIGURA 2.8 – DIAGRAMA DE TENSÃO E DEFORMAÇÃO DE ESPUMAS DE HIDROGÉIS DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE, ALGINATO E ARGILA	40
FIGURA 2.9 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO EQUIPAMENTO PARA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	41
FIGURA 2.10 – ESFERA DE ALGINATO FOTOGRAFADA a) EM MICROSCOPIA ÓTICA E b) DE ALG COM AMIDO FOTOGRAFADA EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	42

FIGURA 2.11 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ESFERAS DE ALGINATO E QUITOSANA: a) ESFERA INTEIRA, b) SUPERFÍCIE E c) SEÇÃO TRANSVERSAL	43
FIGURA 2.12 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓTICA DE ESFERAS a) DE ALGINATO E b) DA MISTURA DE ALGINATO COM A PROTEÍNA DE SORO DE LEITE	43
FIGURA 2.13 – IMAGENS DE ESFERAS DE ALGINATO ANTES (ACIMA) E DEPOIS DE RECOBRIMENTO COM PROTEÍNA ISOLADA DE SORO DE LEITE (ABAIXO) CONTENDO ÓLEO DE GIRASSOL ENCAPSULADO	44
FIGURA 2.14 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓTICA DE ESFERAS DE PROTEÍNA ISOLADA DE SORO DE LEITE CONTENDO RIBOFLAVINA DURANTE O TRÂNSITO GASTROINTESTINAL EM SUÍNOS A PARTIR DO MOMENTO DA INGESTÃO	45
FIGURA 2.15 – SIMILARIDADE ENTRE O SISTEMA DIGESTIVO SUÍNO E HUMANO	45
FIGURA 3.1 – TEXTURÔMETRO E PONTA DE PROVA CILÍNDRICA DE ACRÍLICO UTILIZADOS PARA COMPRIMIR OS HIDROGÉIS	51
FIGURA 3.2 – ESQUEMA PARA O GOTEJAMENTO DAS ESFERAS NA SOLUÇÃO DE GELIFICAÇÃO	54
FIGURA 3.3 – PROTOCOLO DE SIMULAÇÃO DAS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS <i>IN VITRO</i>	55
FIGURA 4.1 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓTICA DE ESFERAS DE ALGINATO E PROTEÍNA ISOLADA DE SORO DE LEITE COMPLEXADOS COM CÁTIOS DIVALENTES	60
FIGURA 4.2 – ABSORBÂNCIA DOS HIDROGÉIS COMPLEXAS COM SAIS DE CÁTIOS DIVALENTES (100 mM) NO ESPECTRO UV-VISÍVEL	63

FIGURA 4.3 – EFEITO DO NÚMERO ATÔMICO DOS CÁTIOS DIVALENTES USADOS EM ASSOCIAÇÃO COM CLORETO NA MASSA DAS ESFERAS	66
FIGURA 4.4 – COMPORTAMENTO MECÂNICO E LINEARIZAÇÃO DA LEI DE HERTZ DOS HIDROGÉIS RETICULADOS COM SAIS COM NÚMERO ATÔMICO ALTO (CdCl ₂) E BAIXO (CaLac) E O SAL MAIS UTILIZADO PARA A GELIFICAÇÃO A FRIO DO ALGINATO (CaCl ₂) SÃO ILUSTRADOS	69
FIGURA 4.5 – COMPARAÇÃO DO MODULO DE YOUNG DOS HIDROGÉIS COM O NÚMERO ATÔMICO DOS CÁTIOS DIVALENTES USADOS EM ASSOCIAÇÃO COM CLORETO	72
FIGURA 4.6 – ANALOGIA ENTRE O NÚMERO ATÔMICO E RAIOS IÔNICO DOS CÁTIOS DE COMPLEXAÇÃO	73
FIGURA 4.7 –TG E DTG PARA: a) ALGINATO DE SÓDIO NA FORMA EM PÓ (NaALGp) E EM FILME (NaALGf); E b) PARA AS ESFERAS DE CÁLCIO (CaALGs), ZINCO (ZnALGs) E CÁDMIO (CdALGs)	77
FIGURA 4.8 – COORDENAÇÃO DOS GRUPOS CARBOXÍLICOS DO ALG COM UM CÁTION METÁLICO GENÉRICO (M ²⁺): MONODENTADA (POR EXEMPLO Zn ²⁺ , UM CÁTION PEQUENO) E BIDENTADA (POR EXEMPLO Ca ²⁺ OU Cd ²⁺ , CÁTIOS GRANDES)	78
FIGURA 4.9 – TG E DTG PARA: a) WPIp, dWPIf; b) CadWPIs, ZndWPIs E CddWPIs	81
FIGURA 4.10 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE: a) CaALGs COM AUMENTO DE 100X E b) 5000X; c) CadWPIs COM AUMENTO DE 100X E d) 5000X	83
FIGURA 4.11 – INFLUÊNCIA DO pH DA SOLUÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO SOBRE A OXIDAÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE ENCAPSULADO EM MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO: pH = 3,6	84

(ESQUERDA); 5,5 (MEIO); 8,0 (DIREITO)

FIGURA 4.12 – PROTEÍNA ISOLADA DE SORO DE LEITE PRÉ-AQUECIDA EM SOLUÇÃO DE EXTRATO DE ERVA-MATE (a): 11% DE PROTEÍNA AQUECIDA A 80 °C (ESQUERDA); 9,6% DA PROTEÍNA AQUECIDA A 75 °C (DIREITO). HIDROGÉIS DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE COM EXTRATO DE ERVA-MATE (b) 85

FIGURA 4.13 – ESFERAS APÓS SIMULAÇÃO DE DIGESTÃO GASTROINTESTINAL: a) ALGmp; b) WPImp 86

FIGURA 4.14 – SIMULAÇÃO DA PRESENÇA DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DURANTE A DIGESTÃO DO EXTRATO PURO E DOS HIDROGÉIS CONTENDO O EXTRATO 87

FIGURA 4.15 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO EXTRATO DE ERVA-MATE 88

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – ÁREAS DE APLICAÇÃO DE HIDROGÉIS DE ALGINATO RETICULADO COM CÁTIOS DIVALENTES	25
TABELA 2.2 – VARIÁVEIS DA PRODUÇÃO DAS ESFERAS DE HIDROGÉIS DE ALGINATO	27
TABELA 4.1 – AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MECÂNICO E MORFOLÓGICO DOS HIDROGÉIS DE ALGINATO	61
TABELA 4.2 – AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MECÂNICO E MORFOLÓGICO DOS HIDROGÉIS DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE	61
TABELA 4.3 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÓDULOS DE YOUNG ENCONTRADOS NO PRESENTE ESTUDO E OS DESCRITOS PREVIAMENTE NA LITERATURA	70
TABELA 4.4 – FAIXA DE TEMPERATURA E PERDA DE MASSA (Δm) PARA CADA ETAPA DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA (I - V)	77

LISTA DE SIGLAS

AA	– Atividade antioxidante
ABTS	– 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)6-ácido sulfônico
ACO	– <i>Ascending colon</i> (Cólon ascendente)
ALG	– Alginato
ALGmp	– Micropartículas de alginato com extrato de erva-mate
CaALGs	– Esfera de alginato de cálcio
CadWPIs	– Esfera de proteína isolada de soro de leite desnaturada com cálcio
CaGluc	– Gluconato de cálcio
CaLac	– Lactato de cálcio
CdALGs	– Esfera de alginato de cádmio
CddWPIs	– Esfera de proteína isolada de soro de leite desnaturada com cádmio
DCO	– <i>Descendant colon</i> (Cólon descendente)
DPPH	– 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTG	– Derivada da curva de TGA
DUO	– <i>Duodenum</i> (Duodeno)
dWPIf	– Filme de proteína de soro de leite desnaturada
EXT	– Extrato de erva-mate
FTIR	– <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> (Espectroscopia Infravermelho por transformação de Fourier)
G	– α -L-Guluronato
GAE	– <i>Galic Acid Equivalent</i> (Ácido gálico equivalente)
ILE	– <i>Ileum</i> (Íleo)
M	– β -D-Manuronato
M ²⁺	– Cátion de metal divalente
MALG	– Alginato do metal M
MCl ₂	– Cloreto do metal M
MET	– Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	– Microscopia eletrônica de varredura
MM	– Massa molar

MOU	– <i>Mouth</i> (Boca)
NaALGf	– Filme de alginato de sódio
NaALGp	– Alginato de sódio em pó
RMSD	– Raiz da média do quadrado dos desvios
STO	– <i>Stomach</i> (Esôfago/Estômago)
TCO	– <i>Transverse colon</i> (Cólon transverso)
TEAC	– <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> (Capacidade antioxidante equivalente em Trolox)
TG/TGA	– <i>Thermogravimetric analysis</i> (Análise termogravimétrica)
Tp	– Temperatura de pico de perda de massa
TPC	– <i>Total Phenolic Compounds</i> (Compostos Fenólicos Totais)
UV	– Ultravioleta
WPI	– <i>Whey Protein</i> Isolado (Proteína isolada de soro de leite)
WPImp	– Micropartículas de proteína isolada de soro de leite com extrato de erva-mate
WPIp	– <i>Whey Protein</i> Isolado em pó (Proteína isolada de soro de leite em pó)
Z	– Número atômico
ZnALGs	– Esfera de alginato de zinco
ZndWPIs	– Esfera de proteína isolada de soro de leite desnaturada com zinco
Δm	– Perda de massa

LISTA DE SÍMBOLOS

a	Fator da equação de Mark-Houwink
Abs	Absorbância
C	Concentração de biopolímero
d	Diâmetro
d_{maior} e d_{menor}	Diâmetros de uma mesma esfera no cálculo da esfericidade
E	Módulo de Young (rigidez)
F	Força
H	Deslocamento
k	Fator da equação de Mark-Houwink
m	Massa
M	Massa molar (variável) // mol/L (unidade)
R^2	Coefficiente de determinação
RMSD	Raiz dos erros médios ao quadrado
μ	Viscosidade da solução
$[\mu]$	Viscosidade intrínseca
μ_{red}	Viscosidade reduzida
μ_s	Viscosidade do solvente
v	Coefficiente de Poisson

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	CONTEXTO.....	18
1.2	OBJETIVOS.....	22
1.2.1	Objetivo geral.....	22
1.2.2	Objetivos específicos.....	22
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1	BIOMOLÉCULAS PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÉIS.....	24
2.1.1	Alginato (ALG)	25
2.1.2	Proteína de soro de leite (WPI)	29
2.2	APLICAÇÕES DE HIDROGÉIS.....	32
2.2.1	Alimentos.....	32
2.2.2	Liberação controlada.....	32
2.2.3	Encapsulamento de extrato de erva-mate.....	35
2.2.4	Filmes.....	37
2.2.5	Ambiental.....	38
2.3	CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS.....	38
2.3.1	Comportamento ótico.....	38
2.3.2	Comportamento mecânico.....	39
2.3.3	Termoestabilidade.....	41
2.3.4	Morfologia.....	42
2.3.5	Liberação gastrointestinal <i>in vitro</i>	46
2.3.6	Compostos fenólicos e atividade antioxidante (AA).....	46
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1	MATERIAL.....	49
3.2	EFEITO DO USO DE DIFERENTES CÁTIOS DIVALENTES.....	50
3.2.1	Produção das esferas.....	50
3.2.2	Absorção de radiação UV-Visível	51
3.2.3	Tamanho e análise mecânica.....	51
3.2.4	Análise estatística.....	52
3.3	TERMOESTABILIDADE.....	52
3.3.1	Produção das esferas.....	52

3.3.2	Termoestabilidade.....	53
3.3.3	Morfologia das esferas de ALG e WPI e produção de carvão ativado	53
3.4	ENCAPSULAMENTO DE EXTRATO DE ERVA-MATE.....	53
3.4.1	Produção das esferas.....	53
3.4.2	Simulação de liberação gastrointestinal <i>in vitro</i>	55
3.4.3	Compostos fenólicos totais (TPC) e atividade antioxidante (AA).....	56
3.4.4	Análise morfológica.....	57
3.4.5	Análise estatística.....	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1	ESFERIFICAÇÃO.....	58
4.2	EFEITO DO USO DE DIFERENTES CÁTIOS DIVALENTES.....	59
4.2.1	Aspecto visual e esfericidade.....	59
4.2.2	Absorbância no UV-Visível	62
4.2.3	Massa.....	64
4.2.4	Tamanho.....	67
4.2.5	Rigidez.....	68
4.3	TERMOESTABILIDADE.....	75
4.3.1	Alginato (ALG)	75
4.3.2	Proteína de Soro de Leite (WPI).....	79
4.3.3	Estimativa da porosidade de carvão ativado produzido com esferas de ALG e WPI.....	82
4.4	ENCAPSULAMENTO DE EXTRATO DE ERVA-MATE.....	84
4.4.1	Produção das esferas.....	84
4.4.2	Simulação da liberação gastrointestinal <i>in vitro</i>	85
4.4.3	Compostos fenólicos totais (TPC) e atividade antioxidante (AA).....	86
5	CONCLUSÕES.....	91
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
	REFERÊNCIAS.....	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO

A produção mundial de leite em 2017 foi de 660 bilhões (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2018). O Brasil foi o quarto maior produtor (34 bilhões de litros), sendo que o Paraná e o Rio Grande do Sul estão empatados em segundo lugar como maiores produtores nacionais, contribuindo com 4,6 bilhões de litros cada e perdendo apenas para Minas Gerais, que produz 9 bilhões.

O soro de leite é um subproduto da coagulação do leite na produção de queijo (AZEVEDO et al., 2015). Aproximadamente 9 kg de soro são gerados por kg de queijo produzido (LEITE; BARROZO; RIBEIRO, 2012), sendo que metade desse resíduo tem sido tratado ou utilizado em produtos alimentícios (CINELLI et al., 2014) e o restante utilizado na alimentação de animais (GAJO et al., 2016). Isto revela a importância de desenvolver tecnologias para agregar valor a esse subproduto (SILVA; SIQUEIRA; NOGUEIRA, 2018).

Neste contexto, a desnutrição proteica atinge crianças (FORE et al., 2020), idosos (KANG et al., 2019) e pacientes com câncer (PEDRAZZOLI et al., 2019), que ficam sujeitos a perda de massa muscular se o aporte proteico não for adequado. Ainda, dos 54% de lares brasileiros que consomem suplementos alimentares observados em 7 capitais, apenas 16% consomem suplementos proteicos. A proteína isolada do soro de leite, denominada de WPI (*Whey Protein* Isolado) neste documento, representa três quartos da suplementação proteica e a prevalência de consumo está entre 17 e 40 anos (ABIAD; ABIFISA; ABENUTRI, 2015), ou seja, fora do grupo onde a necessidade de ganho de massa muscular é mais crítica, formado por crianças e idosos. A mistura de proteínas contida no soro de leite fornece uma considerável variedade de aminoácidos para a dieta humana (WIJAYANTI; BANSAL; DEETH, 2014), incluindo aminoácidos essenciais como os de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), responsáveis por 35% da formação de proteínas musculares (SHIMOMURA et al., 2004). A cisteína, por exemplo, é matéria-prima para a produção de glutathione, um antioxidante hidrossolúvel, que é necessária para o funcionamento do sistema imunológico (MENDOZA-

CÓZATL et al., 2005). Durante o exercício, o corpo pode ficar sem glutathione, a qual pode ser repostada pelo consumo do WPI (BOUNOUS, 2000).

Biopolímeros como o WPI geralmente não são tóxicos, são biodegradáveis (LIU et al., 2014) e também são uma alternativa renovável para a produção de materiais poliméricos, já que não provém de uma fonte finita como combustíveis fósseis (ROSS et al., 2011; AZEVEDO et al., 2015; LIU et al., 2016b). Para tal, o desempenho e as propriedades de muitos desses materiais precisam ser determinados, já que são historicamente ignorados devido ao baixo custo de plásticos sintéticos para aplicações concorrentes (PATHAK et al., 2009; HUQ et al., 2012).

O WPI é utilizado na indústria alimentícia em produtos de panificação, em massas, sorvetes, carnes processadas e alimentos infantis (CHEN; WANG; SCHIRALDI, 2013). Também forma filmes biodegradáveis com boas propriedades mecânicas e de barreira, sendo comum seu uso concomitante com polissacarídeos para melhorar propriedades um do outro (CHEN; WANG; SCHIRALDI, 2013; CINELLI et al., 2014; ALAVI et al., 2018). O alginato (ALG) pode dar flexibilidade e resistência mecânica a outros materiais mais rígidos e estruturantes como o WPI (CINELLI et al., 2014).

Por outro lado, o alginato de sódio, denominado neste documento como NaALG, é formado por unidades de manuronato e guluronato e é obtido de algas marrons (LIANG et al., 2012; LIU et al., 2014). Têm sido um dos biopolímeros mais usado no mundo para o encapsulamento de compostos bioativos, a produção de filmes biodegradáveis, em aplicações farmacêuticas e biomédicas (HUQ et al., 2012; MARESCA et al., 2016; KUMAR; THAKUR; KUMAR, 2021; SMITH; SENIOR, 2021; CHOI; KIM; CHA, et al. 2021). Na presença de cátions divalentes, como o Ca^{2+} ou o Zn^{2+} , forma hidrogéis que possuem estruturas tridimensionais, rígidas e ordenadas no processo denominado gelificação a frio (LIU et al., 2016b; ALAVI et al., 2018). Após um processo de desnaturação térmica e resfriamento, soluções de WPI, majoritariamente composta por β -lactoglobulina, também são capazes de formar hidrogéis, podendo substituir o NaALG ou ser usado em associação.

No mundo, a produção anual de ALG é de aproximadamente 38 mil toneladas (DRAGET, 2009), sendo que metade da produção se concentra na China (LIU et al., 2014). O Brasil importou 900 toneladas de ALG em 2015, e

não há produção nacional (NOGUEIRA, 2017). Por outro lado, o Brasil é o quarto maior produtor de queijo, gerando 10 milhões de toneladas de soro em 2015 (GOMES et al., 2017) contendo aproximadamente 0,5% de WPI (SGARBIERI, 1999) que resulta em 50 mil toneladas de proteína. Logo, existe disponibilidade de matéria-prima para o uso do WPI em substituição ao ALG na produção de hidrogéis, diminuindo a importação do polissacarídeo, agregando valor nutricional e dando destino ao soro de leite já produzido, revelando a importância deste estudo para o desenvolvimento de tecnologia nacional para produção de hidrogéis.

Além do alto valor nutricional agregado do WPI (ALAVI et al., 2018), sua gelificação a frio também possibilita o encapsulamento de compostos voláteis como aromas (HUNDRE; KARTHIK; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015) e compostos bioativos termosensíveis como a vitamina B1, probióticos, curcumina (ALAVI et al., 2018), insulina (CENDON et al., 2018), antocianinas e óleos vegetais (SVANBERG et al., 2019). Também é possível incorporar substâncias como antioxidantes nos filmes para agir na superfície do alimento, como uma embalagem ativa (HUQ et al., 2012). O uso isolado ou combinado de ALG e a proteína isolada de soro de leite (WPI) tem a vantagem de serem solúveis em água antes da reticulação iônica, ao contrário de outros polissacarídeos e proteínas, como a celulose e a quitina, respectivamente (LIU et al. 2014; LIU et al., 2016a; ALAVI et al., 2018).

Algumas características, como a transparência à luz visível ou à radiação ultravioleta (UV), auxiliam no projeto de aplicações, definindo um hidrogel como melhor para proteger substâncias (SMIJS; PAVEL, 2011; ZOHAR-PEREZ et al., 2003; DURANTE et al., 2012) ou para permitir a ocorrência de foto-catálise (AMMALA et al., 2002; HE; HOCKING; TSUZUKI, 2012; DALPONTE et al., 2019).

Conhecer o formato e a resistência mecânica dos hidrogéis ajuda na previsão da desintegração ou deformação do formato do material durante a produção ou aplicação, além de facilitar a previsão de características sensoriais. Nesse contexto, a rigidez à compressão elástica, que relaciona a deformação uniaxial de uma esfera com a força que a causou (BAUMGART, 2000), é essencial na previsão da mastigabilidade de alimentos de hidrogéis, principalmente para idosos (ISHIHARA et al., 2012). O efeito do tipo e da

concentração de alguns cátions na rigidez de seus hidrogéis esféricos de ALG foram avaliados anteriormente (OUWERX et al., 1998; CHAN et al., 2011), porém os íons Zn^{2+} e Pb^{2+} não foram contemplados até o momento. No caso de WPI, não foram feitos quaisquer tipos de estudos relacionados ao tema. Os cátions que apresentam maior rigidez para esferificação com ALG são Cd^{2+} , Ba^{2+} e Cu^{2+} , seguidos por Sr^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} , nesta ordem (OUWERX et al., 1998; CHAN et al., 2011).

É importante entender as limitações térmicas de polímeros como o WPI para prever sua estabilidade molecular em aplicações como agente de encapsulamento (TAVARES; NOREÑA, 2019), produção de filmes (OLIVEIRA et al., 2018; CHANG et al., 2019) e como alimentos especiais, inclusive devido à formação de odores fortes como o sulfito de hidrogênio e metanotiol (WIJAYANTI; BANSAL; DEETH, 2014). Estudos anteriores usando termogravimetria relataram que os ALG de cálcio e de zinco mostram boas propriedades de retardo de chama e menor emissão de fumaça em comparação com o ácido algínico não reticulado (ZHANG et al., 2012; LIU et al., 2014; LIU et al., 2016a, LIU et al., 2016b). Por não ser tóxico como os polímeros sintéticos, pode ser volatilizado no caso de um incêndio sem maiores riscos (ZHANG et al., 2012). Assim como desejado na fabricação de filmes plásticos, o WPI também pode ser usado para evitar a passagem do oxigênio em tecidos, funcionando também como retardante de chama (BOSCO et al., 2013).

Adicionalmente, é importante conhecer o comportamento de degradação gastrointestinal desses materiais para saber se haverá absorção das proteínas, dos cátions reticulantes ou do princípio-ativo encapsulado. Felizmente, parte dessa investigação pode ser feita *in vitro*, simulando o processo natural de digestão e poupando o uso de animais em laboratório (BRODKORB et al., 2019). Com relação ao ALG, pode ser absorvido apenas após ser fermentado pelas bactérias do intestino (AGUIRRE-CALVO et al., 2020). A absorção do WPI depende de diversos fatores, como alterações térmicas ou químicas em sua estrutura (SAH; MCAINCH; VASILJEVIC, 2016), sendo já utilizada para suplementação proteica. Resta saber se a reticulação afeta sua degradação e posterior absorção.

A biodisponibilidade de um composto bioativo encapsulado depende da interação entre o composto, a matriz e o meio digestivo. O extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) contém polifenóis conhecidos por suas propriedades antioxidantes, e foi encapsulado previamente em ALG utilizando amido e quitosana como copolímeros (DELADINO et al., 2008; LÓPEZ-CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2014). Nesses estudos, a maior parte dos antioxidantes foi liberada na seção estomacal, quando a absorção dos compostos fenólicos da erva-mate ocorre depois de processamento no intestino (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007).

Dentro deste contexto, este estudo apresenta três observações fundamentais: o efeito ótico e mecânico do uso de dois diferentes biopolímeros (WPI e ALG) e seus diferentes sais de reticulação (nove cátions divalentes diferentes, assim como quatro contraíons diferentes associados ao Ca^{2+}) na produção de hidrogéis; a resistência térmica e a retenção de água dos biopolímeros *in natura* e dos seus hidrogéis reticulados com Ca^{2+} , Zn^{2+} ou Cd^{2+} ; e o potencial de liberação dos compostos antioxidantes da erva-mate encapsulado em hidrogéis de WPI ou de ALG em um meio gastrointestinal simulado.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a possibilidade de substituição do ALG pelo WPI na produção de hidrogéis de diferentes cátions e verificar a possibilidade de proteger os compostos com atividade antioxidante (AA) presentes no extrato de erva-mate através do encapsulamento do extrato em hidrogéis dos biopolímeros.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Produzir hidrogéis de WPI e de ALG usando diferentes sais para a reticulação iônica;

- Avaliar a influência do uso de diferentes cátions divalentes e de diferentes contraíons para um mesmo cátion no comportamento mecânico e ótico;
- Verificar a termoestabilidade de hidrogéis de WPI e de ALG reticulados com cálcio, zinco e cádmio, bem como os dois biopolímeros *in natura*;
- Examinar o efeito do número atômico e do raio do cátion na retenção de água e na resistência térmica da ligação entre os metais e o ALG;
- Avaliar o efeito da desnaturação térmica a 80 °C do WPI na resistência térmica da matriz;
- Avaliar a aplicação de carvão ativado produzido a partir de hidrogéis de ALG e WPI reaproveitados da adsorção de contaminantes caracterizando a área superficial do produto morfologicamente e por adsorção;
- Avaliar a encapsulação do extrato de erva-mate em hidrogéis de WPI e de ALG;
- Comparar a ingestão do extrato puro, ou encapsulado em ALG ou em WPI com relação à liberação *in vitro* de compostos fenólicos e à AA ao longo do sistema digestivo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

São inúmeras as aplicações dos hidrogéis de ALG. Em muitas delas, outros biopolímeros, como o WPI, podem ser utilizados. A seguir, o estado de arte das aplicações que têm sido desenvolvidas para o ALG e para o WPI é apresentado, bem como uma análise do uso de hidrogéis na área de alimentos, farmacêutica, ambiental e na produção de filmes. Na área de alimentos, o encapsulamento do extrato de erva-mate é destacado devido a sua importância como fonte de compostos fenólicos, que apresentam ação antioxidante. Algumas técnicas para a caracterização dos hidrogéis são revisadas, como análises mecânicas, térmicas, óticas e morfológicas. E finalmente, é mostrado um olhar sobre a simulação da digestão gastrointestinal e sobre a caracterização da AA para verificar se é possível preservar os compostos fenólicos do extrato de erva-mate durante a digestão através de seu encapsulamento em ALG ou em WPI.

2.1 BIOMOLÉCULAS PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÉIS

Os biopolímeros podem ser classificados em três tipos, baseando-se na natureza dos monômeros: ácidos nucleicos, responsáveis pelo armazenamento e replicação do código genético; proteínas, que são matéria-prima para a produção de hormônios, de elementos do sistema imunológico, de enzimas e estruturas, como músculos, tendões e articulações; e os polissacarídeos, que exercem funções principalmente estruturais (VAN DER MAAREAL, 2007). Os biopolímeros são de grande importância para o desenvolvimento de produtos em várias áreas porque essas macromoléculas formam estruturas hierárquicas (primárias, secundárias, terciárias e quaternárias), interagindo com estruturas complexas, como células e organismos. Unidades funcionais podem ser adicionadas às cadeias para alterar propriedades, como por exemplo, a presença de hidroxilas, que aumentam a resistência mecânica do material através da formação de ligações de hidrogênio.

Hidrogéis são redes poliméricas reticuladas que são capazes de reter grandes quantidades de água, sendo classificados dependendo do método de reticulação, a carga dos monômeros do polímero e características mecânicas e

estruturais (VAN VLIERBERGHE; DUBRUEL; SCHACHT, 2011). Entre outras aplicações, os hidrogéis são muito convenientes para aplicações alimentícias, devido às características sensoriais (LANGTON; ASTRÖM; HERMANSSON, 1997), farmacêuticas, devido à possibilidade de encapsulamento de fármacos para liberação em perfis de tempo definidos, médicas, devido à consistência macia, que lembra a consistência de tecidos vivos e favorece a biocompatibilidade (VAN VLIERBERGHE; DUBRUEL; SCHACHT, 2011).

2.1.1 Alginato (ALG)

O ALG é um dos polímeros mais utilizados para o microencapsulamento de enzimas, extratos de plantas, células e medicamentos. Quando na presença de cátions divalentes (como Ca^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+}), sofre a substituição do cátion monovalente gerando uma ligação cruzada (*crosslinking*) num processo conhecido como reticulação iônica. Os hidrogéis resultantes dessa reação tem uma grande variedade de aplicações (TABELA 2.1). Os íons mais utilizados são o cálcio e o bário (ETCHEPARE et al., 2015 e MARY; SASIKUMAR, 2015), formando uma rede tridimensional conhecida como “caixa de ovos” (FIGURA 2.1).

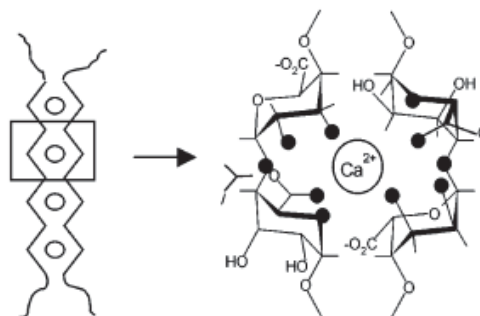
TABELA 2.1 – ÁREAS DE APLICAÇÃO DE HIDROGÉIS DE ALGINATO RETICULADO COM CÁTIOS DIVALENTES (continua)

Farmacêutica	Alimentos	Ambiental	Biotecnologia
Liberação controlada: administração de fármacos [1, 2, 3]; proteção contra o movimento peristáltico [4]; liberação de albumina sérica bovina [5], insulina [6], riboflavina [7]	Proteção de moléculas funcionais: estabilidade durante armazenamento de óleo de farelo de trigo duro [12]; aumento de biodisponibilidade de polifenóis [14]	Remoção de poluentes de efluentes industriais: remoção de metais pesados de águas residuais por gelificação [20, 21] ou adsorção [22, 23, 24, 25]	Proteção de microrganismos: estabilidade de microrganismos contra a radiação UV [32], armazenamento e ambiente gastrointestinal [33, 34]
Curativos: liberação de fármacos para acelerar a cicatrização de feridas [8]	Características sensoriais: mastigabilidade em alimentos com hidrogel [15]; compressão da língua contra o palato duro [16]; necessidades de textura de alimentos para idosos [17]	Leito fixo: estabilidade mecânica necessária [26]; imobilização de catalisadores [27], adsorventes e enzimas em reatores e colunas de adsorção [28]	Imobilização: imobilização de <i>Aspergillus niger</i> [35] para produção de ácido cítrico; adsorção de metais pesados por bactérias aprisionadas [25]

TABELA 2.1 – ÁREAS DE APLICAÇÃO DE HIDROGÉIS DE ALGINATO RETICULADO COM CÂTIONS DIVALENTES (conclusão)

Farmacêutica	Alimentos	Ambiental	Biotecnologia
Engenharia de tecidos: estabilidade mecânica necessária [8, 9, 10, 11]	Suplementação: suplementação de micronutrientes para humanos e animais [18, 19]	Fotocatálise: transparência requerida para fotodegradação de poluentes [29, 30, 31]	
Cosméticos: estabilidade de ingredientes ativos [12]; opacidade para protetor solar [13]			
[Referências]: 1 - D'Arrigo et al. (2012); 2 - Patel et al. (2016); 3 - Cendon et al. (2018); 4 - Guyton e Hall (2006); 5 - Lin et al. (2005); 6 - Déat-Lainé et al. (2012); 7 - Wichchukit et al. (2013); 8 - Lee e Mooney (2012); 9 - Loh, Wong e Choong (2012); 10 - Torres et al. (2019); 11 - Silva et al. (2018); 12 - Durante et al., 2012; 13 - Smijs e Pavel, 2011; 14 - Hu et al. (2017); 15 - Langton, Aström e Hermansson (1997); 16 - Heath e Prinz (1999); 17 - Ishihara et al. (2012); 18 - Shukla et al. (2018); 19 - Anchordoquy et al. (2019); 20 - Wang, Lu e Li (2016); 21 - Lamelas et al. (2005); 22 - Shang, Yu e Romero-González (2015); 23 - Papageorgiou et al. (2009); 24 - Bailey et al. (1999); 25 - Chang e Huang (1998); 26 - Lancy e Tuovinen (1984); 27 - Cruz et al. (2017); 28 - Al-Mayah (2012); 29 - Dalponte et al. (2019); 30 - He, Hocking e Tsuziki (2012); 31 - Ammala et al. (2002); 32 - Zohar-Perez et al. (2003); 33 - Etchepare et al. (2015); 34 - Doherty et al. (2011); 35 - Vaija, Linko e Linko (1982)			

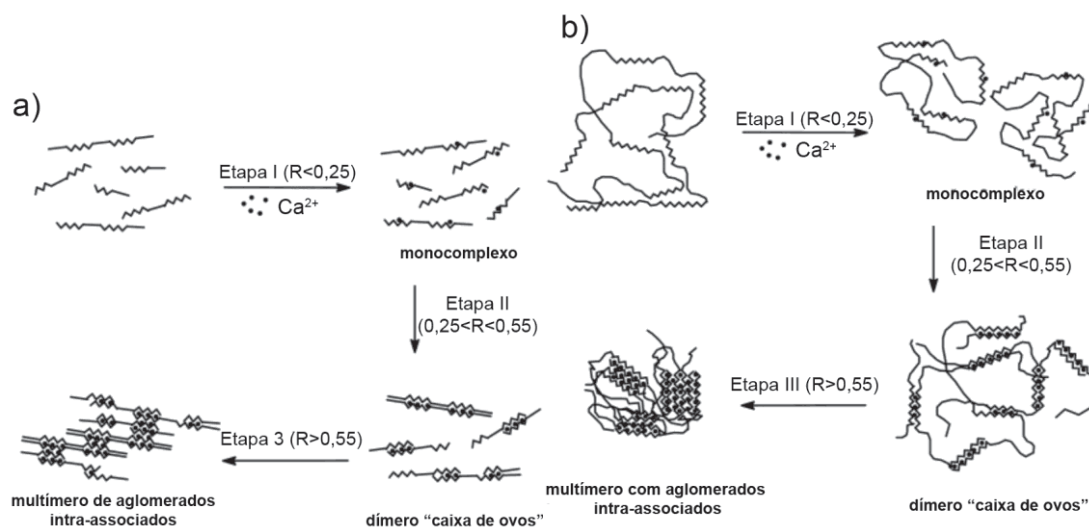
FIGURA 2.1 – INTERAÇÃO MOLECULAR DO ALGINATO E ÍON CÁLCIO REVELANDO DETALHES DA “CAIXA DE OVOS”



FONTE: Braccini e Pérez (2001).

A afinidade aumenta na ordem $Mg^{2+} << Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+}$, sendo que o Ca^{2+} é o mais utilizado. O ALG é um copolímero formado por unidades de guluronato, que é a porção mais reativa, e manuronato (FIGURA 2.2). O tamanho da cadeia influencia na formação dos complexos, já que cadeias maiores tem a possibilidade de interagir com porções dentro da própria molécula, enquanto cadeias curtas interagem apenas de forma intermolecular (FANG et al., 2007).

FIGURA 2.2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DURANTE A FORMAÇÃO DOS MONOCOMPLEXOS, DÍMEROS E MULTÍMEROS PARA a) CADEIAS CURTAS E b) LONGAS



FONTE: Adaptado de Fang et al. (2007).

O ALG, quando aplicado na microencapsulação, pode gerar tamanhos diferentes de esferas (500 μm – 3000 μm), dependendo do diâmetro interno da agulha utilizada para a extrusão, da distância entre a seringa e a solução de cloreto de cálcio ou de bário, e da própria concentração e viscosidade da solução de NaALG (ETCHEPARE et al., 2015). Diversas condições podem ser utilizadas para a produção do material (TABELA 2.2).

TABELA 2.2 – VARIÁVEIS DA PRODUÇÃO DAS ESFERAS DE HIDROGÉIS DE ALGINATO (continua)

Fator	Faixa de valores	Referência	Obs.
[ALG]	2,5 - 7,5 g/L	BLANDINO; MACÍAS; CANTERO, 1999	
	10 - 80 g/L	IDRIS; SUZANA, 2006	
	10 - 25 g/L	LOTFIPOUR; MIRZAEI; MAGHSOODI, 2012	
	15 - 30 g/L	DÉAT LAINÉ et al., 2012	
	20 g/L	TELLO et al., 2015	
	20 -100 g/L	VOO et al., 2016	Aquecida a 80 °C para baixar viscosidade
[Ca ²⁺]	10-40 g/L	LOTFIPOUR; MIRZAEI; MAGHSOODI, 2012	
	13-90 g/L	BLANDINO; MACÍAS; CANTERO, 1999	Carboximetilcelulose: 30 g/L para alterar a viscosidade. Gotejou a solução de Ca ²⁺ na de ALG

TABELA 2.2 – VARIÁVEIS DA PRODUÇÃO DAS ESFERAS DE HIDROGÉIS DE ALGINATO (continua)

Ânion	Cloreto, lactato e gluconato Carbonato e sulfato	LEE; ROGERS, 2012 LEONG et al., 2016	Solúveis em meio ácido
	Carbonato e sulfato Acetato, fosfato e carbonato	KUO; MA, 2001 RAMLI et al., 2016	
Cátion	FeCl ₃	HUANG et al., 2016	Interação com o ALG FeCl ₃ : 20 g/L > CaCl ₂ : 50 g/L
	Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Ca ²⁺ , Ba ²⁺ , Cu ²⁺ , Cd ²⁺ e Pb ²⁺ : 50 mM Ca ²⁺ : 1,5-6,0 mM; Sr ²⁺ : 1,5-6,0 mM; Ba ²⁺ 0,6-2,0 mM Sr ²⁺ ; Ca ²⁺ ; Ba ²⁺ ; Al ³⁺ ; Fe ³⁺ Ca ²⁺ ; Cu ²⁺ ; Co ²⁺ ; Mn ²⁺	OUWERX et al., 1998 CHEN; MYLON; ELIMELECH, 2007 YANG et al., 2013 WANG et al., 1993	A superfície das esferas com Ca ²⁺ é lisa, e com Cu ²⁺ é rugosa concentração necessária para esferificação: Ba ²⁺ << Sr ²⁺ < Ca ²⁺ Modulo de Young: Sr ²⁺ < Ca ²⁺ < Ba ²⁺ < Al ³⁺ < Fe ³⁺ Ca ²⁺ liga-se ao guluronato; Cu ²⁺ , Co ²⁺ e Mn ²⁺ ligam-se no manuronato também
	Al ³⁺ ; Ca ²⁺ ; Fe ²⁺ ; Cu ²⁺ ; Na ⁺	NAKAMURA et al., 1995	
D _{seringa}	8 mm	KAYGUZUS et al., 2016	Adição de surfactante
D _{agulha}	0,6 mm (20G) 0,413 mm (22G) 23G 25G e 30G 27G	DAVARCI et al., 2017 DÉAT LAINÉ et al., 2012 DÉAT LAINÉ et al., 2012 BOKKHIM et al., 2016 LOTFIPOUR; MIRZAEI; MAGHSOODI, 2012	
V _{gotejamento}	3 mL/h 6 mL/h 50 - 300 mL/h	NGUYEN; LAU; YANG, 2016 DAVARCI et al., 2017 DAVARCI et al., 2017	
t _{cura}	2 min 30 min 12 h 24 h	DÉAT-LAINÉ et al., 2012 IDRIS; SUZANA, 2006; NGUYEN; LAU; YANG, 2016; DAVARCI et al., 2017 YU et al., 2016 YU et al., 2016	esferas de 2,5 a 4,0 cm

TABELA 2.2 – VARIÁVEIS DA PRODUÇÃO DAS ESFERAS DE HIDROGÉIS DE ALGINATO (conclusão)

$T_{Ca^{2+}}$	ambiente	OZSEKER; AKKAYA, 2016	
	4 °C	KAYGUZUS et al., 2016	
	37 °C	IDRIS; SUZANA, 2006	
Altura	0 - 270 cm	DAVARCI et al., 2017	Selecionado 20 cm
Surfactante	Polietilenoglicol dodecileter: 3 até 30 mmol/L; Dodecilsulfato de sódio: até 400 mmol/L	KAYGUZUS et al., 2016	Adicionado ao ALG
	Polisorbato: 1 g/L;	DAVARCI et al., 2017	Adicionado ao CaCl ₂ juntamente com glicerol: 0-900 g/L para alterar a viscosidade.
Preparação do ALG	30 min de agitação 300 rpm, 40 °C por 90 min para retirar bolhas	BOKKHIM et al., 2016	
	1 h de agitação, 24 h de descanso	DAVARCI et al., 2017	
	1 h de agitação, 1000 rpm	VOO et al., 2016	

G: *Birmingham Gauge*, unidade de dimensão para agulhas.

[]: concentração

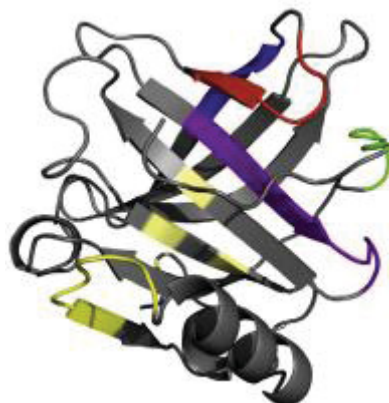
Quando o biopolímero de ALG interage eletrostaticamente com os policátions quitosana, polilisina e o WPI ocorre aumento da porosidade e da estabilidade da matriz. A mescla dos polímeros pode ser feita antes da extrusão, produzindo esferas homogêneas, ou depositando-se um sobre o outro, criando uma cobertura externa num processo chamado de *layer-by-layer*. Essa camada externa promove maior proteção do composto encapsulado (ETCHEPARE et al., 2015), como é o caso dos estudos de encapsulamento de microrganismos que relatam o uso de alginato como matriz de encapsulamento e recobrimento com quitosana (LEE; CHA; PARK et al., 2004) ou WPI (GBASSI, 2009).

2.1.2 Proteína isolada de soro de leite (WPI)

O WPI corresponde à mistura de proteínas globulares composta principalmente de β -lactoglobulina (FIGURA 2.3), que são isoladas do soro do

leite após a produção de queijo.

FIGURA 2.3 – REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA ESTRUTURA QUATERNÁRIA DA β -LACTOGLOBULINA



FONTE: Leeb et al. (2015).

Vários aspectos benéficos de seu uso têm sido descritos, controlar a mucoadesividade na porção do duodeno e inibir, em sinergia com o ALG, as atividades da α -quimotripsina e tripsina (DÉAT-LAINÉ et al., 2012). Além disso, o WPI induz a ativação do transportador de glicose GLUT-4 de maneira similar à ação da insulina, favorecendo a redução dos níveis glicêmicos (MORATO et al., 2013).

Outras funcionalidades incluem o efeito antioxidante, anti-inflamatório, anti-obesidade, antitumoral, imunomodulador, hipotensivo e hipoglicêmico (PATEL, 2015). Podem ser aplicadas no encapsulamento de fármacos e probióticos, na recuperação muscular pós-esforço e na osteo e dermatoproteção. Ainda, facilitam o tratamento da osteopenia causada por fenilcetonúria, já que contém uma pequena quantidade do aminoácido fenilalanina. Chen, Chen e Hsieh (2016) conseguiram precipitar até 28% da β -lactoglobulina presente no leite com adições de 1% de ALG de propilenoglicol, coacervando menores frações de outras proteínas como a albumina (16%) e as caseínas (2,3%).

Entretanto, o WPI contém alergênicos que podem ser removidos com um tratamento à base de tripsina. Infelizmente, a enzima degrada também alguns compostos bioativos e produz algumas substâncias que conferem amargor. Alguns tri a nonapeptídeos presentes no WPI foram identificados por cromatografia como causadores do amargor. Os peptídeos podem ser

removidos por ultrafiltração ou terem o sabor desagradável reduzido com o uso de mascarantes (PATEL, 2015).

Outra característica dessas proteínas, quando encapsuladas em hidrogéis de ALG de cálcio, é aumentar significativamente a sobrevivência de microrganismos, como o bacteriófago Felix O1. Tais bacteriófagos podem substituir antibióticos em produtos de origem animal. Porém, esses microrganismos não sobrevivem ao ambiente estomacal. Além da proteção contra as enzimas e a acidez do estômago, a adição das proteínas aumentou também a velocidade de liberação dos bacteriófagos no intestino (TANG et al., 2013).

Para a secagem destas matrizes de hidrogéis, a liofilização pode ser usada, já que preserva sua estrutura e os possíveis compostos encapsulados. Além disso, a evaporação da água leva a formação de poros, transformando o material em uma espuma que possui a vantagem de utilizar matérias-primas naturais e compatíveis com sistemas biológicos. A adição de ALG nas espumas de WPI melhora consideravelmente a resistência mecânica da cadeia, apesar de diminuir a estabilidade térmica a partir de 200 °C. Este efeito indesejado pode ser compensado com a adição de argila (CHEN; WANG; SCHIRALDI, 2013).

A liofilização, além da secagem por aspensão (*spray-drying*) e da liofilização por aspensão (*spray-freeze-drying*), também foi utilizada para preparar microcápsulas de WPI e beta-ciclodextrina contendo vanilina, a substância característica do aroma e sabor da baunilha. Análises de FTIR (*Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*) mostraram que não houve interação entre as matrizes e o composto encapsulado, o qual apresentou melhor estabilidade com a secagem por liofilização por aspensão (HUNDRE; KARTHIK; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015).

O aquecimento é normalmente utilizado para provocar a desestabilização termodinâmica das proteínas ao diminuir a energia de ativação do sistema e aumentar o número de colisões moleculares (BRYANT; MCCLEMENTS, 1998). A beta-lactoglobulina apresenta-se na forma de dímeros conectados por ligações de hidrogênio quando em condições fisiológicas. O rompimento desses dímeros acima de 40 °C representa a primeira etapa do processo de desnaturação 40 °C. Os monômeros mantêm o

grupo tiol (-SH) confinado no interior da estrutura terciária estabilizada por duas ligações dissulfídicas (Cys66–Cys160 e Cys106–Cys119). A segunda etapa acontece acima de 60 °C, com a exposição dos grupos hidrofóbicos e consequente atração e agregação das partículas (RAMOS et al., 2014).

2.2 APLICAÇÕES DE HIDROGÉIS

2.2.1 Alimentos

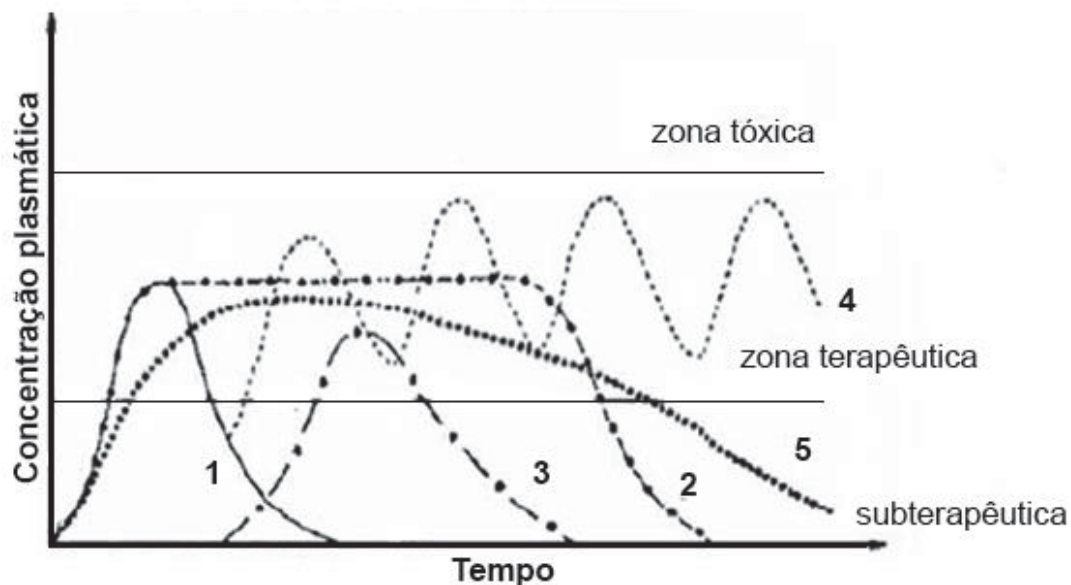
Quando na forma de micropartículas, o tamanho dos hidrogéis deve ser de aproximadamente 100 µm para evitar um impacto sensorial negativo em alimentos. A extrusão por aspersão da solução polimérica favorece a obtenção de partículas com diâmetros menores (ETCHEPARE et al., 2015) em comparação com a extrusão num sistema seringa-agulha, onde as esferas são produzidas em tamanho macroscópico para aplicações como, por exemplo, a gastronomia molecular (LEE; ROGERS, 2012).

Outra propriedade do ALG e o WPI é a saciedade provocada por bebidas contendo os materiais. Uma escala visual analógica foi utilizada para avaliar a saciedade de voluntários por um período de 4 h após a ingestão de bebidas de alta e baixa viscosidade contendo os biopolímeros. Os resultados sugerem que a viscosidade tem considerável influência na saciedade, e que o WPI é mais efetivo que o ALG para esse fim quando suas soluções de mesma viscosidade são comparadas (SOLAH et al., 2010).

2.2.2 Liberação controlada

A liberação controlada é uma tecnologia que permite levar um princípio ativo até determinada região do corpo para ser liberado e absorvido. Pode ser classificada de acordo com o perfil temporal de concentração plasmática do fármaco administrado (FIGURA 2.4) (MAURO, 2007). Um exemplo de tecnologia em desenvolvimento é a liberação de insulina no intestino delgado, protegendo a proteína das enzimas proteolíticas estomacais (CENDON et al., 2018).

FIGURA 2.4 – CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE MEDICAMENTOS DE LIBERAÇÃO: 1) CONVENCIONAL, 2) SUSTENTADA, 3) RETARDADA, 4) REPETIDA E 5) PROLONGADA



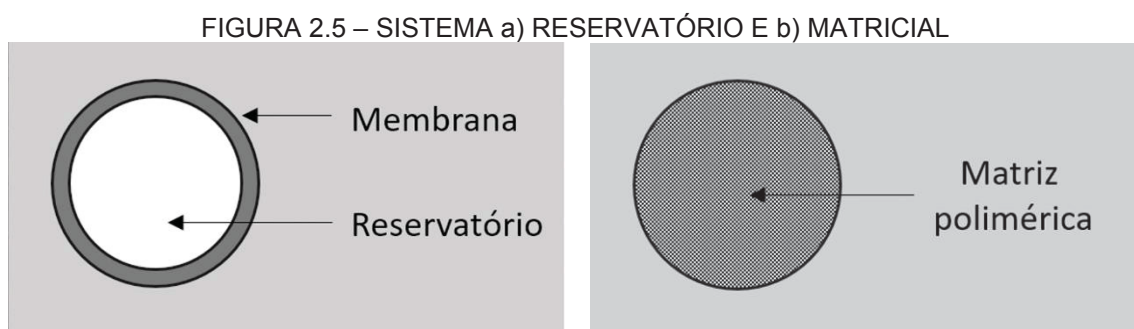
FONTE: Adaptado de Veiga (1988).

A liberação convencional é representada pelos comprimidos desintegráveis, mastigáveis, efervescentes, sublinguais e bucais. Apresentam rápida absorção e um pico plasmático. A liberação sustentada caracteriza-se por uma rápida absorção inicial para atingir a concentração plasmática desejada seguida da manutenção do nível desejado de 8 a 12 h. O sistema de liberação retardado serve para proteger o estômago de fármacos irritantes para a mucosa e preservar o princípio-ativo do suco gástrico, principalmente nos casos onde a absorção é favorecida na região intestinal. Neste caso, os comprimidos de revestimento entérico, que contém uma camada externa resistente ao meio estomacal e degradável no intestino, podem ser utilizados. A liberação repetida é utilizada na administração de compostos que atuam em doses baixas e são excretados rapidamente pelo organismo, conferindo a liberação de uma segunda ou até terceira dose de 4 a 6 h após a ingestão. Finalmente, a liberação prolongada disponibiliza uma dose inicial rápida e, após, uma segunda dose chamada “de manutenção”, a qual é liberada gradualmente para manter o nível plasmático obtido pela primeira dose (MAURO, 2007).

Dentre as vantagens da liberação controlada em comparação com a convencional estão a diminuição da variação da concentração plasmática do medicamento, da frequência das doses, dos efeitos colaterais observados e um

aumento da adesão ao tratamento. Algumas das desvantagens são a variabilidade de fatores fisiológicos como o pH e a velocidade de trânsito do trato gastrointestinal, a atividade enzimática e a gravidade da doença tratada, além de haver a possibilidade de as partículas se alojarem em alguma região do sistema digestivo provocando irritação da mucosa devido à alta concentração do fármaco no local (MAURO, 2007).

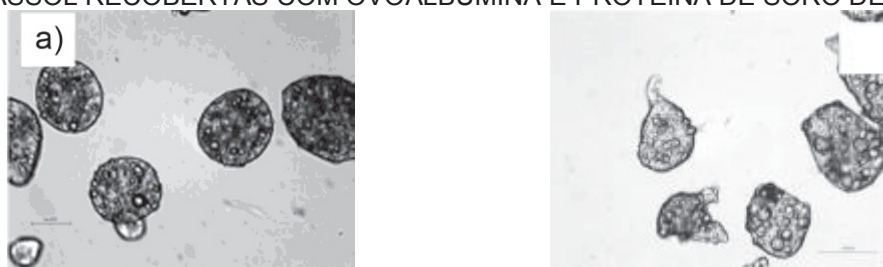
A organização desses compostos pode gerar sistemas reservatório (FIGURA 2.5), onde um reservatório contendo apenas o princípio ativo é protegido por uma membrana externa, e sistemas matriciais, onde a velocidade de liberação é controlada pela difusão do composto através da matriz polimérica sem a presença de camadas externas (MAURO, 2007).



FONTE: Adaptado de Fialho e Cunha (2007).

Um exemplo de sistema reservatório é o recobrimento de esferas de ALG e pectina (FIGURA 2.6) contendo óleo de girassol com proteínas globulares, como a do soro de leite e a albumina. Em ambas as imagens, podem ser observadas a presença do óleo encapsulado e da cobertura de proteínas, além de que o ALG permitiu uma maior esfericidade das partículas do que a pectina, o que é benéfico pela obtenção de esferas com propriedades geométricas similares (TELLO et al., 2015).

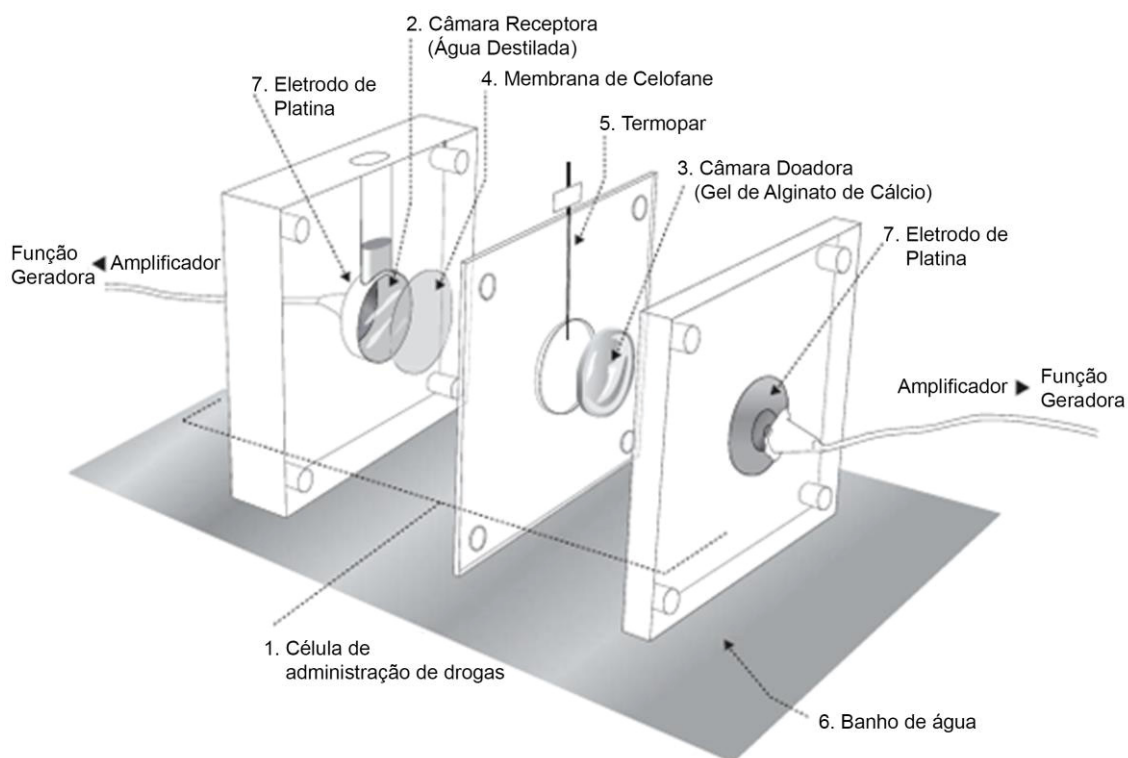
FIGURA 2.6 – PARTÍCULAS DE a) ALGINATO E b) PECTINA CONTENDO ÓLEO DE GIRASSOL RECOBERTAS COM OVOALBUMINA E PROTEÍNA DE SORO DE LEITE



FONTE: Tello et al. (2015).

Os hidrogéis de ALG também já foram utilizados como eletrodos para a administração cutânea via iontoforese de lidocaína, a qual possui efeito analgésico. O material foi escolhido devido a sua bioadesividade, segurança para aplicações biológicas e baixo custo. O sistema construído para o experimento conta com uma câmara para a inserção do gel carregado e outra para a recepção do fármaco, na qual água destilada foi inserida (FIGURA 2.7). Os pulsos de corrente alternada aumentaram a difusão da lidocaína em até 70% em relação à difusão passiva. Houve um pequeno aumento na temperatura e no pH do polímero, o qual não é suficiente para causar queimaduras térmicas ou químicas (HAIDA et al., 2012).

FIGURA 2.7 – ESQUEMA DO SISTEMA UTILIZADO PARA A IONTOFORESE DE LIDOCAÍNA EM HIDROGÉIS DE ALGINATO DE CÁLCIO



FONTE: Adaptado de Haida et al. (2012).

2.2.3 Encapsulamento de extrato de erva-mate

Ao extrapolar o conceito de liberação controlada da área da farmácia para a de alimentos, processos podem ser propostos para a preservação de propriedades funcionais de alimentos durante a produção, o armazenamento e durante a digestão. Alguns estudos sobre o encapsulamento do extrato da

erva-mate têm sido publicados recentemente com sacarídeos como o ALG, quitosana, amido, goma arábica, oligofrutose e combinações destes como matriz de encapsulamento (ANBINDER et al., 2011; DELADINO et al., 2013; LÓPEZ-CÓRDOBA et al., 2014; PILATTI-RICCIO et al., 2019).

Ilex paraguariensis (Saint Hilaire, *Aquifoliaceae*) é uma planta natural da América do Sul. A infusão de suas folhas e palitos picados resulta num chá chamado "Mate" (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007). Essa bebida tem um papel social e quase ritualístico para grandes populações da América do Sul (BRACESCO et al., 2011). O consumo chega a mais de 1 litro de chá por dia para cerca de 30% da população do Paraguai, Uruguai, Nordeste da Argentina e Sul do Brasil (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007). Além disso, seu consumo tem crescido em países europeus, como a Espanha (MATEOS et al., 2008).

Infelizmente, o mate tem um gosto amargo intenso, o que não agrada a todos. Nesse sentido, o encapsulamento de seu extrato pode aumentar o número de consumidores. Isso é especialmente importante porque o extrato de erva-mate apresenta maior atividade antioxidante do que as bebidas usuais, como vinho tinto, rosa ou branco, suco de laranja e chá preto, sendo superado apenas pelo chá verde (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007).

Os principais componentes do extrato de mate são ácido clorogênico (42%), galocatequina (21%), ácido-4,5-dicafeoilquínico (11%), ácido gálico (11%), epicatequina (5%), cafeína (8%) e teobromina (2%) (BRACESCO et al., 2011). Além disso, os extratos de folhas não torradas contêm alcaloides purínicos (metilxantinas), flavonoides, vitaminas (complexo A, B, C e E), taninos, ácido clorogênico e seus derivados e saponinas. É por isso que os efeitos do mate na promoção da saúde e como coadjuvantes no tratamento de doenças têm sido descritos, incluindo estudos *in vitro* e *in vivo* como atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e de redução da concentração sanguínea de lipídeos. A infusão de folhas torradas de mate, que também é consumida em outras regiões do Brasil, apresenta essencialmente os mesmos componentes da matéria-prima (MESÍAS; DELGADO-ANDRADE, 2017). O processo ainda gera melanoidinas, que apresentam atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-hipertensiva e prebiótica.

Alguns mecanismos de absorção dos compostos da erva-mate têm sido descritos em porções específicas do sistema digestivo. Por exemplo, os ácidos hidroxicinâmicos são transformados em ácido cafeico no intestino delgado e no cólon pelas esterases celulares e microbianas, respectivamente, e o ácido é então absorvido pelo epitélio intestinal (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007). A microencapsulação é capaz de controlar a deterioração por agentes potencialmente nocivos, como temperatura, luz, pH, pressão e exposição ao oxigênio (LÓPEZ-CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2014) durante o processamento, armazenamento ou enquanto os compostos sensíveis estão viajando através do sistema gastrointestinal. Nos estudos anteriores onde o extrato da erva-mate foi encapsulado em ALG, a liberação da maior parte dos compostos ocorreu no ambiente ácido do estômago (DELADINO et al., 2008; LÓPEZ-CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2014).

2.2.4 Filmes

Recentemente, filmes de biopolímeros têm sido utilizados para aumentar a vida de prateleira de alimentos em substituição aos filmes baseados em derivados de petróleo, que apresentam toxicidade e não são biodegradáveis (HAMED et al., 2021). Novos materiais biopoliméricos foram e continuam a ser desenvolvidos para aplicação como filmes, principalmente biopolímeros de origem marinha, como a quitosana e o alginato, ou da agricultura, como o amido de milho ou de batata (SUNTHAR et al., 2020).

Filmes de WPI contendo óleo de orégano, que é um composto antimicrobiano, foram aplicados em carne bovina para inibir o desenvolvimento das bactérias lácticas (PATEL, 2015). A película envoltória de linguiças também pode ser produzida com ALG, sendo que a adição de pequenas concentrações de proteínas como as do soro do leite, da soja e a gelatina não altera as propriedades mecânicas e óticas do compósito. A gelatina foi a proteína que mais aumentou a retenção de água nos filmes, aumentando também a transparência e a elasticidade (HARPER et al., 2013).

2.2.5 Ambiental

Os biopolímeros podem ser empregados na área ambiental de diversas formas. A capacidade de adsorção é relevante, sendo usados desde a remoção de corantes (DALPONTE et al., 2016) até metais pesados (WANG; LU; LI, 2016). Resíduos da agricultura podem ser utilizados como estruturantes nos hidrogéis, sejam processados, como a sílica extraída de sabugo de milho para aplicação em adsorção (SHIM et al., 2014), ou *in natura*, como o próprio sabugo triturado para uso na construção civil como isolante térmico (PALUMBO; FORMOSA; LACASTA, 2015). Estudos anteriores usando termogravimetria mostram que os dois biopolímeros têm boas propriedades de retardo de chama e baixa emissão de fumaça, sendo potenciais substitutos dos tradicionais retardantes de chama, que são tóxicos e não renováveis (ZHANG et al., 2012; BOSCO et al., 2013).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS

2.3.1 Comportamento ótico

A transparência é desejável para certas aplicações de hidrogéis, como o tratamento de efluentes por foto-oxidação (DALPONTE et al., 2019) e a produção de curativos. Neste último caso, permite uma avaliação clínica visual da regeneração do tecido, mantendo a umidade do tecido e controlando a liberação de drogas como antibióticos, vitaminas, minerais ou fatores de crescimento (BOATENG et al., 2008). Por outro lado, alguns metais como o zinco e o titânio são utilizados em cosméticos como os protetores solares, devido à sua capacidade de proteção contra a radiação UVA e UVB, respectivamente (SMIJS; PAVEL, 2011). Sua incorporação em partículas biopoliméricas pode evitar os efeitos adversos de uma longa exposição cutânea a essas frequências.

Apesar do fato de que várias aplicações podem ser listadas para as quais as características de transparência (HE; HOCKINGS; TSUZUKI, 2012; AMMALA et al., 2002; DALPONTE et al., 2019) ou opacidade (ZOHAR-PEREZ et al., 2003; SMIJS; PAVEL, 2011; CAVALLARO et al., 2013) são importantes

(no que diz respeito às regiões de absorção de luz UV ou visível), não foram encontradas informações sobre a influência dos sais de cátions divalentes na absorbância por esferas ALG ou WPI no espectro UV-visível. Da mesma forma, nenhuma menção é encontrada sobre o efeito do contração de cátions divalentes na transparência, rigidez e absorção de água durante a reticulação iônica, apesar do fato de que alguns contrações de cátions divalentes, como o cloreto, irritam a pele e o trato gastrointestinal (GREENWALD, 1938) e, portanto, precisam ser substituídos.

2.3.2 Comportamento mecânico

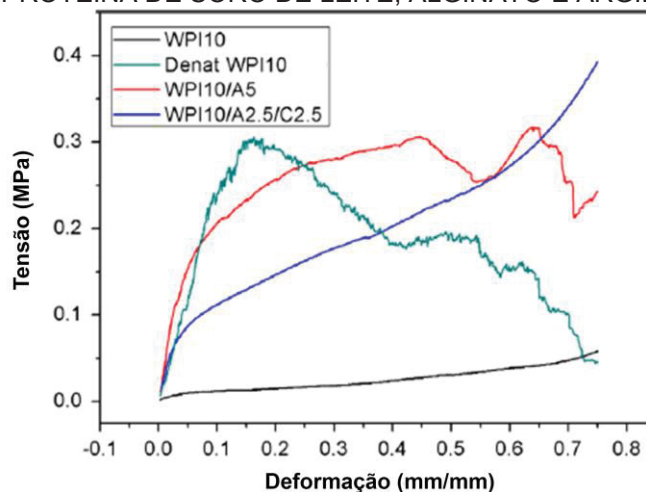
A resistência mecânica das esferas para liberação de fármacos com uso em administração oral apresenta alguns aspectos relevantes, como a manipulação das esferas durante os procedimentos de preparação e administração pelo paciente. O próprio consumo gastronômico do hidrogel também deve respeitar características de mastigabilidade que podem ser avaliadas através do uso de texturômetro, refletindo suas características mecânicas, inclusive adicionais como tensão, adesão, fratura, flexão, corte, cisalhamento, compressão, penetração e extrusão. No caso específico abordado, a resistência à mastigação, estimada pela tensão máxima, e a facilidade de extrusão são as características mais relevantes.

O estudo de películas de compósitos do ALG com a gelatina, com o WPI e com as proteínas da soja, aplicados como envoltório de linguiça, é um exemplo de caracterização mecânica. A tensão (1,44 - 2,02 MPa) e o alongamento (81,6 - 95,0 %) máximos observados antes da ruptura, além do trabalho (9,9 - 40,1 N.mm) e da distância (10,6 - 17,7 mm) máximas antes da perfuração foram avaliadas (HARPER et al., 2013).

A análise de espumas poliméricas de WPI permitiu observar que a compressão máxima suportada aumenta consideravelmente com a adição de ALG ou com o aumento na concentração proteica da matriz. Ainda, é possível observar o comportamento da tensão necessária para causar determinadas deformações (*Stress vs. Strain*) em matrizes de proteína natural (WPI10), desnaturadas (*Denatured* WPI10), com adição de ALG (WPI10/A5) e com

adição de ALG e argila (WPI10/A2.5/C2.5) (FIGURA 2.8) (CHEN; WANG; SCHIRALDI, 2013).

FIGURA 2.8 – DIAGRAMA DE TENSÃO E DEFORMAÇÃO DE ESPUMAS DE HIDROGEIS DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE, ALGINATO E ARGILA



FONTE: Adaptado de Chen, Wand e Schiraldi (2013).

Esferas de ALG deformam-se plasticamente a partir de 50% de deformação do seu diâmetro original, e a rigidez das esferas aumenta com o aumento da concentração do NaALG utilizado, da concentração do íon reticulante, da afinidade entre o íon utilizado e o ALG, e da razão entre ácido gulurônico e manurônico na cadeia de ALG. Em ensaios de deformação a altas velocidades e em esferas de ALG submersas em água, o valor do módulo de Young relatado na literatura encontra-se entre 250 e 900 kPa (CHAN et al., 2011). Hidrogéis de misturas de ALG e WPI desnaturado na forma de uma pasta formada pela trituração do material apresentaram valores entre 170 e 1240 kPa (LEON et al., 2016).

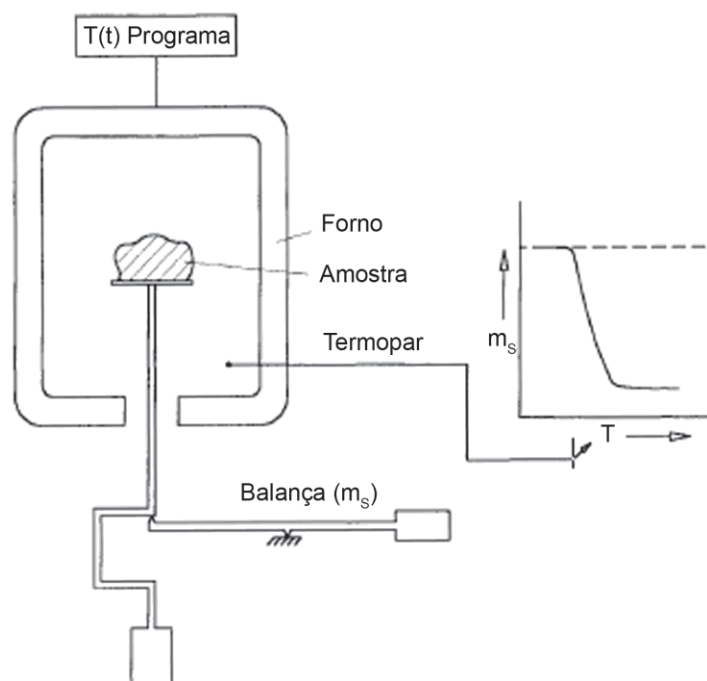
Além do reconhecimento da textura dos alimentos ser predominantemente influenciado pela compressão do alimento contra o palato duro (HEATH; PRINZ, 1999), esta é uma forma de pessoas idosas evitarem a mastigação, público para o qual são necessários alimentos macios (ISHIHARA et al., 2012). Alimentos gelificados para idosos são avaliados geralmente em deformações de 18 a 28% (ROTHENBERG; WENDIN, 2015).

2.3.3 Termoestabilidade

As técnicas que descrevem e elucidam as alterações em uma determinada propriedade de uma amostra de acordo com um comportamento da alteração da temperatura pré-determinado e a pressão constante são chamadas de análises térmicas. A temperatura pode ser alterada em relação ao tempo através de funções lineares, de degrau, modulares (com frequência e amplitude constantes) ou pode ser apenas observada controlando-se outros parâmetros, como o calor trocado. A Termogravimetria, ou Análise Termogravimétrica (TGA), é o nome da técnica utilizada quando a propriedade observada em função das alterações na temperatura é a massa (GALLAGHER, 1998).

O equipamento de TGA consiste em uma balança, um forno e um termopar (FIGURA 2.9).

FIGURA 2.9 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO EQUIPAMENTO PARA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA



FONTE: Adaptado de Gallagher (1998).

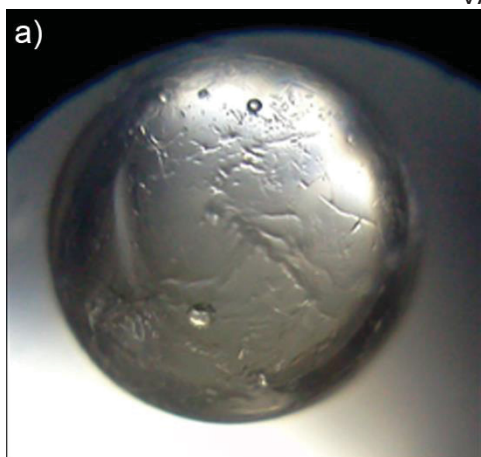
Conhecer a termoestabilidade dos hidrogéis é essencial para a operação de secagem (TANG et al., 2013), bem como para compreender sua interação com as substâncias encapsuladas com o estudo de sua pirólise

(ZHAO et al., 2013). No caso do consumo das esferas na forma hidratada, não há necessidade dessa operação unitária, evitando a degradação do princípio ativo protegido devido ao estresse de exposição térmica (WALTERS et al., 2014). Mesmo assim, precauções adicionais são exigidas para evitar a biodegradabilidade durante a estocagem (KAMATH; PARK, 1993).

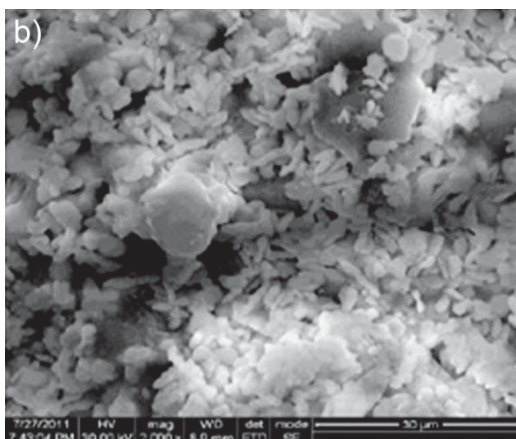
2.3.4 Morfologia

O aspecto morfológico das esferas de biopolímeros revela aspectos de continuidades e eventuais tamanhos de poros dependendo do grau de ampliação usada e do tipo de materiais. A microscopia ótica (FIGURA 2.10 - esquerda) pode revelar os detalhes do perfil de concentração de compostos coloridos em hidrogéis incolores. A microscopia eletrônica pode revelar outros aspectos morfológicos, como aspecto superficial no caso da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV – FIGURA 2.10 - direita) e das porções profundas na Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (WATT, 1997).

FIGURA 2.10 – ESFERA DE ALGINATO FOTOGRAFADA a) EM MICROSCOPIA ÓTICA E b) DE ALGINATO COM AMIDO FOTOGRAFADA EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA



FONTE: O autor (2016).

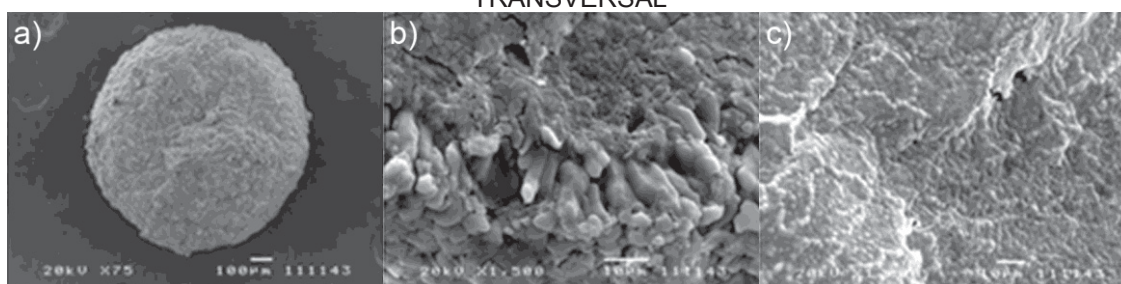


FONTE: Mary e Sasikumar (2015).

A porosidade de um material particulado se caracteriza pela quantidade de espaços vazios existentes no seu volume total (CHESSON; GARDNER; WOOD, 1997; BEZERRA et al., 2013). A configuração e disposição dos poros de partículas de hidrogéis pode ser caracterizada através da MEV.

Esferas de ALG e quitosana, quando observadas em microscópio eletrônico de varredura (FIGURA 2.11), apresentam uma superfície constituída por partículas poliédricas alongadas no sentido radial formando uma casca, que resulta do primeiro contato da esfera com a solução reticulante. A estrutura interna apresenta partículas menores em um arranjo mais compacto (FINOTELLI et al., 2010).

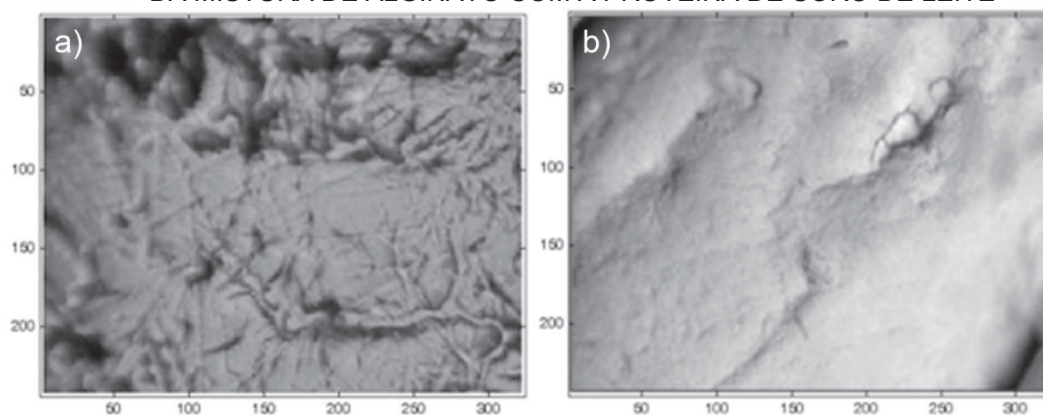
FIGURA 2.11 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ESFERAS DE ALGINATO E QUITOSANA: a) ESFERA INTEIRA, b) SUPERFÍCIE E c) SEÇÃO TRANSVERSAL



FONTE: Finotelli et al. (2010).

A incorporação de uma solução de WPI desnaturado torna mais lisa a superfície das esferas de ALG preparadas através do gotejamento em soluções de cloreto de cálcio (FIGURA 2.12) comparando-se com a superfície rachada e rugosa que é formada quando o polissacarídeo é usado de forma isolada. A rugosidade da superfície das partículas facilita a absorção de líquidos (WICHCHUKIT et al., 2013).

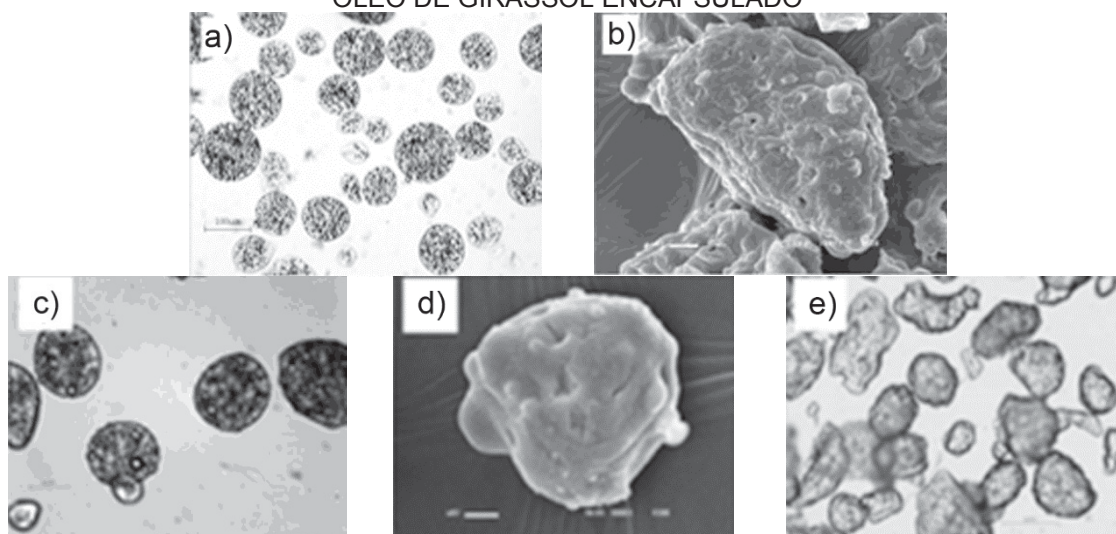
FIGURA 2.12 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓTICA DE ESFERAS a) DE ALGINATO E b) DA MISTURA DE ALGINATO COM A PROTEÍNA DE SORO DE LEITE



FONTE: Wichchukit et al. (2013).

O encapsulamento de óleo de girassol em partículas de ALG e WPI permite observar que a adição da proteína diminui a esfericidade das partículas (FIGURA 2.13). Por outro lado, aqui também é possível observar que a superfície das esferas se torna mais lisa. A redução na porosidade interfere no processo de reidratação, não conferindo o formato esférico original às partículas (TELLO et al., 2015).

FIGURA 2.13 – IMAGENS DE ESFERAS DE ALGINATO ANTES (ACIMA) E DEPOIS DE RECOBRIMENTO COM PROTEÍNA ISOLADA DE SORO DE LEITE (ABAIXO) CONTENDO ÓLEO DE GIRASSOL ENCAPSULADO



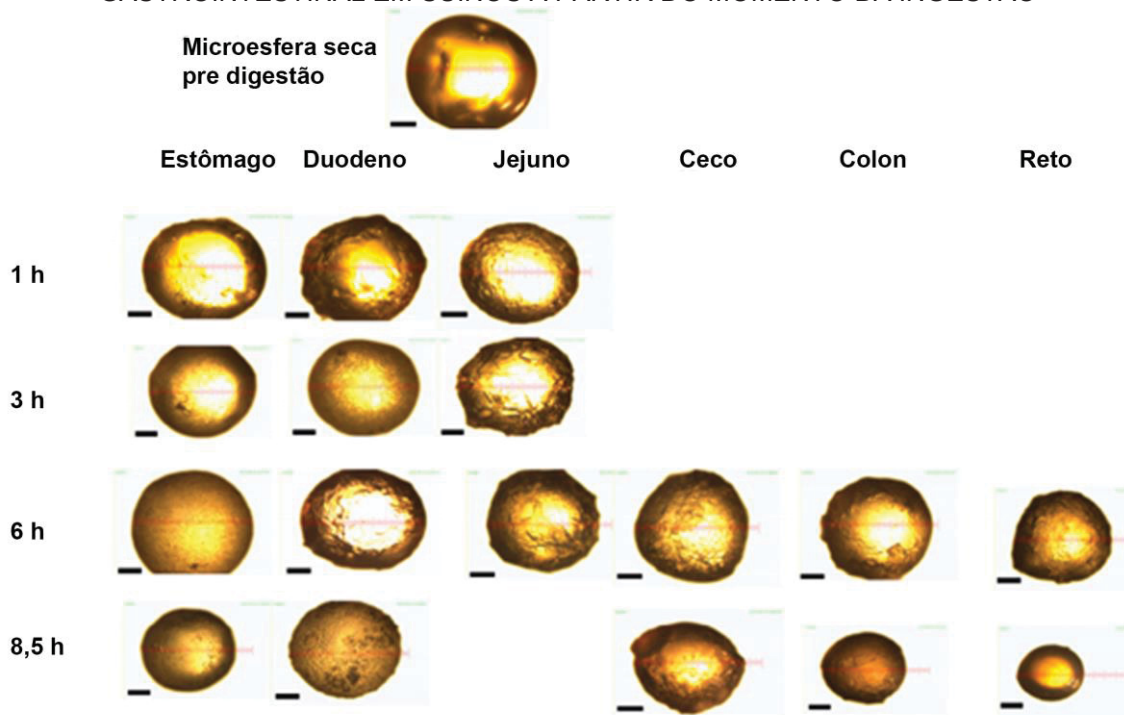
FONTE: Tello et al. (2015).

- a) e c) esferas úmidas (microscopia ótica);
- b) e d) esferas liofilizadas (microscopia eletrônica de varredura);
- e) esferas reidratadas (microscopia ótica)

Apenas após 1 h da administração oral de hidrogéis de WPI contendo riboflavina em suínos, observou-se a presença das partículas no estômago, no duodeno e no jejuno (FIGURA 2.14). A pepsina não parece acelerar a deterioração das microesferas e das proteínas desnaturadas, de acordo com a observação do material em microscópio ótico. Após 8 h e 30 min ainda haviam algumas esferas no estômago e em até 6 h elas não sofreram degradação, exceto pelo aparecimento de pequenas rachaduras após a terceira hora. Devido à alteração no pH e à ação enzimática, um aumento na rugosidade e na porosidade das partículas presentes no duodeno e no jejuno já pode ser observada na primeira hora após a ingestão. Após 6 h são encontradas partículas também no ceco, no cólon e no reto. Apenas após 8 h e meia podem ser observadas alterações significantes no diâmetro das esferas em todas as seções do trato gastrointestinal (O'NEILL et al., 2015). Isto reforça a

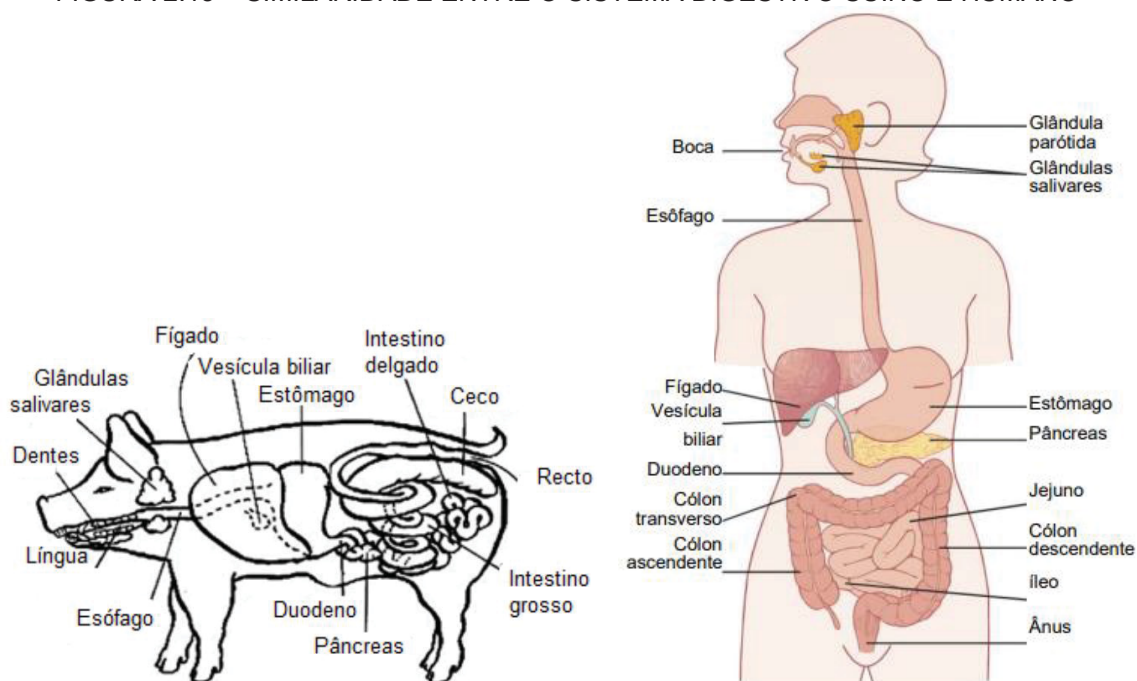
importância de desenvolvimento de produtos com base de hidrogéis para saúde humana que tem um trato digestivo com boa similaridade aos suínos (FIGURA 2.15).

FIGURA 2.14 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓTICA DE ESFERAS DE PROTEÍNA ISOLADA DE SORO DE LEITE CONTENDO RIBOFLAVINA DURANTE O TRÂNSITO GASTROINTESTINAL EM SUÍNOS A PARTIR DO MOMENTO DA INGESTÃO



FONTE: Adaptado de O'Neill et al. (2015).

FIGURA 2.15 – SIMILARIDADE ENTRE O SISTEMA DIGESTIVO SUÍNO E HUMANO



FONTE: Alves et al. (2013).

FONTE: Guyton e Hall (2006).

2.3.5 Liberação gastrointestinal *in vitro*

A simulação artificial do ambiente gastrointestinal é importante para avaliar a resistência de compostos sensíveis durante a digestão. Sem essa ferramenta, seriam necessários métodos *in vivo*. Em humanos, os métodos de análise do conteúdo gastrointestinal podem ser mais invasivos, como a aspiração do conteúdo estomacal e intestinal, ou menos, como uma ressonância magnética. Em animais, geralmente é necessária ou o sacrifício do animal ou a instalação cirúrgica de cânulas para a sucção do conteúdo gastrointestinal. Devido aos altos custos associados a testes clínicos em humanos, ao fato de a importância de modelos animais para compreender a digestão humana ter sido regularmente questionada e às questões éticas envolvidas, modelos *in vitro* têm sido usados por décadas para simular a digestão humana (BRODKORB et al., 2019).

Uma forma simples de simular os ambientes gástrico e intestinal é utilizando soluções tampão de pH ácido (gástrico) e neutro (intestinal) (CENDON et al., 2018). Para uma simulação mais próxima da realidade, é necessário adicionar as enzimas e sais presentes nas diferentes etapas da digestão. Madureira et al. (2015), por exemplo, investigaram a sobrevivência de probióticos em uma matriz contendo soro de leite submetida a um ambiente *in vitro* simulando a boca, o estômago e o duodeno para estimar o potencial de desenvolvimento desses probióticos quando atinjam seu destino, o cólon. Por sua vez, Avendaño-Pérez et al. (2015) simularam as seções ascendente, transversa e descendente do cólon para estudar as interações da *Salmonella enterica* com outras bactérias presentes no intestino grosso. Verruck et al. (2020) juntou esses dois protocolos ao analisar a capacidade de *Bifidobacterium* BB-12 evitar a colonização do intestino grosso por *Escherichia coli*, observando o sistema gastrointestinal em quase sua totalidade.

2.3.6 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Os compostos fenólicos (que possuem pelo menos uma hidroxila conectada a um anel aromático) com propriedades antioxidantes podem ser encapsulados para liberação controlada (HORZIC et al., 2009). Eles têm sido

de grande interesse devido aos efeitos benéficos na saúde humana devido à sua atividade antioxidante (AA), reduzindo a presença de radicais livres no organismo e prevenindo ou postergando o desenvolvimento de doenças não-transmissíveis como doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose, hipercolesterolemia, câncer e artrite (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZMAN, 2013). A quantificação desses compostos em alimentos foi iniciada por Folin e Denis (1912) com a proposição de um reagente contendo fosfotungstato e fosfomolibdato para a quantificação de tirosina, que é um aminoácido fenólico, através do aumento da intensidade da cor azul, que é resultado da redução do Mo^{4+} para Mo^{5+} . O método foi posteriormente adaptado por Folin e Ciocalteu (1927) pela adição de sulfato de lítio e o aumento da proporção de molibdato para evitar a formação de um precipitado branco que atrapalhava a avaliação colorimétrica.

Existem muitos tipos de testes de AA, cada um relacionado à geração de um diferente radical que tem sua concentração aferida depois de um determinado tempo de reação com a amostra de antioxidantes em condições padronizadas. A neutralização do radical é indicativo da AA da amostra investigada (RE et al., 1999). Ao se analisar a AA, a grande variação entre as metodologias e a falta de uma interpretação simples da AA impede uma conclusão direta (DESTRO; JORGE; MATHIAS, 2020).

No método de avaliação da AA que se baseia na neutralização do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) dissolvido em metanol (BRAND-WILLIAMS; CURVELIER; BERSET, 1995). O radical possui um elétron desemparelhado que resulta na cor violeta quando em solução. Por isso, a absorbância a 515 nm é monitorada, sendo que a medida que o radical é neutralizado pelos antioxidantes presentes na amostra, a absorbância diminui.

Outro método conta com a geração do radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)6-ácido sulfônico (ABTS), sendo necessário reagir sua forma estável com persulfato de potássio, gerando um radical verde azulado com máximos de absorção em 415 nm, 645 nm, 734 nm e 815 nm (RE et al., 1999). Da mesma forma que para o DPPH, a neutralização do radical leva à diminuição da absorbância. O Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), que é um análogo solúvel em água da vitamina E, pode ser usado como antioxidante padrão para comparação.

Os métodos de Folin-Ciocalteu e do reagente DPPH podem ser aplicados para a quantificação de antioxidantes hidrofílicos, enquanto o ABTS também quantifica compostos e lipofílicos (FLOEGEL et al., 2011; GUPTA, 2015). Apesar dos reagentes DPPH e ABTS não serem radicais presentes no metabolismo humano, são bons identificadores de possível AA *in vivo*, a qual deve ser confirmada posteriormente (GRANATO et al., 2018).

Dentro do exposto, este estudo irá comparar hidrogéis de proteína de soro de leite e de alginato através da caracterização da resistência mecânica, térmica, da absorção de radiação ultravioleta e de luz visível, e da simulação do uso dos dois biopolímeros para encapsular e liberar os compostos fenólicos do extrato da erva-mate em cada etapa do sistema gastrointestinal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Alginato de sódio (NaALG), lactato e gluconato de cálcio (CaLac e CaGluc) (GastronomyLabs, Brasil), proteína isolada de soro de leite (WPI, Davisco, USA), cloreto de manganês ($MnCl_2$), nitrato e cloreto de cálcio ($Ca(NO_3)_2$ e $CaCl_2$), nitrato de chumbo ($Pb(NO_3)_2$), cloreto de níquel ($NiCl_2$) (Vetec, Brazil) e nitrato de estrôncio ($Sr(NO_3)_2$) (Merck, Germany), cloreto de cobre ($CuCl_2$) (Biotec, Brazil), cloreto de zinco ($ZnCl_2$) (Impex, Brazil), cloreto de cádmio ($CdCl_2$) (Carlo Elba, Brazil) e cloreto de cobalto ($CoCl_2$, Nuclear, Brazil) foram empregados na produção das esferas. Os reagentes foram utilizados em sua forma original.

A massa molar média do NaALG utilizado foi avaliada usando a equação de Mark-Houwink (Equações 3.1 e 3.2), envolvendo a viscosidade de soluções (20 a 300 mg/100mL) de NaALG (Brookfield, DV-II, USA). A viscosidade reduzida (μ_{red}) é calculada através da viscosidade da solução (μ) a uma determinada concentração (C) e da viscosidade do solvente (μ_s , solução 0,1 M de NaCl a 25 °C, 0,91 cP, OZBEK; FAIR; PHILLIPS, 1977). A curva de μ_{red} em relação a C é extrapolada para C = 0 para encontrar a viscosidade intrínseca ($[\mu]$) e a massa molar (M) usando os fatores relativos ao ALG ($k = 0,000073$ e $a = 0,92$) (FIGUEIRA; HOTZA; BERNARDIN, 2014).

$$\mu_{red} = \frac{\mu - \mu_s}{\mu_s \cdot C} \quad \text{Equação 3.1}$$

$$[\mu] = \lim_{C \rightarrow 0} \mu_{red} = k \cdot M^a \quad \text{Equação 3.2}$$

A razão M/G (β -D-manuronato / α -L-guluronato) do ALG foi estimada utilizando FTIR (Bruker, Vertex 70, Germany, 1125 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} correspondendo a M e G, respectivamente) (FIGUEIRA; HOTZA; BERNARDIN, 2014).

As folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) utilizadas para a preparação do extrato de erva-mate (EXT) foram coletadas no município de

Ivaí (Paraná), secas em micro-ondas por 6 min (umidade final de 5%), trituradas em liquidificador comercial e peneiradas (100 mesh).

Todas as enzimas e sais biliares bovinos empregados na simulação da digestão gastrointestinal foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA). As soluções enzimáticas foram preparadas na hora e esterilizadas em filtro de membrana de 0,22 μm (MF-Millipore, Billerica MA, EUA).

Os seguintes reagentes utilizados para as análises de AA foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA): ácido gálico (97,5%), reagente de Folin-Ciocalteu, Trolox, DPPH e ABTS.

3.2 EFEITO DO USO DE DIFERENTES CÁTIOS DIVALENTES

3.2.1 Produção das esferas

O procedimento de encapsulamento foi adaptado de Déat-Lainé et al. (2012). As soluções salinas (100 mM), exceto para o CaGluc (77 mM, solução saturada, O'NEIL, 2001), e dos biopolímeros (NaALG: 30 g.L⁻¹ ou WPI: 110 g.L⁻¹) foram preparadas com água destilada. Os biopolímeros foram homogeneizadas por 1 h em agitador magnético (Nova Ética 114, Brasil). A solução de WPI foi deixada em repouso por 2 h e, então, submetida a tratamento térmico (80 °C) no mesmo agitador magnético por 40 min para desnaturar termicamente suas proteínas e, posteriormente, mantida à temperatura ambiente durante 24 h (DÉAT-LAINÉ et al., 2012).

As soluções de biopolímeros condicionadas em seringas de polipropileno com agulha 26G (diâmetro interno = 0,26 mm) acoplada foram extrusadas manualmente a 25 cm da superfície de soluções de diferentes cátions levemente agitadas. A frequência de extrusão (1 gota.s⁻¹) foi controlada por um contador de frequência sonoro (metrônomo). As esferas foram retiradas com peneira após 2 min de reticulação (maturação) e a umidade superficial foi removida por contato rápido com um papel filtro.

Cinco esferas de cada grupo foram coletadas, pesadas e fotografadas com microscópio trinocular (XTB-2T, Coleman, Brasil). A esfericidade foi calculada comparando os diâmetros menor (d_{menor}) e maior (d_{maior}) observados nas imagens (Equação 3.3, CHAN et al., 2009).

$$\text{Esfericidade} = \frac{d_{\text{maior}} - d_{\text{menor}}}{d_{\text{maior}} + d_{\text{menor}}} \quad \text{Equação 3.3}$$

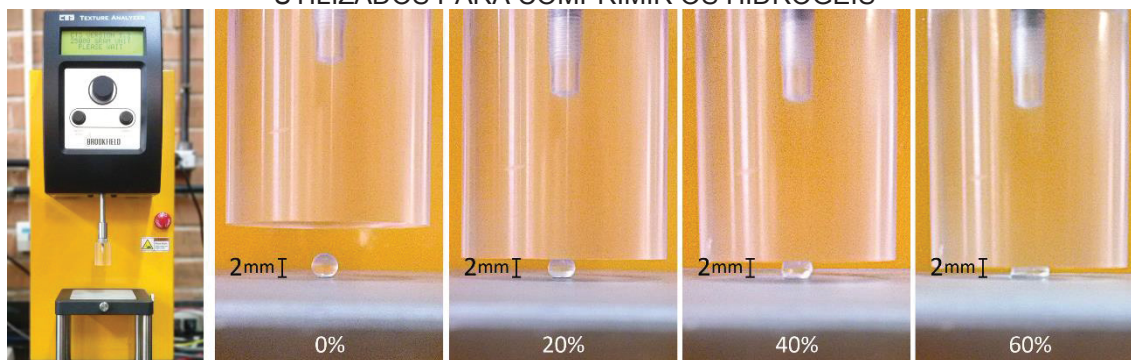
3.2.2 Absorção de radiação UV-Visível

Um espectrofotômetro de varredura UV-Vis (Lambda 650, Perkin Elmer, Brasil) foi usado para avaliar a absorbância (250 a 800 nm com um passo de 1 nm com 3 ciclos de varredura) de cubetas de 3 mL preenchidas com esferas frescas produzidas com diferentes cátions. Água destilada foi utilizada como branco.

3.2.3 Tamanho e análise mecânica

A análise da textura (Brookfield CT3, EUA) foi realizada utilizando uma sonda acrílica cilíndrica (diâmetro = 25,4 mm, TA11/1000) e o software TextureProCT® para medir o diâmetro (carga de disparo = 1 g) e resistência à compressão das esferas na superfície de uma mesa metálica retangular ajustável (FIGURA 3.1). A deformação dos primeiros 60% do diâmetro de cinco esferas (OUWERX et al., 1998; CHAN et al., 2011; CHEN; OPARA, 2013; BOATENG et al., 2008) a uma velocidade de compressão de 12 mm.min⁻¹ foi registrada para avaliação da resistência das amostras.

FIGURA 3.1 – TEXTURÔMETRO E PONTA DE PROVA CILÍNDRICA DE ACRÍLICO UTILIZADOS PARA COMPRIMIR OS HIDROGÉIS



FONTE: O autor (2021).

O módulo de Young (E) faz parte do coeficiente angular da relação linear entre a força (F) e a raiz quadrada do cubo do deslocamento (H) (Equação

3.4). É calculado usando o diâmetro da esfera (d) e o coeficiente de Poisson (v), que é considerado 0,5 para hidrogéis como ALG (CHAN et al., 2011).

$$F = 4 \cdot \sqrt{H^3 \cdot d / 2} \cdot E / (3 \cdot \sqrt{8} \cdot (1 - \nu^2)) \quad \text{Equação 3.4}$$

3.2.4 Análise estatística

Os testes ANOVA e Tukey foram realizados a fim de comparar a massa (m), diâmetro (d), módulo de Young (E) e esfericidade dos hidrogéis dos biopolímeros complexados com os vários sais. Diferenças entre os resultados usando o mesmo sal e biopolímeros diferentes foram avaliadas pelo teste t de student. Ambos os testes foram realizados a um nível de confiança de 95%. O coeficiente de determinação (R^2) e a raiz do desvio quadrático médio (RMSD) auxiliaram na avaliação da linearidade do ajuste para o cálculo de E.

3.3 TERMOESTABILIDADE

3.3.1 Produção das esferas

Foram preparadas esferas com os íons cálcio (CaCl_2 , CaALGs e CadWPIs), zinco (ZnCl_2 , ZnALGs e ZndWPIs) e cádmio (CdCl_2 , CdALGs e CddWPIs) para verificação do efeito do tamanho do cátion na degradação dos biopolímeros. As esferas foram preparadas conforme descrito na seção anterior, utilizando-se de uma agulha 18G (0,838 mm) para aumentar a massa e o sinal lido pelo TGA. Todas as esferas foram secas em estufa a 30 °C por 24 h, simulando a secagem e acondicionamento em temperatura e atmosfera próximas ao ambiente.

As soluções de NaALG e de WPI desnaturado foram gotejadas (25 μL) em placas de Petri e mantidas em estufa (Quimis, Brasil) a 30 °C por 24 h, formando pequenos filmes para avaliar o efeito da solubilização/desidratação no caso do polissacarídeo (NaALGf) e do tratamento térmico no caso da proteína (dWPIf) no perfil térmico dos materiais.

3.3.2 Termoestabilidade

Amostras (± 5 mg) de biopolímeros em pó (NaALGp e WPIp), dos filmes (NaALGf e dWPIf) e esferas (CaALGs, ZnALGs, CdALGs, CadWPIs, ZndWPIs e CddWPIs) foram aquecidas de 30 °C a 630 °C a 10 °C.min⁻¹ (LANGTON; ASTRÖM; HERMANSSON; 1997) em painéis de platina (PerkinElmer, EUA) sob atmosfera inerte (N₂, 20 mL.min⁻¹) no equipamento de análise termogravimétrica equipado com software Pyris (TGA 4000, PerkinElmer, EUA).

3.3.3 Morfologia das esferas de ALG e WPI e produção de carvão ativado

A microscopia eletrônica de varredura foi conduzida em CaALGs e CadWPIs com uma voltagem de aceleração de 15,0 kV e ampliações de 100x e 5000x (Tescan, VEGA3 LMU, EUA) após o congelamento das esferas por imersão em nitrogênio líquido, fatiamento e pulverização de ouro em atmosfera de vácuo (0,1 Pa, 40 mA, 2 min, Balzers Union, SCD 030, Liechtenstein).

Ácido fosfórico (50%, 1,2 g de solução) foi adicionado separadamente às esferas secas CaALGs e CadWPIs (0,6 g de esferas secas para cada grupo). A mistura de ácido com esferas foi seca em estufa (24 h, 100 °C), pirolisada (ausência de oxigênio) em mufla (aquecimento de 50 °C a cada 30 min, mantida a 550 °C por 1 h), resfriada, lavada com 25 mL de ácido clorídrico (5%) e depois lavada com água deionizada até que a condutividade da água residual fosse inferior a 20 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (aproximadamente 1,5 L). Em seguida, o resíduo foi novamente seco (24 h, 100 °C) e sua área superficial específica foi analisada por adsorção de N₂ em baixa temperatura BET (Quantachrome, NOVA 1200e, EUA).

3.4 ENCAPSULAMENTO DE EXTRATO DE ERVA-MATE

3.4.1 Produção das esferas

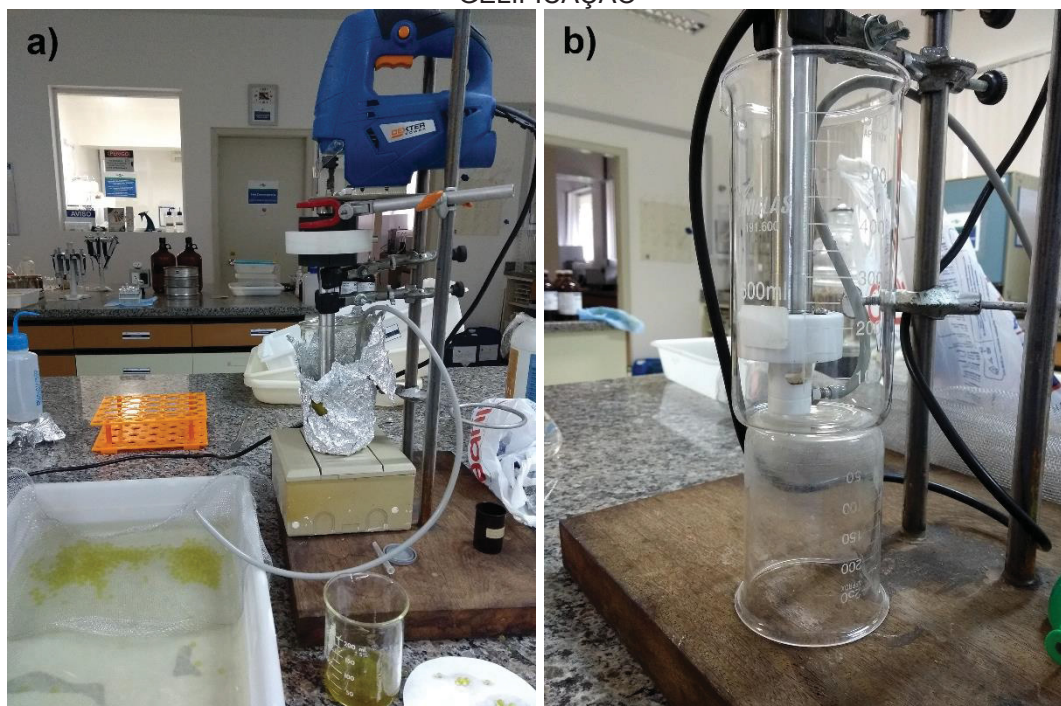
O extrato de erva-mate (EXT) foi obtido por infusão de 1 g de folhas secas e moídas em 50 mL de água fervente seguida de tratamento ultrassônico

de 30 min, filtração em balão volumétrico de 100 mL e adição de água até completar o volume.

As soluções de biopolímeros foram preparadas dissolvendo 1,5% de NaALG e 9,6% de WPI no EXT. O pH das soluções de ALG + EXT foi ajustado de 5,5 a 3,6 com HCl (0,1 M) e para 8,0 com NaOH (0,1 M), separadamente, para observar a mudança de cor devido à oxidação durante a secagem. A solução WPI foi aquecida a 75 °C por 40 min com um agitador magnético (SP Labor, Mod 10203, Brasil) para desnaturar as proteínas e parte da solução de ALG foi adicionada (1 ALG: 9 WPI) para garantir a esferificação.

As soluções dos biopolímeros foram gotejadas de uma mangueira de plástico (1 mm de diâmetro interno) conectada a uma bomba de politetrafluoroetileno controlada por uma serra tico-tico (Dexter NC500JS, Brasil) em uma solução de gelificação (CaCl_2 100 mM) à temperatura ambiente (FIGURA 3.2). As esferas formadas foram curadas por 2 min, secas a 30 °C por 24 h e armazenadas a 5 °C em recipientes selados. A umidade de EXT e das esferas produzidas (ALGmp e WPImp) foi determinada a 110 °C por 24 h.

FIGURA 3.2 – ESQUEMA PARA O GOTEJAMENTO DAS ESFERAS NA SOLUÇÃO DE GELIFICAÇÃO



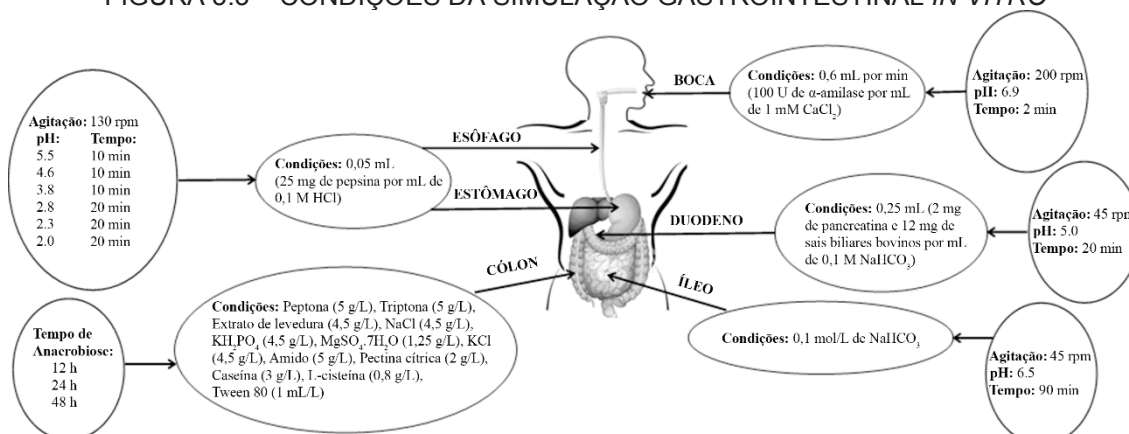
FONTE: O autor (2021).

- a) serra tico-tico e mangueira conectada ao dispositivo de bombeamento;
- b) dispositivo de bombeamento que fica submerso na solução de biopolímero com extrato

3.4.2 Simulação da liberação gastrointestinal *in vitro*

Amostras de EXT, utilizadas como controle de matriz bioativa (5 g de extrato líquido), micropartículas de ALG (ALGmp, 1 g de micropartículas secas) ou micropartículas de WPI (WPImp, 1 g) foram expostas às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* de acordo com a metodologia proposta por Verruck et al. (2020), com algumas modificações. As condições típicas prevalentes na boca humana (MOU, *mouth*), esôfago/estômago (STO, *stomach*), duodeno (DUO, *duodenum*), íleo (ILE, *ileum*) e cólon ascendente, transverso e descendente (ACO, TCO, DCO) foram simulados sequencialmente. Para as ACO (*ascending colon*), TCO (*transverse colon*) e DCO (*descending colon*), as amostras foram coletadas às 12, 24 e 48 h, respectivamente. Soluções de enzimas, valores de pH, tempo de simulação e intensidades de agitação em cada parte do sistema digestivo humano são ilustrados na FIGURA 3.3. NaHCO₃ (1 M) e HCl (1 M) foram usados para ajustar o pH em cada etapa. As soluções foram mantidas em banho de gelo durante todo o período de simulação antes de serem adicionadas gradualmente conforme planejado. Um banho-maria (Dist DI950M, Brasil) com agitação mecânica foi utilizado para simular a temperatura (37 °C) e os movimentos peristálticos em MOU, STO, DUO, ILE, ACO, TCO e DCO. Todas as condições gastrointestinais simuladas foram contínuas, assim o volume total de trabalho aumentou, simulando o processo real de digestão. Por fim, cada volume de amostra foi corrigido com água peptonada (0,1%) até atingir 10 mL. O conteúdo fenólico e as AA foram avaliados em cada etapa. A simulação foi repetida três vezes em três dias diferentes.

FIGURA 3.3 – CONDIÇÕES DA SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*



FONTE: O autor (2021).

3.4.3 Compostos fenólicos totais (TPC) e atividade antioxidante (AA)

A avaliação dos Compostos fenólicos totais (TPC) foi baseada no trabalho de Singleton e Rossi (1965). Água destilada (6 mL) foi adicionada a balões volumétricos de 10 mL, seguida pela amostra (100 µL). O reagente Folin-Ciocalteu (500 µL) foi então adicionado e, após ser agitado em vórtex por 1 min (Scientific Industries, Mod. G-560, EUA), 2 mL de solução de Na₂CO₃ (15%) foram adicionados e o frasco foi agitado novamente em vórtex por 30 s para atingir a homogeneização. O conjunto de amostras foi deixado em repouso por 2 h na ausência de luz, quando então a leitura da absorbância a 760 nm foi feita (Shimadzu, UV-1800, Japão). A concentração de compostos fenólicos em mg de ácido gálico equivalente (GAE) por g de EXT seco foi calculada usando interpolação de dados da curva de calibração entre 1,5 e 10,0 mg GAE/L.

O teste DPPH baseou-se na metodologia de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com leituras em 515 nm e curva padrão variando de 0 a 1,0 mmol TEAC/L. Uma solução metanólica de DPPH (0,06 mmol/L) foi adicionada (3,9 mL) aos tubos de ensaio, seguida da amostra (100 µL), e a mistura foi mantida na ausência de luz por 30 min até as leituras de absorbância.

O radical ABTS (RE et al., 1999; ARNAO; CANO; ACOSTA, 2001) foi preparado pela adição de 176 µL de K₂SO₅ (140 mM) em 10 mL de ABTS (7 mM), ambos em tampão de acetato de sódio (20 mM), mantendo a solução em um ambiente escuro por 16 h. Após esse período, 1 mL da solução foi diluída em 100 mL de tampão de acetato de sódio (mM) até uma absorbância final de 0,725 a 734 nm. A amostra (30 µL) foi adicionada aos tubos de ensaio, seguida da solução do radical ABTS (3 mL). As leituras foram feitas depois que o conjunto de amostras foi deixado em repouso por 2 h em um ambiente escuro, para inferir a AA equivalente de Trolox (mmol TEAC/g de extrato seco), com base em uma curva de calibração de 0 a 2,5 mmol TEAC/L.

3.4.4 Análise morfológica

A microscopia eletrônica de varredura foi conduzida com uma voltagem de aceleração de 15,0 kV e ampliações de 100x e 5000x (Tescan, VEGA3 LMU, EUA) após a pulverização catódica das micropartículas com ouro (Balzers Union, SCD 030, Liechtenstein) em uma atmosfera de vácuo de argônio (0,1 Pa, 40 mA, 2 min).

3.4.5 Análise estatística

Statistica 7 (StatSoft, EUA) foi o software usado para realizar uma análise de variância (ANOVA) e testes de Tukey para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a AA de EXT, ALGmp e WPImp. Os dados foram expressos nas figuras como média \pm desvio padrão. A umidade e a AA pelos três métodos foram determinadas em triplicata ($n = 3$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESFERIFICAÇÃO

A massa molar média do NaALG usado, 148 kDa, foi estimada pela avaliação da viscosidade e aplicação da equação de Mark-Houwink (Equações 3.1 e 3.2, FIGUEIRA; HOTZA; BERNARDIN, 2014). Este resultado está na mesma ordem de grandeza da massa molar da imunoglobulina (150,3 kDa), menor fração mássica do WPI, mas é muito maior que a albumina (70,3 kDa), a beta-lactoglobulina (30,7 kDa, 75% da fração mássica) e a alfa-lactoglobulina (15,4 kDa) (MALVERN INSTRUMENTS, 2014). Logo, o ALG é um biopolímero geralmente muito maior do que o WPI, o que pode afetar em algumas propriedades, como a difusão de compostos encapsulados.

O monômero guluronato do ALG é responsável pela gelificação pela reação com cátions divalentes (FANG et al., 2007). Assim, a razão M/G do NaALG foi estimada em 1,14 através de leituras no infravermelho médio (1125 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} correspondendo ao M e G, respectivamente). A maioria dos ALG provindos de algas do gênero *Sargassum* tem razão M/G entre 0,8 e 1,5, enquanto o gênero *Laminaria* atinge o valor de 2,26 (MINGHOU et al., 1984). Por isso, o ALG usado aqui deve ser de *Sargassum* sp., com uma alta capacidade de se ligar a cátions divalentes na produção de hidroesferas.

Neste estudo, as soluções de NaAlg (30 g/L) ou de WPI desnaturado (110 g/L) foram gotejadas a uma altura fixa (25 cm) e mantidas para cura por 2 min na solução salina (100 mM de M^{2+}), exceto para o uso da solução saturada do gluconato de cálcio (CaGluc, 77 mM; O'NEIL, 2001). As concentrações de ALG (KIKUCHI et al., 1997; MICHELI et al., 2002; CHANDRAMOULI et al., 2004; LIN et al., 2005; MALABADI; STADEN, 2005), WPI (DOHERTY et al., 2011; DÉAT-LAINE et al., 2012; WICHCHUKIT et al., 2013) e de CaCl_2 estavam de acordo com estudos prévios (DÉAT-LAINE et al., 2012; CENDON et al., 2018).

As esferas de MnALG eram frágeis e difíceis de manipular, o que é compatível com o relato da dificuldade em conectar as cadeias do biopolímero comparado aos demais cátions (OUWERX et al., 1998). Outra condição necessária para a esferificação é uma viscosidade mínima da solução do

biopolímero (OUWERX et al., 1998), que depende da temperatura, concentração e das propriedades do tipo de ALG utilizado, assim como a proporção de manurato/guluronato e o tamanho médio das cadeias (FANG et al., 2007).

Finalmente, observando-se os relatos anteriores sobre esferas de ALG com cátions divalentes, pode ser concluído que esferas de CdALG são as mais rígidas (OUWERX et al., 1998; CHAN et al., 2011). Essa e outras propriedades e hipóteses serão detalhadas a seguir.

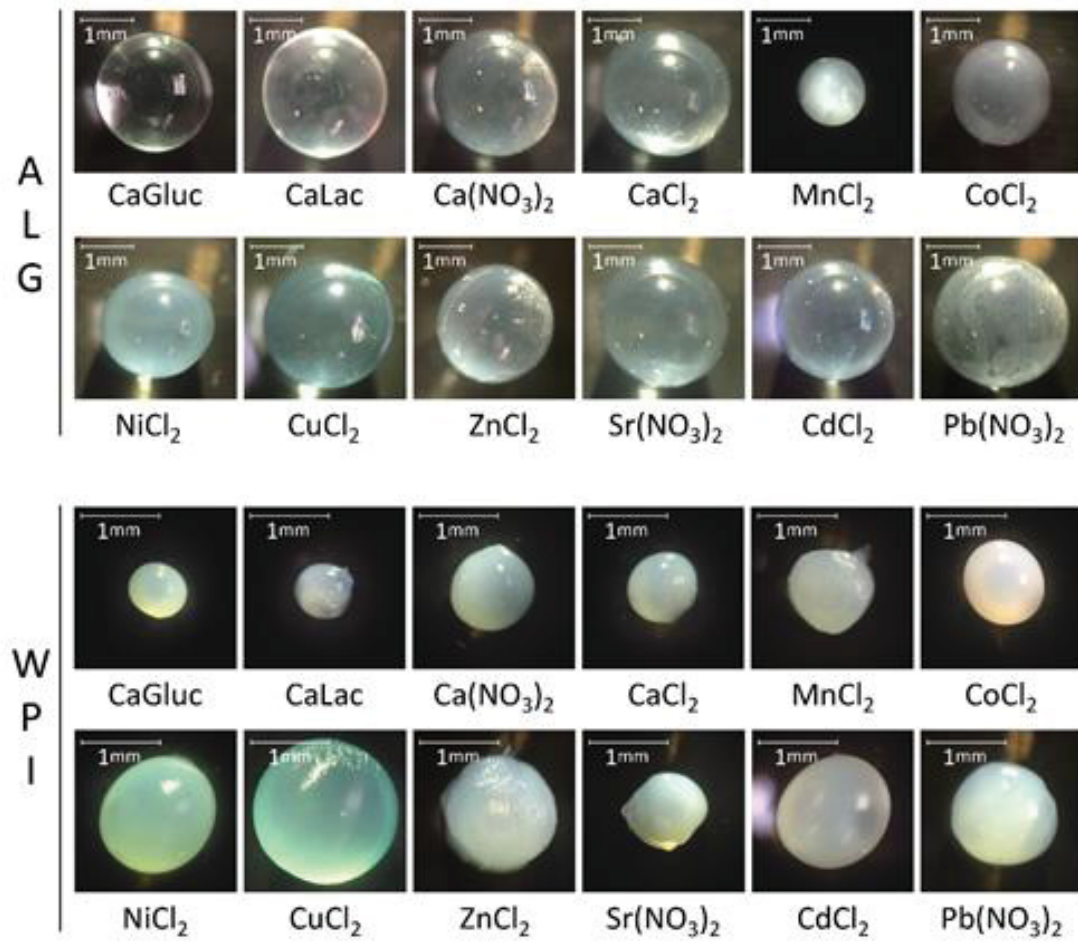
4.2 EFEITO DO USO DE DIFERENTES CÁTIOS DIVALENTES

4.2.1 Aspecto visual e esfericidade

Visualmente as partículas de ALG são mais esféricas e, geralmente, maiores do que as de WPI (FIGURA 4.1). Não foram observadas diferenças entre as esfericidades dos hidrogéis de ALG, e todos podem ser considerados esféricos (TABELA 4.1) porque suas esfericidades são menores que 0,05 (CHAN et al., 2009). Para o WPI, apenas ZnWPI, CdWPI e PbWPI podem ser consideradas esféricas de acordo com esse parâmetro (TABELA 4.2). As esferas de WPI produzidas com CaCl_2 , $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ e CoCl_2 são as mais irregulares, e as demais apresentaram valores de esfericidade intermediários.

As esferas de WPI são todas mais opacas que as de ALG. Algumas esferas também apresentaram cores que remetem aos sais dos cátions, como o azul esverdeado das esferas de Ni e Cu.

FIGURA 4.1 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓTICA DE ESFERAS DE ALGINATO E PROTEÍNA ISOLADA DE SORO DE LEITE COMPLEXADOS COM CÂTIONS DIVALENTES



FONTE: O autor (2020).

TABELA 4.1 – AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MECÂNICO E MORFOLÓGICO DOS HIDROGÉIS DE ALGINATO

Solução	E (kPa)	R ²	RMSD (%)	m (%)	d (mm)	Esf.	Sol. (M)
CdCl ₂	1080±110 ^a	0,968±0,021	11,7±3,3	76,7±4,9 ^c	2,28±0,04 ^c	0,022±0,015	6,546
ZnCl ₂	1054±109 ^{a,b}	0,946±0,048	14,4±5,1	90,0±3,9 ^b	2,26±0,05 ^c	0,028±0,012	29,936
Pb(NO ₃) ₂	1050±32 ^{a,b}	0,978±0,013	11,4±3,0	83,2±3,9 ^{b,c}	2,66±0,08 ^a	0,030±0,005	1,802
CaGluc	983±85 ^{a,b,c}	0,942±0,078	14,7±4,9	92,6±1,9 ^{a,b}	2,28±0,09 ^c	0,029±0,012	0,077 ¹
CuCl ₂	975±39 ^{a,b,c}	0,978±0,008	11,2±2,2	78,6±2,3 ^c	2,51±0,04 ^{a,b}	0,027±0,004	5,630
Sr(NO ₃) ₂	908±38 ^{a,b,c}	0,968±0,015	12,5±1,9	87,1±3,2 ^b	2,49±0,09 ^b	0,025±0,010	3,789
CaCl ₂	862±22 ^{b,c}	0,970±0,014	12,6±2,5	101,9±3,2 ^a	2,52±0,05 ^{a,b}	0,023±0,005	7,326
MnCl ₂	829±135 ^c	0,878±0,071	19,4±7,3	67,6±4,2 ^d	1,31±0,07 ^f	0,032±0,009	6,143
NiCl ₂	805±96 ^c	0,931±0,023	21,4±5,7	74,4±4,2 ^{c,d}	2,11±0,09 ^d	0,035±0,015	5,290
Ca(NO ₃) ₂	782±86 ^c	0,963±0,025	14,6±3,6	86,4±3,2 ^b	2,47±0,03 ^b	0,025±0,013	8,775
CoCl ₂	773±70 ^{c,d}	0,923±0,028	18,5±4,8	92,9±4,5 ^{a,b}	1,91±0,05 ^e	0,026±0,016	4,329
CaLac	564±95 ^d	0,929±0,033	21,5±6,2	102,3±3,2 ^a	2,40±0,10 ^{b,c}	0,035±0,021	0,481 ²

Esf: esfericidades (não há diferença significativa de acordo com o teste ANOVA);

Sol: solubilidades

d: diâmetro;

E: módulo de Young;

m: Porcentagens em comparação à massa das gotas de solução de alginato de sódio = 30,9±0,8 mg;

R²: coeficiente de determinação do ajuste da Lei de Hertz;

RMSD: raiz da média do quadrado dos desvios do ajuste da Lei de hertz;

¹Perry, Green e Maloney, 1997;

²Cavallaro et al., 2013;

demais solubilidades de Lide, 2005;

^{a,b,...}letras indicam valores iguais estatisticamente de acordo com o teste de tukey (p>0,05, n = 5)

TABELA 4.2 – AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MECÂNICO E MORFOLÓGICO DOS HIDROGÉIS DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE

Sal	E (kPa)	R ²	RMSD (%)	m (%)	d (mm)	Esfericidade
CaLac	4993±591 ^a	0,925±0,030	13,4±4,0	117,5±6,5 ^{c,d}	0,74±0,02 ^e	0,075±0,034 ^{a,b,c,d}
CaGluc	4352±546 ^{a,b}	0,940±0,030	11,8±2,6	110,5±3,0 ^d	0,72±0,03 ^e	0,125±0,037 ^{b,c,d}
CaCl ₂	3560±310 ^b	0,930±0,045	14,1±4,2	118,5±3,0 ^{c,d}	0,87±0,01 ^{d,e}	0,135±0,036 ^{c,d}
CoCl ₂	2591±464 ^c	0,939±0,054	12,0±2,7	120,5±6,0 ^{c,d}	1,01±0,06 ^{c,d}	0,146±0,027 ^d
Ca(NO ₃) ₂	1877±80 ^{c,d}	0,932±0,031	15,6±2,2	122,0±8,5 ^{c,d}	1,07±0,06 ^c	0,063±0,016 ^{a,b,c}
MnCl ₂	1353±168 ^{d,e}	0,858±0,061	21,4±4,5	131,0±6,0 ^{b,c,d}	1,11±0,05 ^c	0,096±0,011 ^{a,b,c,d}
Pb(NO ₃) ₂	1160±202 ^e	0,907±0,033	19,5±4,2	137,0±5,5 ^{b,c}	1,39±0,03 ^b	0,050±0,026 ^{a,b}
ZnCl ₂	934±267 ^e	0,856±0,024	18,8±6,1	140,5±22,5 ^{b,c}	1,49±0,09 ^b	0,038±0,007 ^a
CuCl ₂	845±319 ^e	0,901±0,089	17,1±5,5	237,0±40,5 ^a	1,91±0,12 ^a	0,074±0,022 ^{a,b,c,d}
CdCl ₂	784±88 ^e	0,835±0,030	15,6±3,3	139,0±9,0 ^{b,c}	1,49±0,05 ^b	0,047±0,03 ^a
Sr(NO ₃) ₂	762±97 ^e	0,878±0,070	18,0±5,0	121,0±3,0 ^{c,d}	1,03±0,22 ^{c,d}	0,145±0,009 ^d
NiCl ₂	665±95 ^e	0,836±0,075	23,2±5,2	150,5±11,5 ^b	1,51±0,03 ^b	0,083±0,033 ^{a,b,c,d}

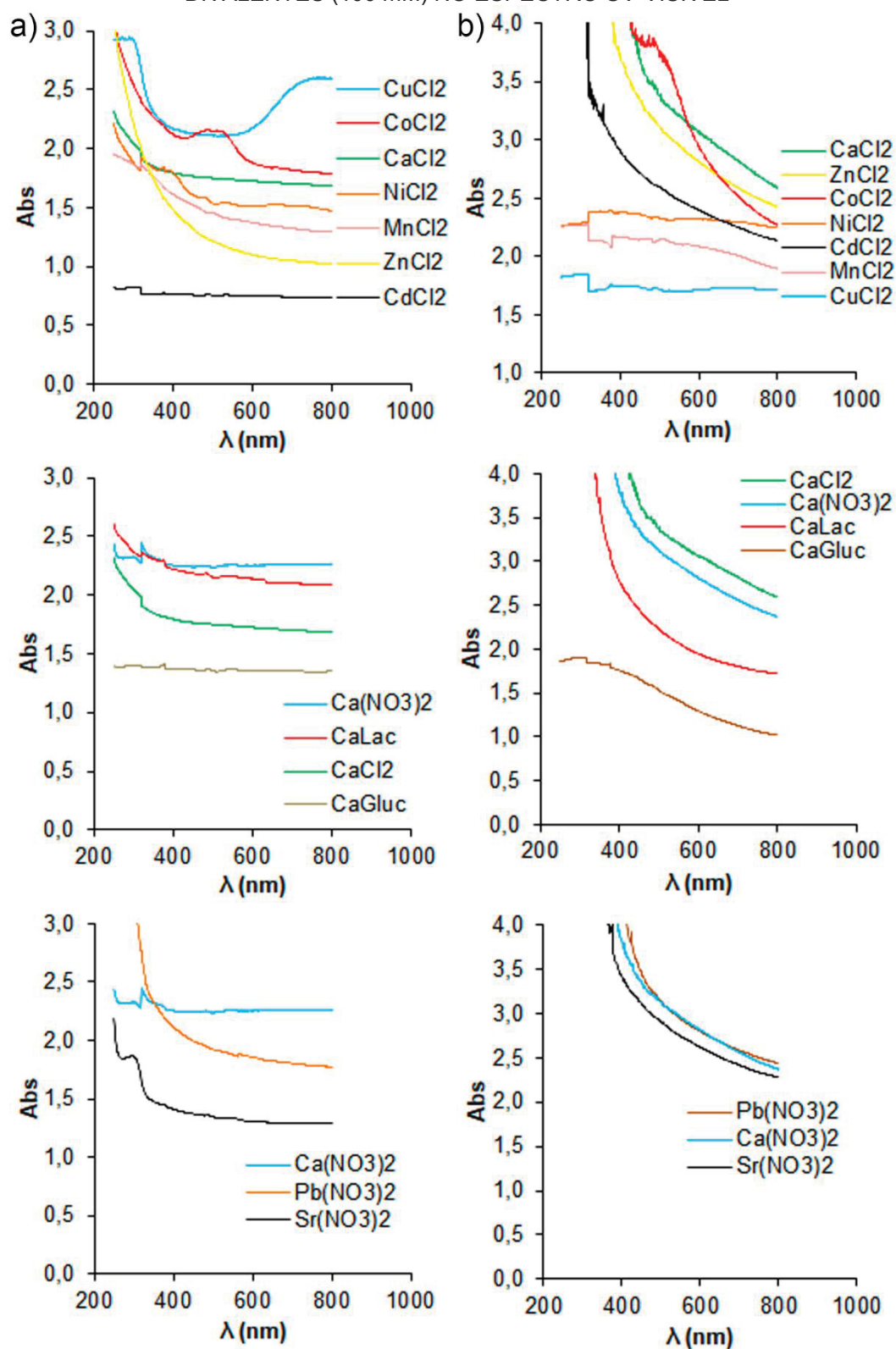
m: Porcentagens em comparação à massa das gotas da solução desnaturada de proteína isolada de soro de leite = 20,0±1,5 mg

4.2.2 Absorbância no UV-Visível

Devido ao fato de a cor dos hidrogéis variar dependendo do cátion e contraíon utilizado (FIGURA 4.1), a absorbância das esferas no intervalo de radiação UV e de luz visível foi avaliada (FIGURA 4.2). CuALG, CoALG e ZnALG apresentaram a maior absorbância de radiação UV, demonstrando que não apenas os sais e óxidos desses cátions (KHOSRAVI et al., 1998; ZHUANG et al., 2006; HE; HOCKING; TSUZUKI, 2012), mas também seus hidrogéis de ALG reticulados tem essa habilidade. Dentre os cloretos, $ZnCl_2$ causou a queda mais intensa de absorbância quando o comprimento de luz entra na região visível. Esta é uma propriedade desejável para produtos aplicados à pele (AMMALA et al., 2002), que requerem baixa opacidade. O uso desses cátions pode reduzir a necessidade de aditivos como argila (CAVALLARO et al., 2013), que são usados para reduzir a transparência quando microrganismos ou compostos sensíveis à luz são protegidos pelo hidrogel (ZOHAR-PEREZ et al., 2003).

Dentre as esferas de cálcio, apenas aquelas produzidas com cloreto e lactato apresentaram essa propriedade. O gluconato produziu as esferas mais transparentes (FIGURA 4.2a) o que é confirmado pelas imagens de microscopia ótica (FIGURA 4.1). No caso dos nitratos, o cálcio apresentou a maior absorbância em todo o espectro observado. O chumbo, que é conhecido por sua habilidade de bloquear a radiação UV e raios-X (RAHMAN et al., 1999; HOSSEINI-BANDEGHARAEI et al., 2014), causou a diminuição mais intensa na absorbância quando nos afastamos da região UV e nos aproximamos da região visível.

FIGURA 4.2 – ABSORBÂNCIA DOS HIDROGÉIS COMPLEXADOS COM SAIS DE CÂTIÕES DIVALENTES (100 mM) NO ESPECTRO UV-VISÍVEL



FONTE: O autor (2021).
 a) alginato;
 b) proteína de soro de leite

As únicas esferas de WPI que não apresentaram maior absorbância de radiação UV do que de luz visível foram as produzidas com CaGluc, NiCl₂, MnCl₂ e CuCl₂. Da mesma forma, a maioria dos hidrogéis de WPI tem maior absorbância em toda a extensão do UV-Vis que os de ALG, confirmando a observação de que os hidrogéis de proteína são mais opacos (FIGURA 4.1). Apenas o Cu²⁺ apresentou comportamento antagônico. Na maioria das esferas, o crescimento de absorbância é expressivo em direção à região do UV, mesmo ainda dentro da região da luz visível. Isto confirma o que foi observado nas imagens de microscopia ótica: que as esferas de WPI são mais opacas que as de ALG. Além disso, demonstra que são potenciais ferramentas de proteção contra a radiação UV.

4.2.3 Massa

A massa média das esferas, inclusive o desvio-padrão, é importante para o desenvolvimento de aplicações, como na administração controlada de drogas medicamentosas (WENING; BREITKREUTZ, 2011), desenvolvimento de produtos alimentares, de cosméticos (DURANTE et al., 2012) e biotecnológicos (ETCHEPARE et al., 2015), bem como tratamento ambiental (WANG; LU; LI, 2016). Essa propriedade também é essencial para o projeto de reatores no cálculo da carga de catalisadores (CRUZ et al., 2017), adsorventes e enzimas (AL-MAYAH et al., 2012). Nesse sentido, o efeito do diâmetro da agulha de extrusão, da concentração, da viscosidade e da tensão superficial da solução de ALG tem sido descrito como relevantes para definir o tamanho e o formato da gota e da esfera reticulada (CHAN et al., 2009). Ainda, o tipo de cátion e sua concentração, o tempo de cura e a temperatura afetam o rendimento da reticulação e a difusão das moléculas do cátion e do biopolímero (HASSAN, 1992). Diante disto, a massa, o diâmetro e a rigidez de cinco esferas (CHEN; OPARA, 2013; BELSCAK-CVITANOVIC et al., 2015) de cada batelada de esferificação de ALG e de WPI com 14 diferentes sais de cátions bivalentes foram determinados. A massa da gota da solução de ALG ($30,9 \pm 0,8$ mg) extrusadas é maior do que a da solução de WPI desnaturado ($20,0 \pm 1,5$ mg), o que pode ser atribuído às diferenças na densidade, viscosidade e tensão superficial das soluções dos biopolímeros (CHAN et al.,

2009). Após a extrusão e maturação, a massa das esferas de ALG geralmente diminuiu, mantendo-se entre 21,0 e 31,7 mg (TABELA 4.1), enquanto aumentou para o WPI para entre 22,0 e 47,5 mg (TABELA 4.2). Esse fenômeno sugere que, durante a reticulação iônica, água foi perdida da matriz de ALG e incorporada na matriz de WPI, o que deve refletir na resistência mecânica da esfera (WANG et al., 2005, CHAN et al., 2011).

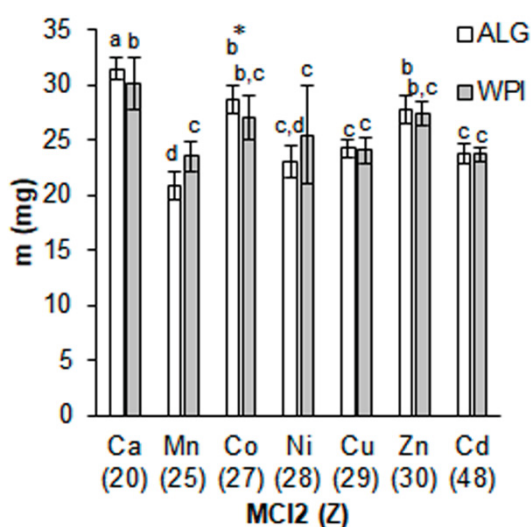
A perda de água na produção de CaALG foi previamente relatada entre 10 e 50%, sendo que a concentração de NaALG (1,0 a 5,0%) e o diâmetro interno da agulha (0,4 a 1,6 mm) não influenciam essa propriedade (CHAN et al., 2009). No presente estudo (TABELA 4.1), o tipo de cátion afetou significativamente ($p < 0,05$) a perda de massa com o uso condições operacionais iguais (frequência e distância de gotejamento, temperatura e tempo de reação) para maioria das soluções salinas. Apenas as esferas obtidas pela reação da solução de NaALG com lactato de cálcio (CaLac) e CaCl_2 incharam: 1,9% e 2,7%, respectivamente. O uso da solução de CaGluc provocou diminuição de 7,4% e a de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ de 13,6%. Por isso, o contraíon para um mesmo cátion também é relevante e as diferenças podem estar associadas com a difusão de água e do sódio do NaALG para fora da esfera que está sendo produzida (HASSAN et al., 1992) e do cátion e dos contraíons para dentro, afetando as forças eletrostáticas dentro e a pressão osmótica do sistema (SANKALIA et al., 2006; ILGIN; OZAY; OZAY, 2019). Os ânions contendo os elementos mais eletronegativos (cloreto e os ânions orgânicos contendo oxigênio) são repelidos pelo grupo carboxílico do ALG, resultando em uma maior absorção e retenção de água e uma maior massa dos hidrogéis em comparação com o nitrato (TABELA 4.1). O tamanho do gluconato pode atrapalhar sua difusão para dentro da esfera, aumentando a pressão osmótica do meio externo e diminuindo a quantidade de água dentro. A solução de MnCl_2 revelou a maior diminuição de massa (32,0%, TABELA 4.1), o que também pode estar relacionado à menor rigidez previamente descrita (OUWERX et al., 1998), conforme desmontaremos a seguir.

No caso do WPI, a massa das gotas aumentou com todas as soluções salinas (TABELA 4.2), o que sugere uma inclusão de moléculas de água. O CaGluc mostrou a menor alteração na massa (10%), o que pode ser atribuído a sua capacidade de formar cinco ligações de hidrogênio em comparação com o

lactato, que forma apenas uma, aumentando a pressão osmótica da solução salina e diminuindo a absorção de água pela esfera.

Comparando a esferificação feita com soluções de cloreto, há uma aparente relação entre a massa das esferas e o número atômico do cátion para ambos biopolímeros (FIGURA 4.3). Para o ALG, o maior número atômico está diretamente relacionado com o grau de reticulação e a consequente perda de água (CHAN et al., 2009). Assim, quanto maior a afinidade do cátion pelas cadeias de ALG ou WPI, maior será a sua redução de massa. Apenas os íons Mn^{2+} e Zn^{2+} são exceção. Os cinco subníveis do orbital mais externo do Mn^{2+} são preenchidos com apenas 1 elétron cada, $3d^5 - (\uparrow)(\uparrow)(\uparrow)(\uparrow)(\uparrow)$. No caso do Zn^{2+} , o par está completo em cada subnível, $3d^{10} - (\uparrow\downarrow)(\uparrow\downarrow)(\uparrow\downarrow)(\uparrow\downarrow)(\uparrow\downarrow)$. Assim, a repulsão entre os elétrons de valência do Zn^{2+} e as carboxilas do ALG explica a maior capacidade de absorção de água das esferas produzidas com esse cátion e, comparativamente, a baixa massa dos hidrogéis de MnALG.

FIGURA 4.3 – EFEITO DO NÚMERO ATÔMICO DOS CÁTIOS DIVALENTES USADOS EM ASSOCIAÇÃO COM CLORETO NA MASSA DAS ESFERAS



FONTE: O autor (2021).

m: massa de uma esfera;

MCL2: cloreto de cátion divalente;

Z: número atômico;

a,b,...letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes quando um mesmo biopolímero é comparado com o uso de cátions diferentes de acordo com o teste de tukey ($p > 0,05$);

* simboliza diferenciação entre o uso dos biopolímeros quanto ao mesmo cátion de acordo com o teste t de student ($p < 0,05$).

4.2.4 Tamanho

O tamanho da esfera é importante para calcular o módulo de Young, pois a linearidade da lei de Hertz ocorre para os primeiros 30% de deformação de hidrogéis como o ALG (CHAN et al., 2011). Ainda, a taxa de gotejamento e o tempo de reação foram cuidadosamente controlados para minimizar a variabilidade do rendimento da reticulação iônica, absorção de meio de cura, massa e diâmetro. O tamanho da amostra foi determinado pelo texturômetro, sendo a distância entre a mesa e a altura onde a carga mínima de disparo foi detectada (1 g). A esfera foi comprimida até 60% de seu tamanho, onde o módulo de Young aumenta porque o comportamento elástico, o formato esférico e a linearidade da equação de Hertz (Equação 3) não estão mais presentes (OUWERX et al., 1998; CHAN et al., 2011).

O diâmetro das esferas de ALG (1,29 a 2,67 mm) foram maiores do que o das de WPI (0,72 a 1,91 mm) (TABELAS 4.1 e 4.2), o que foi atribuído à maior massa das gotas extrusadas de ALG (30,9 mg) em relação ao WPI (20,0 mg) e à maior concentração da solução de WPI (110 g.L^{-1}) em comparação ao ALG (30 g.L^{-1}). O diâmetro de esferas de ALG entre 0,5-5,0% tem sido descrito na ordem $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ (CHAN et al., 2011). No entanto, não houve diferença significativa entre o uso do cloreto desses cátions no estudo atual para ALG na mesma concentração de 3,0%. Estatisticamente, o diâmetro das esferas confeccionadas com PbCl_2 não difere das de CaCl_2 e CuCl_2 (FIGURA 4.4), mas as de ZnCl_2 eram menores.

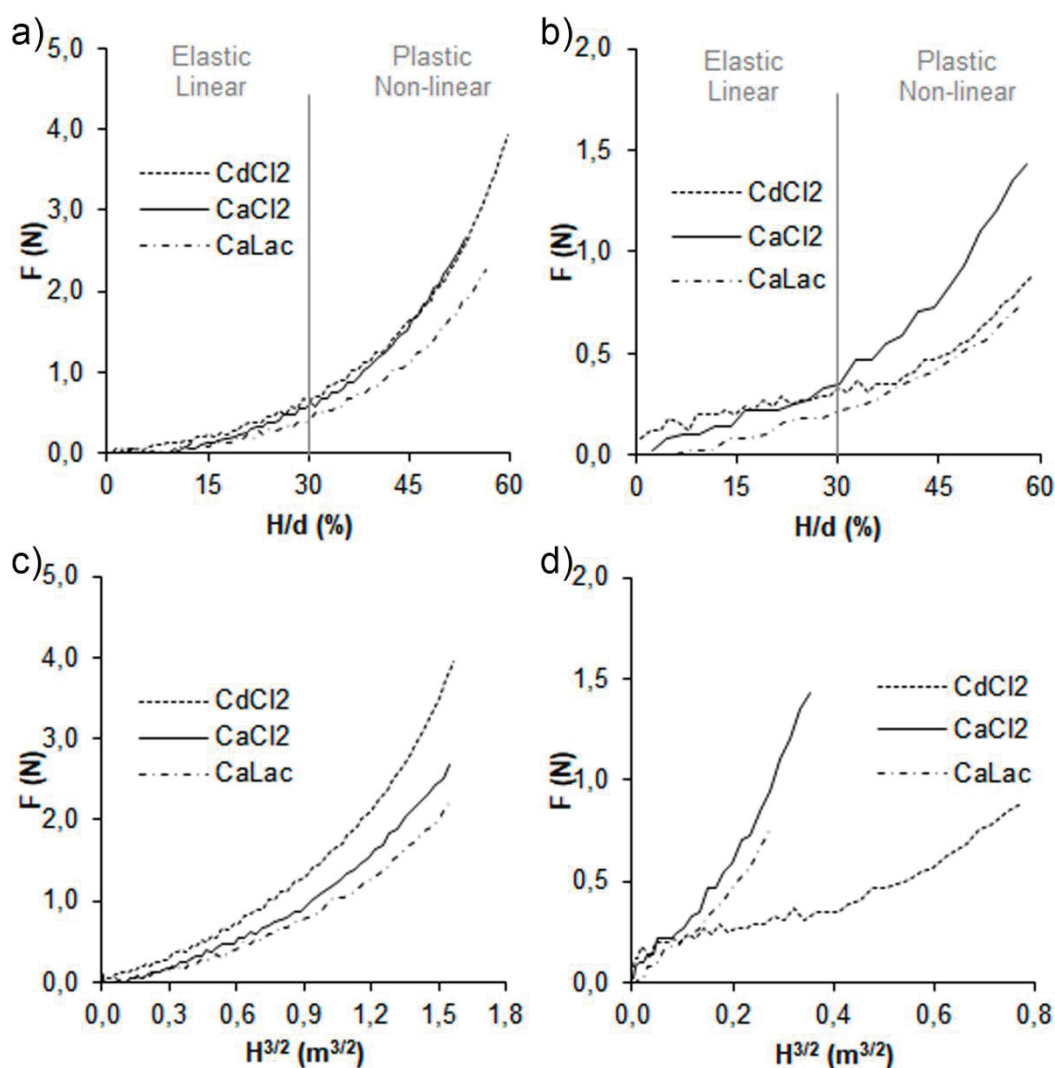
Esferas com diâmetros entre 2,4 e 3,0 mm foram relatadas com uso de agulhas com diâmetros internos de 0,5 mm (OUWERX et al., 1998) e 0,8 mm (CHAN et al., 2011), maiores do que as agulhas usadas neste estudo (0,26 mm). No presente estudo, o diâmetro das partículas variou no intervalo de $\pm 0,1$ mm (coeficiente de variação $< 10\%$), como os dados anteriores (OUWERX et al., 1998). Somente o SrWPI mostrou uma dispersão maior ($\pm 0,2$ mm, 20%). Isto revela uma grande repetibilidade para as condições usadas.

4.2.5 Rigidez

A rigidez tem sido relacionada com a afinidade química entre biopolímeros e os cátions divalentes (CHAN et al., 2011) e é importante para a produção de hidrogéis e sua aplicação, como é o caso de esferas para liberação dirigida de insulina no trato digestivo humano (DÉAT-LAINÉ et al., 2012; HU et al., 2017; CENDON et al., 2018) e de fármacos na superfície do tecido epitelial lesionado (LEE; MOONEY, 2012) ou compor leito fixo dentro de um reator industrial (LANCY; TUOVINEN, 1984). Essa propriedade também está relacionada com a deformação ou desintegração pela mastigação (LANGTON; ASTRÖM; HERMANSSON, 1997), compressão pela língua contra o palato duro e, especialmente, com a percepção da textura do alimento (HEATH; PRINZ, 1999). O hidrogel pode ser macio (eliminando a necessidade de mastigar e tornando-o de fácil consumo por pessoas idosas, ISHIHARA et al., 2013) ou duro, pela adição de surfactantes aniônicos (KAYGUSUZ et al., 2016) ou elastina, resultando em melhoras para aplicações estruturais como engenharia de tecidos (SILVA et al., 2018; TORRES et al., 2019).

As esferas de ALG complexado com cátions divalentes apresenta comportamento plástico a partir de 50% de deformação (CHAN et al., 2011). No presente estudo, apesar do tempo de reticulação curto (2 min), a lei de Hertz foi aplicada com sucesso nos primeiros 30% de deformação de ambos biopolímeros (FIGURA 4.4). O coeficiente de determinação (R^2) e o RMSD (TABELAS 4.1 e 4.2) variaram de 0,878 a 0,978 e de 11% a 21% para o ALG, respectivamente, e de 0,834 a 0,939 e de 12% a 23% para o WPI. Alguns dos ajustes ruins coincidem com os hidrogéis menos rígidos. Nesses casos, o material é facilmente deformado e o formato esférico é perdido rapidamente, dificultando uma estimativa precisa da rigidez porque o modelo é adequado apenas para formato esférico (CHAN et al., 2011).

FIGURA 4.4 – COMPORTAMENTO MECÂNICO E LINEARIZAÇÃO DA LEI DE HERTZ DOS HIDROGÉIS RETICULADOS COM SAIS COM NÚMERO ATÔMICO ALTO (CdCl_2) E BAIXO (CaLac) E O SAL MAIS UTILIZADO PARA A GELIFICAÇÃO A FRIO DO ALGINATO (CaCl_2) SÃO ILUSTRADOS



Fonte: O autor (2021).

F: força;

H: deformação

comportamento mecânico: a) alginato; b) proteína de soro de leite
linearização da Lei de Hertz: c) alginato; d) proteína de soro de leite

Neste estudo, os módulos de Young observados para o ALG (660 a 1100 kPa, TABELA 4.3) são maiores do que os encontrados nos principais estudos prévios com diferentes cátions divalentes (OUWERX et al., 1998; CHAN et al., 2011) mesmo os autores anteriores tendo usado maiores tempos de reação. Essa diferença pode ser atribuída às menores concentrações de ALG (1 a 50 g.L^{-1} e não 30 g.L^{-1}) e de cátions (50 mM ao invés de 100 mM) utilizadas nos estudos anteriores. O uso de concentrações de cátion maiores

resulta em uma hidroesferificação mais rápida, produzindo esferas mais rígidas em apenas 2 min.

TABELA 4.3 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÓDULOS DE YOUNG ENCONTRADOS NO PRESENTE ESTUDO E OS DESCRITOS PREVIAMENTE NA LITERATURA

	Ouwerx et al. 1998	Chan et al. 2011	Presente estudo
Velocidade de compressão (mm.min ⁻¹)	2	40	12
Concentração de NaALG (g.L ⁻¹)	10-20	5-50	30
Concentração de M ²⁺ (mM)	50	50	100
Tempo de Reação	24 h	30 min	2 min
E (kPa)	<100	340	660
		- 800	- 1100

NaALG: alginato de sódio;
M²⁺: cátion divalente;
E: módulo de Young.

Apesar da diferença de magnitude, a ordem de rigidez associada a cada cátion divalente usado para reticulação com ALG está de acordo com os estudos anteriores, com exceção do MnCl₂ (OUWERX et al., 1998, CHAN et al., 2011). O módulo de Young das esferas MnALG não diferiu significativamente de outros valores intermediários, como os cloretos de Cu²⁺, Ca²⁺, Co²⁺ e Ni²⁺, bem como CaGluc, Ca(NO₃)₂ e Sr(NO₃)₂.

A rigidez de esferas de CuALG foi relatada como sendo 200% maior em comparação às de CaALG (CHAN et al., 2011). Aqui, as esferas de CuALG são apenas 13% mais rígidas que as produzidas com CaCl₂ (TABELAS 4.1 e 4.2). As diferenças na metodologia que podem explicar esta discrepância incluem o aumento da concentração de cátions, que aumenta o módulo de elasticidade em diferentes taxas para diferentes cátions (CHAN et al., 2011; KAYGUSUZ et al., 2016), e a variabilidade biológica do ALG em termos de tamanho de cadeia e razão M/G (HAUG; SMIDSRØD, 1965; OUWERX et al., 1998; CHAN et al., 2011).

O CdALG (1084±123 kPa) apresentou maior rigidez (ou módulo de Young) média, seguido do ZnALG (1060±125 kPa) e do PbALG (1055±35 kPa) (TABELA 4.1). CdALG e ZnALG também foram as esferas mais transparentes na região da luz visível, sugerindo que essa propriedade também é afetada

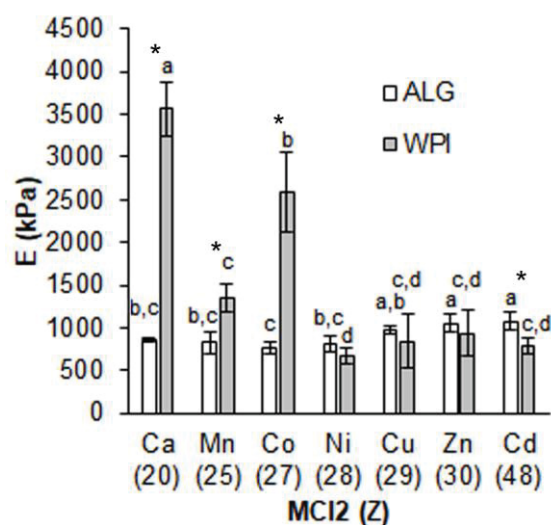
pela maior afinidade química entre esses cátions e o biopolímero. A resistência do CaALG produzido usando CaCl_2 , CaLac e CaGluc aumenta com o tempo de reação até atingir um mesmo valor de máximo para todos os contraíons, sendo que o cloreto é o primeiro a atingir o máximo, seguido do lactato e do gluconato (LEE; ROGERS, 2012). Apesar disso, isso não ocorreu para a rigidez. CaALG produzido usando CaLac apresentou a menor rigidez (571 ± 109 kPa) devido à competição dos grupos carboxílicos do lactato e do ALG pelos íons cálcio, formando CaLac não dissociado (GREENWALD, 1938). As esferas produzidas quando o contraíon de cálcio era gluconato (988 ± 97 kPa), o outro ânion orgânico, apresentaram maior rigidez porque o tamanho do ânion diminui sua difusão para a esfera e, portanto, sua competição por Ca^{2+} , revelando que o tipo de ânion influencia a rigidez. Os ânions inorgânicos, Cl^- (868 ± 28 kPa) e $(\text{NO}_3)^{2-}$ (782 ± 220 kPa), produziram esferas de CaALG tão rígidas quanto as produzidas pelo gluconato. Uma vez que o cloreto causa necrose em tecidos, ele é geralmente substituído por outros contraíons, como gluconato, para a administração de cálcio por via intravenosa ou por gavagem (GREENWALD, 1938). Da mesma forma, o CaCl_2 também pode ser substituído por CaGluc para produzir curativos de ALG que mantêm as características mecânicas, evitando a irritação do tecido.

Os dados relativos à rigidez de PbALG e ZnALG foram apresentados aqui pela primeira vez. O número atômico e a massa do Pb^{2+} são os maiores dentre os cátions testados neste estudo, seguido do Cd^{2+} . A toxicidade destes cátions não permitiria sua ingestão. Portanto, a principal relevância da avaliação da interação dos hidrogéis produzidos a partir desses cátions envolve a sua remoção de resíduos industriais (CHANG; HUANG, 1998; BAILEY et al., 1999; LAMELAS et al., 2005; MATA et al., 2009; PAPAGEORGIOU et al., 2009) e de água potável (SHANG; YU; ROMERO-GONZÁLEZ, 2015). Estudos anteriores corroboram que as esferas de CdALG são mais rígidas, seguidas pelas de Cu^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} , coincidindo com a ordem de concentração mínima para produzir partículas esféricas (OUWERX et al., 1998; CHAN et al., 2011).

Comparando o uso de sais contendo apenas o cloreto como contraíon, a rigidez das esferas de ALG tende a aumentar com o aumento do número atômico do cátion divalente (FIGURA 4.5). Cátions maiores reticulam as

cadeias do polissacarídeo mais facilmente porque, de acordo com o modelo de caixa de ovos, os cátions divalentes são responsáveis pela formação dos dímeros ao coordenar duas cadeias do biopolímero (SIKORSKI et al., 2007). Além disso, o módulo de Young parece ter um comportamento similar ao raio atômico (FIGURA 4.6), atingindo um ponto de mínimo no caso do Ni^{2+} .

FIGURA 4.5 – COMPARAÇÃO DO MÓDULO DE YOUNG DOS HIDROGÉIS COM O NÚMERO ATÔMICO DOS CÁTIOS DIVALENTES USADOS EM ASSOCIAÇÃO COM CLORETO



FONTE: O autor (2021).

E: módulo de Young;

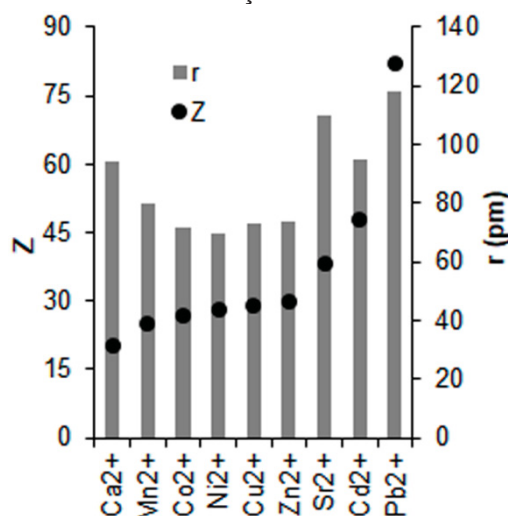
Z: número atômico;

MCL: cloreto de cátion divalente;

a,b,...letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes quando um biopolímero é analisado com cátions diferentes de acordo com o teste de tukey ($p < 0,05$);

* simboliza diferenciação entre o uso dos biopolímeros quanto o mesmo cátion é utilizado de acordo com o teste t de student ($p < 0,05$)

FIGURA 4.6 – ANALOGIA ENTRE O NÚMERO ATÔMICO E RAIOS IÔNICOS DOS CÁTIONS DE COMPLEXAÇÃO



FONTE: O autor (2021).

r: raio iônico;

Z: número atômico;

para Cu²⁺, Cd²⁺ e Pb²⁺: OUWERX et al., 1998;
para os demais: HOUSE, 2008.

De acordo com a análise estatística (TABELA 4.1), Cu²⁺ (Z = 29) e os cátions de maiores números atômicos (Zn²⁺, Sr²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺) produzem esferas tão rígidas quanto os maiores valores encontrados. A exceção foi CaGluc, com um cátion menor que o cobre, possivelmente devido à influência do ânion na pressão osmótica e nas forças eletrostáticas do sistema (SANKALIA et al., 2006; ILGIN; OZAY; OZAY, 2019), a resultante retenção de mais água durante a reticulação iônica e a dificuldade de difusão para dentro da esfera, inibindo o efeito de diminuição da rigidez do lactato, que é ânion inorgânico menor.

A massa molar do biopolímero influencia as propriedades do hidrogel produzido. WPI é formado em mais de 90% por proteínas dentre as quais a metade é composta por beta-lactoglobulina (MM = 18,4 kDa) (SHPIGELMAN et al., 2010). As cadeias de ALG, formadas pelos monômeros de ácido gulurônico e manurônico, vão aproximadamente de 35 kDa (FANG et al., 2007) até mais 700 kDa (DRAGET; BRAEK; SMIDROD, 1994). Cadeias longas como as de ALG são flexíveis, enquanto as de WPI formam matrizes mais compactas e rígidas (FANG et al., 2007).

O comportamento das esferas de hidrogéis de WPI é diferente (FIGURA 4.5), o que pode ser atribuído à diferença de mecanismos de

reticulação iônica dos biopolímeros. No caso das proteínas, os cátions de baixo número atômico se ligam aos aminoácidos mascarando suas cargas e promovendo a agregação entre as cadeias poliméricas através da remoção da água ao redor dos sítios hidrofóbicos previamente expostos pela desnaturação térmica (HAQUE; ARYANA, 2002). O Mn^{2+} é uma exceção, gerando hidrogéis de WPI tão flexíveis quanto Cu^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} . O Co^{2+} , que apresenta um raio iônico menor e um módulo de Young alto, possui propriedades mais complexas de coordenação, como é o caso de sua participação na composição da vitamina B12 (BHATTACHARYA; MISRA; HUSSEIN, 2016).

O Co^{2+} ($Z = 27$) e os cátions de números atômicos menores (Mn^{2+} , Ca^{2+}) produziram esferas de proteína significativamente mais rígidas do que com o polissacarídeo de acordo com o teste t de Student a 95% de confiança (FIGURA 4.5). Este é um atributo positivo no uso industrial de catalisadores e microrganismos encapsulados em hidrogéis, já que o material precisa manter sua integridade ao sofrer choques hidrodinâmicos ou contra as paredes dos equipamentos, e na produção de fármacos e alimentos funcionais, onde um dos dispositivos que ameaçam a integridade das esferas é o sistema digestivo. As pressões envolvidas no movimento peristáltico estão por volta de 1 e 7 kPa (GUYTON; HALL, 2006), o que causaria, por exemplo, uma deformação de no máximo 1% no tamanho de uma esfera de 2 mm com um módulo de elasticidade de 1000 kPa. Apesar de metade do teor de cálcio retido em esferas de CaALG ter sido relatada para as esferas de CaWPI (DÉAT-LAINÉ et al., 2012), o módulo de Young também deve ser diretamente proporcional a densidade (HAQUE; ARYANA, 2002). Neste estudo, o teor de ALG da solução precursora é de 3%, enquanto que a de WPI é de 11%. Logo, era de se esperar que o sistema o CaWPI apresentasse maior módulo de Young do que o CaALG, como aconteceu. Apesar de os hidrogéis feitos de biopolímeros diferentes com os cátions imediatamente maiores (Ni, Cu e Zn) não apresentaram diferença significativa, as esferas de CdWPI ($Z = 48$) chegam a ser significativamente menos rígidas que as CdALG (t de Student, $p < 0,05$).

4.3 TERMOESTABILIDADE

4.3.1 Alginato (ALG)

É importante entender o efeito do cátion divalente usado para reticular o ALG nos fenômenos de secagem (PATHAK et al., 2009) e de pirólise para a produção de retardadores de chama (ZHANG et al., 2012), carvão ativado, suportes para catalisadores (ROSS et al., 2011) e para a recuperação dos metais reticulantes por incineração após sua remoção de águas residuais (PATHAK et al., 2009) para posterior aplicação como catalisadores (ALVES; MEDEIROS; SUAREZ, 2010; REFAAT, 2011).

O alto teor de umidade das esferas prejudica a qualidade do sinal analítico da curva de TG na região de pirólise (BELLICH et al., 2011). Por isso, as partículas foram previamente secas a 30 °C e mantidas em temperatura ambiente em contato com a atmosfera do laboratório para serem compatíveis com alguns usos comerciais. A primeira fase de perda (I, TABELA 4.4) de massa das partículas secas (Temperatura de pico de perda de massa, T_{pl} , 6,5 a 12,9%) foi menor do que NaALGp (20,4%) e NaALGf (18,8%). Ou seja, a reticulação aparentemente cria poros que permitem a fácil perda de umidade, sendo que a água reincorporada é menor do que a presente na matéria-prima inicialmente seca. A umidade do ZnALG e do CdALG secos à temperatura ambiente foi relatada como próxima de 7% (PATHAK et al., 2009), o que sugere que o preparo pode alterar um pouco a umidade de equilíbrio das esferas secas, mas na mesma ordem de grandeza. A umidade de equilíbrio tem sido atribuída à retenção de água coordenada no polissacarídeo reticulado (LIU et al., 2016a; LIU et al., 2016b).

Diversas características desse sistema contribuem para a complexidade do comportamento térmico. ALG tem uma grande polidispersidade molecular. Além do fato de que apenas o monômero guluronato coordenar o cátion na gelificação, blocos reticulados de cadeias com massas moleculares maiores podem formar ligações de hidrogênio intramoleculares. Há também um aumento da atração entre as cadeias devido à presença de nuvens positivas devido a regiões ricas em conexões $M^{2+}G$ (FANG et al., 2007). A perda de massa de ALG complexado por cátions

(M²⁺ALG) revelou um segundo pico térmico (TpII) em uma temperatura muito mais baixa (Ca²⁺ = 176 °C, Zn²⁺ = 179 °C e Cd²⁺ = 186 °C) do que a observada para NaALGp (250 °C) e NaALGf (245 °C). A perda de estabilidade de M²⁺ALG foi atribuída a uma atividade catalítica dos cátions de reticulação iônica (ALVES; MEDEIROS; SUAREZ, 2010; REFAAT, 2011; LIU et al., 2014). A perda de massa total atinge níveis relativamente semelhantes até 630 °C para NaALG (pó = 66,9% e filme = 70,1%) e M²⁺ALG (Ca²⁺ = 63,9%; Zn²⁺ = 69,3% e Cd²⁺ = 77,8%). Portanto, a degradação do NaALG precisa de mais energia (maior Tp) e ocorre num intervalo menor (maior valor de DTG; TABELA 4.4; FIGURA 4.7).

M²⁺ALG apresentou um terceiro pico de temperatura de degradação (TpIII, TABELA 4.4; FIGURA 4.7). A perda de massa entre 150 e 320 °C foi atribuída anteriormente à perda de água coordenada, descarboxilação (CO₂), termodegradação de ligações glicosídicas, desidratação molecular e descarbonilação (LIU et al., 2016a). Isso explica a geração de cetonas, ácidos carboxílicos, cresol e furfural a partir do alcatrão (LIU et al., 2016b), enquanto a grande liberação de CO₂ pode ser devido à geração intermediária de oxalatos (C₂O₄), que possuem densidades diferentes: Na₂C₂O₄ (2,3 g.cm⁻³), CaC₂O₄ (2,2 g.cm⁻³) ZnC₂O₄ (7,1 g.cm⁻³) e CdC₂O₄ (8,6 g.cm⁻³). Esses oxalatos são posteriormente decompostos em seus óxidos correspondentes, liberando CO₂ (KHAIROU, 2011).

A soma das perdas de massa nas etapas I, II e III é menor para amostras reticuladas quando comparadas com NaALGp e NaALGf. Isso ocorre porque o Na₂O₂ (2,8 g.cm⁻³) permanece como um resíduo, mais leve que os oxalatos. O NaC₂O₄ é instável em temperaturas acima de 300 °C, e o Na₂O₂ formado é convertido em Na₂O (2,3 g.cm⁻³) a aproximadamente 550 °C (PAREKH et al., 2011).

Os produtos comerciais (pós) apresentaram picos com menos ruído e sem ressaltos, indicando o alto grau de pureza dos compostos (FIGURAS 4.7 e 4.9). A perda de massa de NaALGf (31,2%, TpII + III = 245 °C) ocorreu entre 210 °C e 282 °C (TABELA 4.4 e FIGURA 4.7), compatível com os relatos anteriores (39% e Tp = 242 °C) envolvendo filmes formados usando a mesma matriz (LIU et al., 2014; LIU et al., 2016a). Este processo também revelou um pico inicial mal definido em torno de 228 °C, indicando a perda de radicais

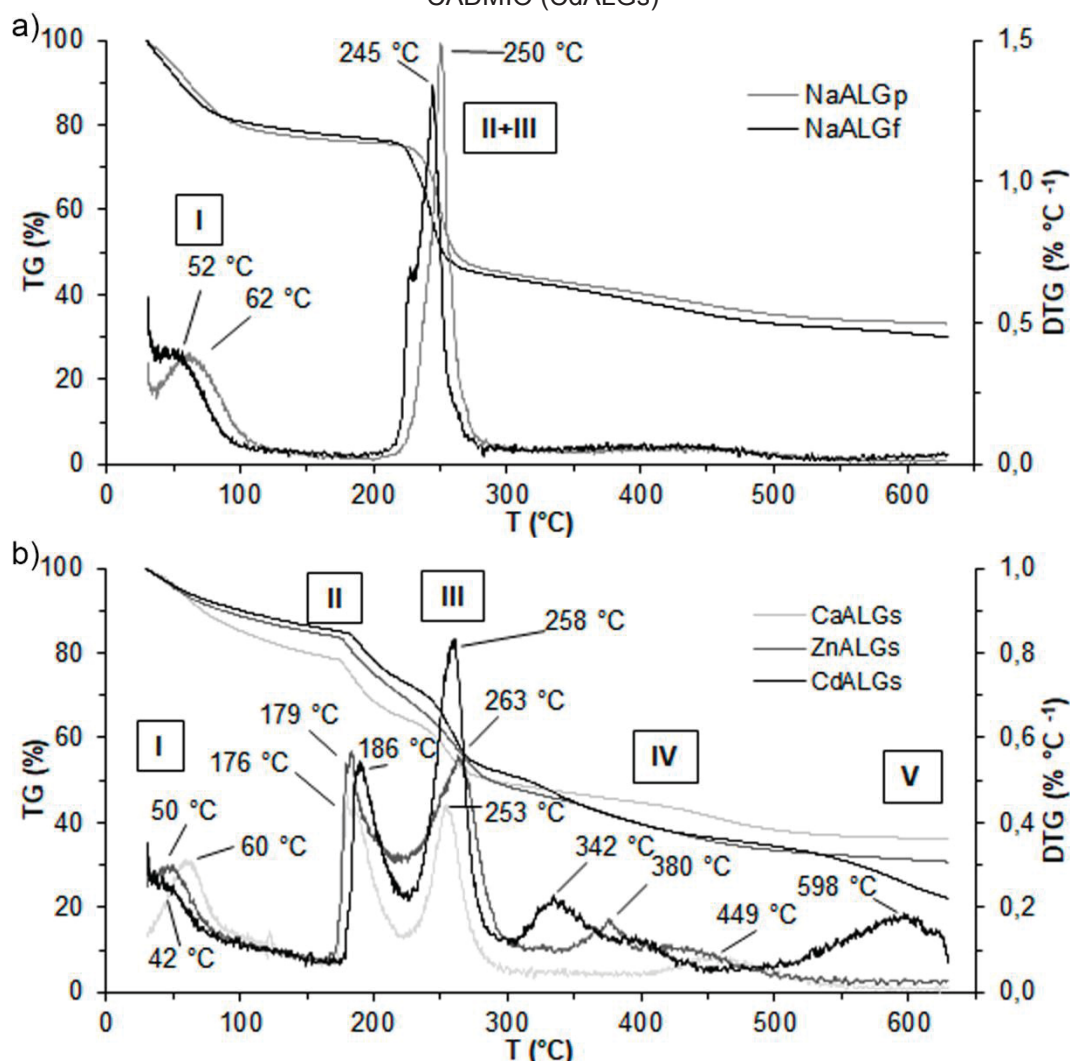
termolábeis. O pico de temperatura foi ligeiramente superior para NaALGp (TpII + III = 250 °C), fato que pode ser atribuído ao aspecto granular do material, que dificulta a perda de umidade e possivelmente a perda de radicais moleculares do núcleo do biopolímero.

TABELA 4.4 – INTERVALO DE TEMPERATURA E PERDA DE MASSA (Δm) PARA CADA ETAPA DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA (I - V)

Matriz	I	Δm (%)	II+III	Δm (%)	I+II+III	Δm (%)	Total	Δm (%)
NaALGp	30-102	20,4	209-282	29,4	30-282	49,8	30-630	66,9
NaALGf	30-94	18,8	210-282	31,2	30-282	50,0	30-630	70,1
CaALGs	30-87	12,9	171-298	29,5	30-298	42,4	30-630	63,9
ZnALGs	30-82	9,5	168-305	21,6	30-305	45,4	30-630	69,3
CdALGs	30-66	6,5	176-288	32,5	30-288	39,0	30-630	77,8

Matriz	I	Δm (%)	II+III	Δm (%)	V	Δm (%)	Total	Δm (%)
WPIp	30-110	7,1	140-307(+IV)	27,4	307-555	42,1	30-630	78,5
dWPIf	30-160	12,3	195-315(+IV)	28,3	315-507	36,5	30-630	81,1
CadWPIs	30-178	12,4	186-243	5,5	243-518(+IV)	56,0	30-630	76,9
ZndWPIs	30-152	12,4	186-237	3,6	237-504(+IV)	57,5	30-630	77,3
CddWPIs	30-176	13,1	186-247	4,9	247-515(+IV)	57,6	30-630	77,4

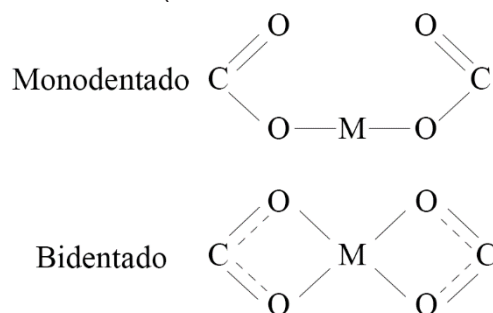
FIGURA 4.7 –TG E DTG PARA: a) ALGINATO DE SÓDIO NA FORMA EM PÓ (NaALGp) E EM FILME (NaALGf); E b) PARA AS ESFERAS DE CÁLCIO (CaALGs), ZINCO (ZnALGs) E CÁDMIO (CdALGs)



FONTE: O autor (2021).

Zn^{2+} ($r = 74$ pm) exibiu o menor TplI e a maior perda de massa na etapa II em comparação com os cátions com um raio iônico maior (Cd^{2+} , $r = 97$ pm; Ca^{2+} , $r = 100$ pm), mostrando um maior efeito catalítico na degradação térmica do biopolímero. Uma vez que cátions maiores têm uma afinidade maior para cadeias de ALG (SAID; HASSAN, 1993; SIKORSKI et al., 2007; PATHAK et al., 2009), é mais difícil quebrar a rede formada. Em outras palavras, a degradação requer uma temperatura mais alta para prosseguir. Isso ocorre porque ambos os oxigênios de cada grupo carboxila dos monômeros ALG vizinhos quelam grandes cátions (coordenação bidentada, FIGURA 4.8), enquanto o Zn só pode coordenar com os oxigênios da hidroxila (coordenação monodentada) (PATHAK et al., 2009). Na etapa III, a porção residual de $M^{2+}ALG$ é degradada a uma temperatura mais alta em comparação com as amostras de NaALG (FIGURA 4.7). Isso pode ser explicado pela força de ligação entre os cátions divalentes e o ALG (LIU et al., 2014), demonstrando que a reticulação iônica melhora a resistência térmica e, conseqüentemente, as propriedades retardadoras de chama de parte do biopolímero.

FIGURA 4.8 – TIPOS DE COORDENAÇÃO DOS GRUPOS CARBOXÍLICOS DO ALG COM UM CÁTION METÁLICO GENÉRICO (M^{2+}): MONODENTADA (POR EXEMPLO Zn^{2+} , UM CÁTION PEQUENO) E BIDENTADA (POR EXEMPLO Ca^{2+} OU Cd^{2+} , CÁTIONS GRANDES)



FONTE: O autor (2021).

Em temperaturas acima de 300 °C (FIGURA 4.7), os oxalatos são convertidos em óxidos (SAID; HASSAN, 1993; LIU et al., 2014). O comportamento de perda de massa dos oxalatos depende do cátion associado (LIU et al., 2016a). O comportamento das amostras nesta faixa de temperatura foi semelhante às curvas de TG relatadas anteriormente de oxalatos puros. O CdC_2O_4 apresentou dois picos de degradação (FIGURA 4.7, etapas IV e V), devido à decomposição em carbonato do Cd ($CdCO_3$, 342 °C) e, posteriormente, em CdO (598 °C) (GEORGIEVA; VLAEV; GYUROVA, 2013).

No caso do CaALGs, a única transformação é a degradação do CaC_2O_4 em CaCO_3 ($T_{pIV} = 449\text{ }^\circ\text{C}$). A formação de CaO ocorre após $630\text{ }^\circ\text{C}$ (SHEDAM et al., 2016). Esta amostra exibiu o maior teor de cinzas a $630\text{ }^\circ\text{C}$. Isso se deve ao menor efeito catalítico do Ca^{2+} na volatilização do resíduo devido à sua menor mobilidade: $\text{Ca}^{2+} < \text{Na}^+ < \text{Zn}^{2+} < \text{Cd}^{2+}$. Além disso, CaCO_3 (100 g.mol^{-1}) é o resíduo com a segunda maior massa molar ($\text{Na}_2\text{O} = 62\text{ g.mol}^{-1}$; $\text{ZnO} = 81\text{ g.mol}^{-1}$; $\text{CdO} = 128\text{ g.mol}^{-1}$) (PATHAK et al., 2009; ROSS et al., 2011; LIU et al., 2014). No caso do ZnALGs, o ZnC_2O_4 é transformado diretamente em ZnO a uma temperatura mais baixa (etapa IV - $380\text{ }^\circ\text{C}$), conforme descrito anteriormente (SAID; HASSAN, 1993; RAJ; JOSHI; VARMA, 2011).

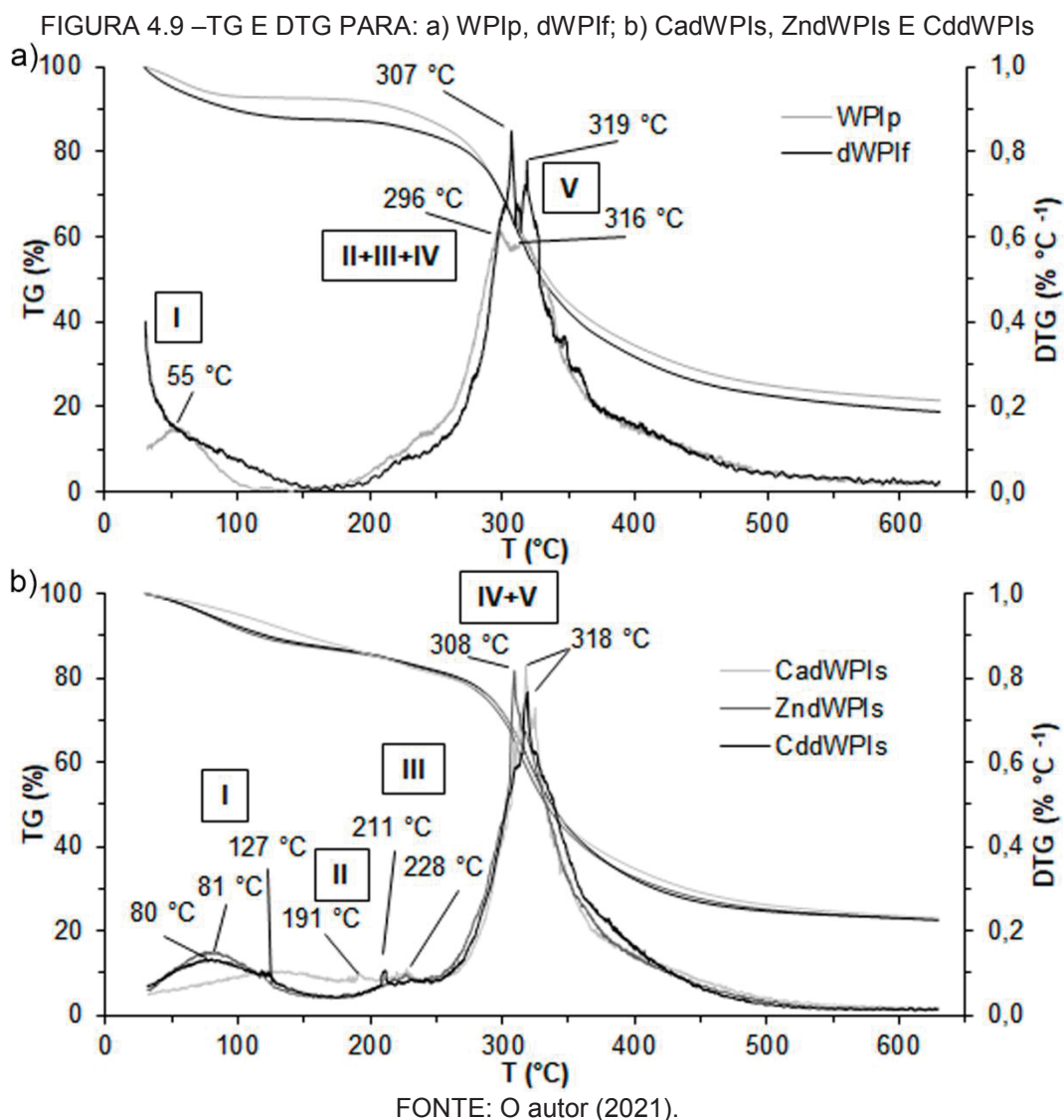
O resíduo no final do ciclo era preto, um fato que pode ser atribuído à formação de carbono em vez de CO_2 por causa da atmosfera de nitrogênio puro. Outros compostos incluem os produtos inorgânicos das matrizes: Na_2O , que é o contraíon do ALG puro e pode não ter sido substituído completamente durante a complexação, e CaCO_3 , ZnO e CdO quando cátions foram usados (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2011).

4.3.2 Proteína isolada de soro de leite (WPI)

A perda de massa abaixo de $110\text{ }^\circ\text{C}$ para WPIp (7,1%, TABELA 4.4) foi semelhante ao teor de umidade descrito em sua embalagem (6,4%). Após a hidratação, desnaturação e produção do filme por secagem (dWPIf), o teor de água retida (12,3%) é maior e o processo segue até atingir $160\text{ }^\circ\text{C}$. Portanto, a água apresenta uma interação mais intensa com as frações hidrofílicas da molécula. Esse comportamento é esperado devido à exposição dos aminoácidos ocasionada pela desnaturação e consequente formação de ligações de hidrogênio. O mesmo fenômeno foi observado para a proteína reticulada, que apresentou remoção de água semelhante (12,4% a 13,1%), retendo umidade em temperaturas ainda mais elevadas ($152\text{ }^\circ\text{C}$ a 178°C). Estruturas de folhas β intermoleculares são rearranjadas pela presença de cátions, agregando proteínas por ligações hidrofóbicas, dissulfeto e de hidrogênio (RAMOS et al., 2014). Esta nova conformação cria um reservatório onde a água pode ser ocluída. Agentes plastificantes como glicerol e sorbitol também podem aumentar a retenção de moléculas de água na produção de

filmes biodegradáveis e produtos encapsulados (BARRETO; PIRES; SOLDI, 2003; SANTANA; KIECKBUSCH et al., 2013; DESAI; SCHWENDEMAN, 2013; AZEVEDO et al., 2015). Nestes casos, a água forma ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila presentes nessas moléculas, dificultando sua remoção. O uso de WPI pode ter a ação similar à dos plastificantes devido à sua maior capacidade de retenção de água.

Para a proteína, as maiores taxas de perda de massa ocorreram durante as etapas IV e V, entre 296 e 319 °C (FIGURA 4.9). Vários eventos de fragmentação molecular ocorrem simultaneamente, com taxas máximas de degradação da cadeia de aminoácidos muito próximas (etapas II, III, IV e V). A degradação do WPIp começou na temperatura mais baixa (140 °C, TABELA 4.4) e sua velocidade máxima de degradação foi a única observada antes de 300 °C em comparação com outras proteínas, embora tenha sido maior do que NaALGp (TpII + III = 250 °C) e a amostra M²⁺ALG que apresentou o pico de temperatura mais alto (ZnALGs, TpIII = 263 °C). Isso demonstra que tanto a desnaturação a 80 °C quanto a subsequente reticulação de cátions divalentes aumentam a estabilidade térmica das matrizes WPI. Após a reticulação, as etapas IV e V tornaram-se um único evento. Cátions maiores (Ca²⁺ e Cd²⁺) exibiram um pico de temperatura mais alto (318 °C para ambos) do que Zn²⁺ (308 °C). Também é possível observar que pequenas moléculas voláteis ou radicais fragmentados causam uma perda de massa antecipada (etapas II e III) que se funde com o início da etapa IV nas curvas DTG de WPIp e dWPIf. O mesmo comportamento também foi relatado após a desnaturação do WPI bruto com ácido cítrico, que também apresenta um pico principal de degradação acima de 300 °C e um menor logo abaixo dessa temperatura (AZEVEDO et al., 2015). As etapas II e III são predominantemente um resultado da remoção e volatilização de grupos funcionais característicos de aminoácidos de proteína (descarboxilação e desaminação), seguido pela quebra das ligações peptídicas nas etapas IV e V (REN; ZHAO, 2012; LIU; YU; HUANG, 2018).



O resíduo da degradação das amostras WPI era mais volumoso e mais difícil de remover do cadinho do que o ALG. O aquecimento das proteínas do soro em processos industriais forma uma incrustação nas paredes dos equipamentos, conseqüentemente diminuindo o tempo de operação dos trocadores de calor em decorrência do tempo adicional para limpeza dos agregados proteicos (WIJAYANTI; BANSAL; DEETH, 2014). Desconsiderando a etapa I, o percentual de degradação da massa sólida até atingir a temperatura de 630 °C diminui após a desnaturação térmica (WPIp = 71,4%; dWPIf = 68,8%), mostrando que a exposição dos grupos hidrofóbicos aumenta a interação entre as cadeias, dificultando a degradação térmica da matriz. A agregação subsequente, causada por mudanças conformacionais induzidas pelos íons metálicos levando a uma maior exposição de sítios de ligação

hidrofóbicos, intensifica a interação entre as cadeias (HAQUE; ARYANA, 2002), tornando mais difícil converter os resíduos em formas voláteis e resultando em uma fração degradada inferior (entre 64 e 65%).

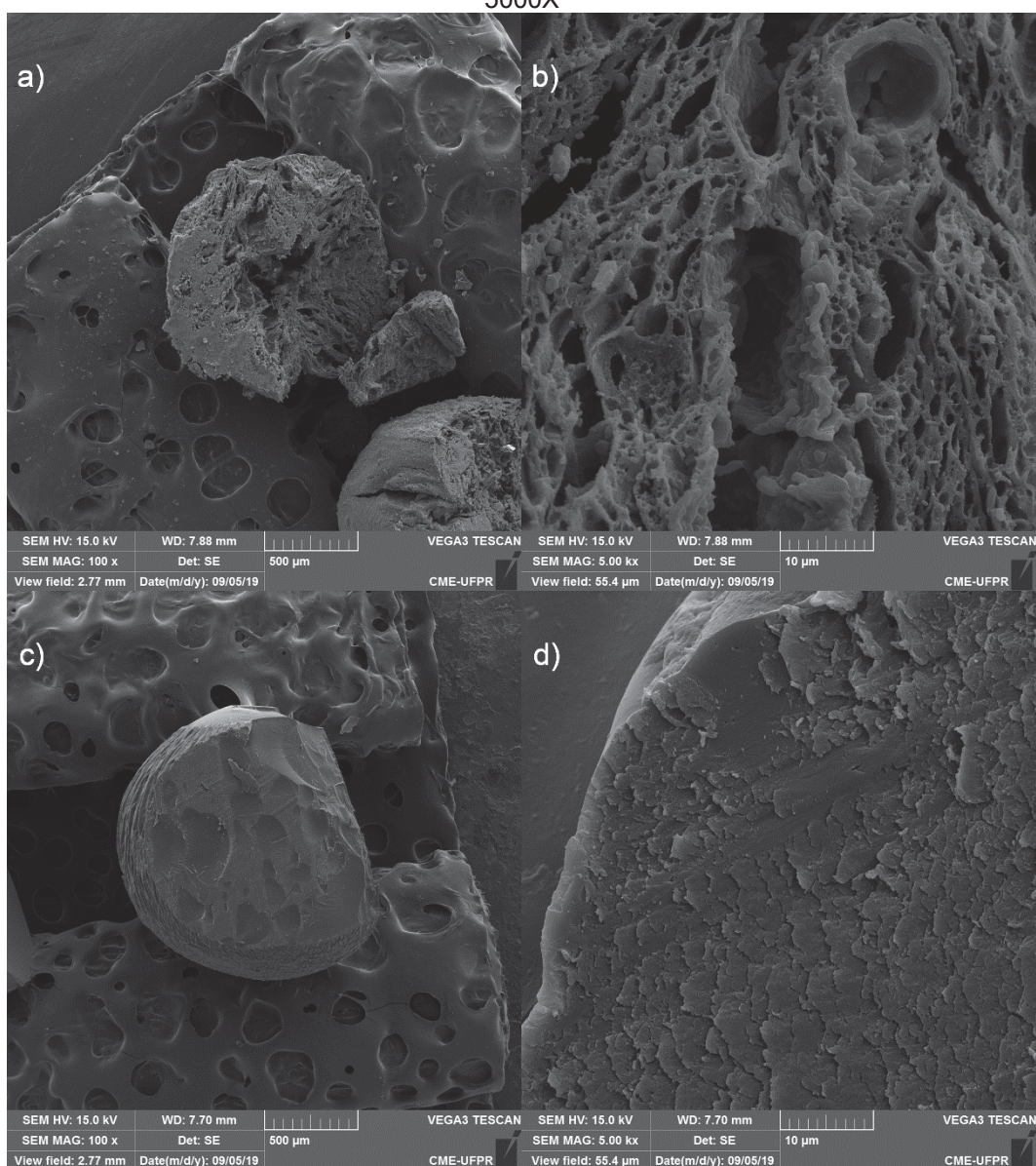
Ainda, a umidade de equilíbrio de CaALGs foi similar a todos as formas de WPI complexadas (CaALGs, ZnWPIs e CdWPIs), enquanto que a esferas produzidas com ZnALGs e CdALGs foram menores. Isto sugere que ao contrário do WPI, o tipo de cátion parece afetar os poros do complexo MALG; o que deve ser estudado futuramente.

4.3.3 Estimativa da porosidade de carvão ativado produzido com esferas de ALG e WPI

A pirólise da matéria orgânica, descrita acima para ALG e WPI, faz parte do processo de produção de carvão ativado para adsorção e suporte de catalisador. Muitos resíduos alimentares foram transformados com sucesso em adsorventes de carvão ativado, como por exemplo, cascas de mandioca (SUDARYANTO et al., 2006), casca de caroço de damasco (SOLEIMANI; KAGHAZCHI, 2008) e lodo provindo de processos de múltiplos tipos de alimentos (MAHAPATRA; RAMTEKE; PALIWAL, 2012). O CaALG já foi utilizado como agente encapsulante de carvão ativado. Ele pode ser usado para a remoção de corantes como rodamina 6G e azul de metileno de águas residuais de indústrias têxteis (ANNADURAI; JUANG; LEE, 2012; HASSAN; ABDEL-MOHSEN; FOUDA, 2014a) e elementos tóxicos como arsênio (HASSAN; ABDEL-MOHSEN; ELHADIDY, 2014b), mas não encontramos nenhum relato de carvão ativado produzido a partir de hidrogéis de ALG ou WPI. Em aplicações de catálise, a presença de catalisadores de íons metálicos nos biopolímeros reticulados antes de transformá-los em carvão ativado pode evitar a necessidade de sua adição posterior, que é o procedimento comum. Dentre os exemplos de aplicações encontram-se o uso de cobre suportado em, respectivamente, carvão ativado, acetato de cálcio e CaO para a degradação de corantes de águas residuais, a gaseificação do carbono com uso de vapor e a transesterificação do óleo de palma para a produção de biodiesel (DABROWSKI et al., 1997; HU et al., 1999; WAN; HAMEED, 2011).

Embora apresente uma área de superfície específica muito menor em comparação com outras descrições de carvão ativado (900 a 1300 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$) (SUDARYANTO et al., 2006; SOLEIMANI; KAGHAZCHI, 2008), o resultado para CaALGs (190,0 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$) foi imensamente maior do que para CadWPIs (4,3 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$). Isso pode ser devido aos poros formados após a reticulação iônica e secagem do CaALGs, que não foram observados no CadWPIs (FIGURA 4.10). A desnaturação do WPI não cria poros em CadWPIs como observado em CaALGs, o que descarta aplicações que apresentem esse requisito.

FIGURA 4.10 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE: a) CaALGs COM AUMENTO DE 100X E b) 5000X; c) CadWPIs COM AUMENTO DE 100X E d) 5000X



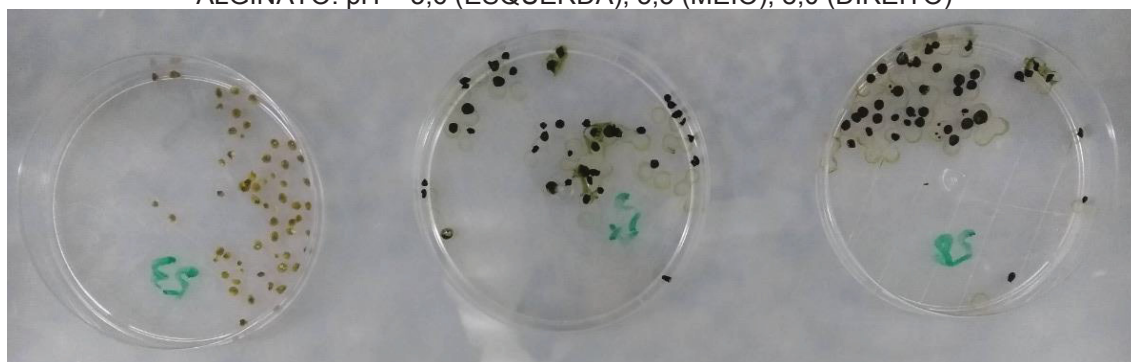
FONTE: O autor (2021).

4.4 ENCAPSULAMENTO DE EXTRATO DE ERVA-MATE

4.4.1 Produção das esferas

Como o uso de pH 5,5 e 8,0 na produção de ALGmp resultou em esferas de cor escura, o pH de 3,6 foi selecionado, pois não foi observada oxidação do EXT durante a secagem nesta condição (FIGURA 4.11). Este resultado está em acordo com a instabilidade de alguns compostos fenólicos em meio alcalino relatada previamente (FRIEDMAN; JÜRGENS, 2000).

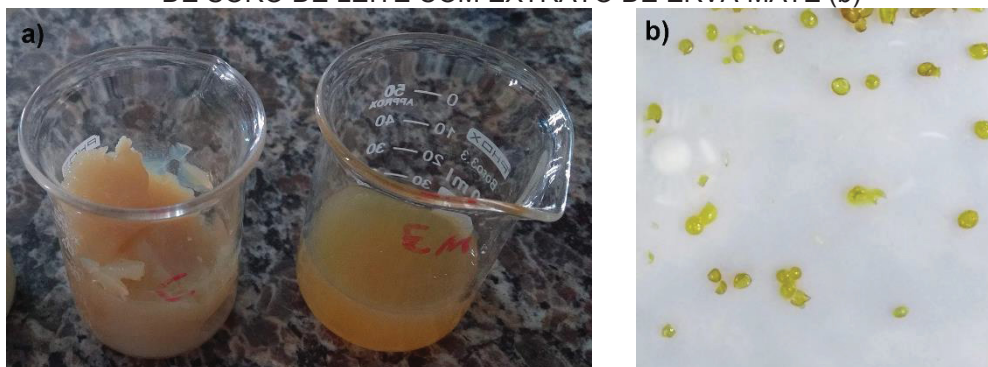
FIGURA 4.11 – INFLUÊNCIA DO pH DA SOLUÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO SOBRE A OXIDAÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE ENCAPSULADO EM MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO: pH = 3,6 (ESQUERDA); 5,5 (MEIO); 8,0 (DIREITO)



FONTE: O autor (2021).

O tratamento de pré-aquecimento do WPI foi conduzido primeiramente de acordo com estudos anteriores (11%, 80 °C por 40 min, DÉAT-LAINÉ et al., 2012), substituindo a água destilada pelo EXT. No entanto, a presença de EXT levou à gelificação da solução, dificultando sua posterior extrusão para a solução gelificante de CaCl₂ (FIGURA 4.12a). A redução da concentração de WPI para 9,6% e da temperatura para 75 °C resultou em uma solução viscosa que possibilitou a produção de WPImp (FIGURA 4.12b).

FIGURA 4.12 –PROTEÍNA ISOLADA DE SORO DE LEITE PRÉ-AQUECIDA EM SOLUÇÃO DE EXTRATO DE ERVA-MATE (a): 11% DE PROTEÍNA AQUECIDA A 80 °C (ESQUERDA); 9,6% DA PROTEÍNA AQUECIDA A 75 °C (DIREITO). HIDROGÉIS DE PROTEÍNA ISOLADA DE SORO DE LEITE COM EXTRATO DE ERVA-MATE (b)



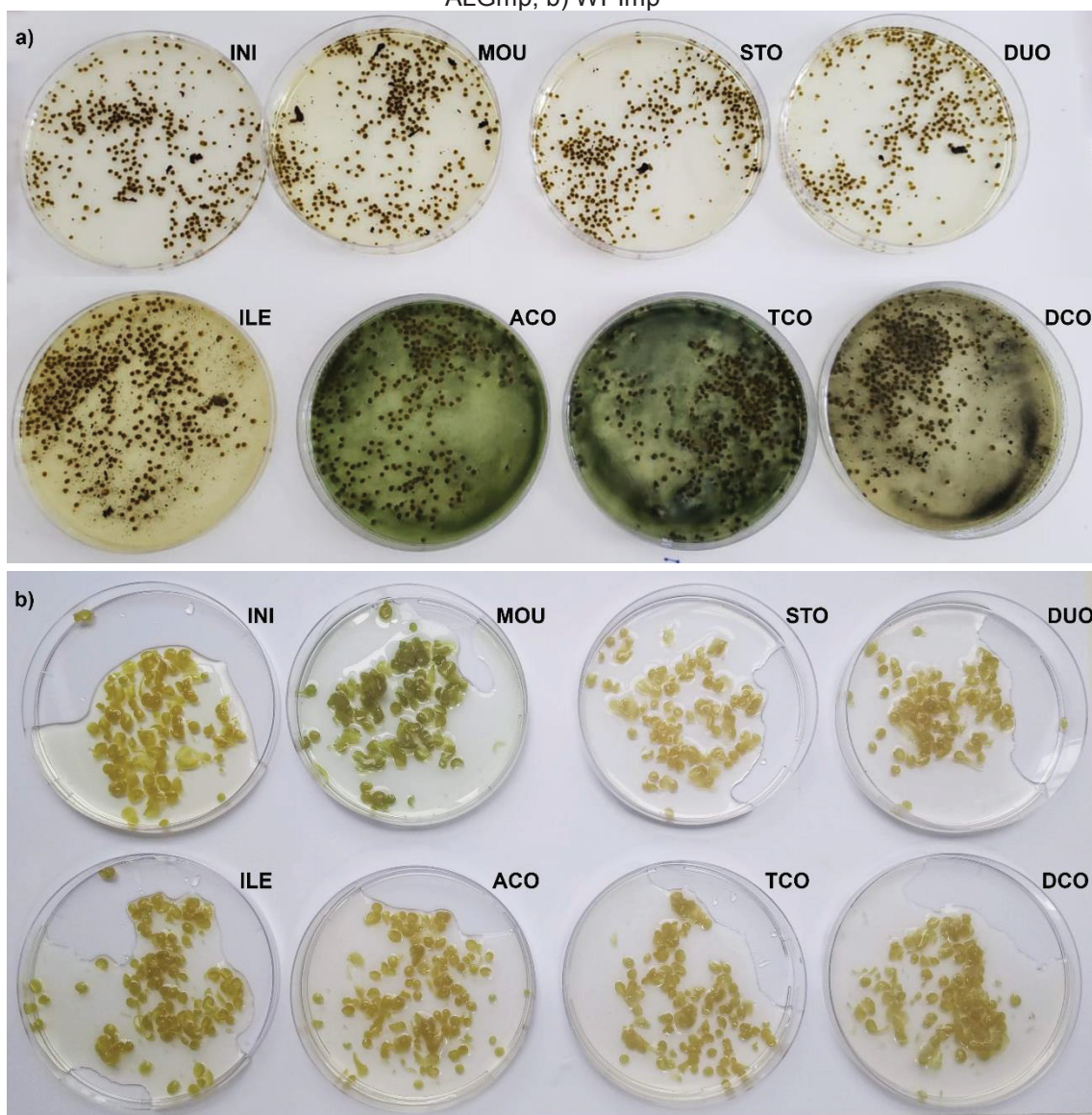
FONTE: O Autor (2021).

FONTE: O Autor (2021).

4.4.2 Simulação da liberação gastrointestinal *in vitro*

O processo de digestão consiste em um conjunto de mecanismos pelos quais os componentes dos alimentos são transformados enzimaticamente em substâncias dissolvidas físico-quimicamente no lúmen digestivo para serem assimiladas pelo corpo (Seção 3.4.2 FIGURA 3.3). A simulação do processo digestivo não dissolveu ou mesmo desagregou as micropartículas, que podem ter retido parte dos antioxidantes (FIGURA 4.13). Na boca (MOU), a manutenção da integridade das partículas de WPI ou de ALG era esperada devido ao tipo de catálise específica da α -amilase, ou seja, seletiva para hidrólise de amido em maltose. Da mesma forma, o ALG também resiste à ação de enzimas proteolíticas, pepsina (STO) e pancreatina (DUO), mas esse comportamento não era esperado para as esferas de WPImp (O'NEIL et al., 2015). Este fato pode ser atribuído às mudanças estruturais durante a operação de desnaturação e, principalmente, secagem das esferas, bem como a simplicidade do sistema de simulação da digestão, principalmente devido à falta de ação cooperativa das células bacterianas presentes no sistema *in natura* (MACFARLANE; CUMMINGS; ALLISON, 1986). Além disso, recentemente foi reportada uma interação entre o ácido tânico (presente na erva-mate) e a albumina sérica bovina (presente na proteína de soro de leite) que diminui a digestibilidade da proteína, sendo que a presença de cátions divalentes (presentes nos hidrogéis avaliados aqui) contribuiu para essa interação (KASPCHAK et al., 2019).

FIGURA 4.13 – ESFERAS APÓS SIMULAÇÃO DE DIGESTÃO GASTROINTESTINAL: a) ALGmp; b) WPImp



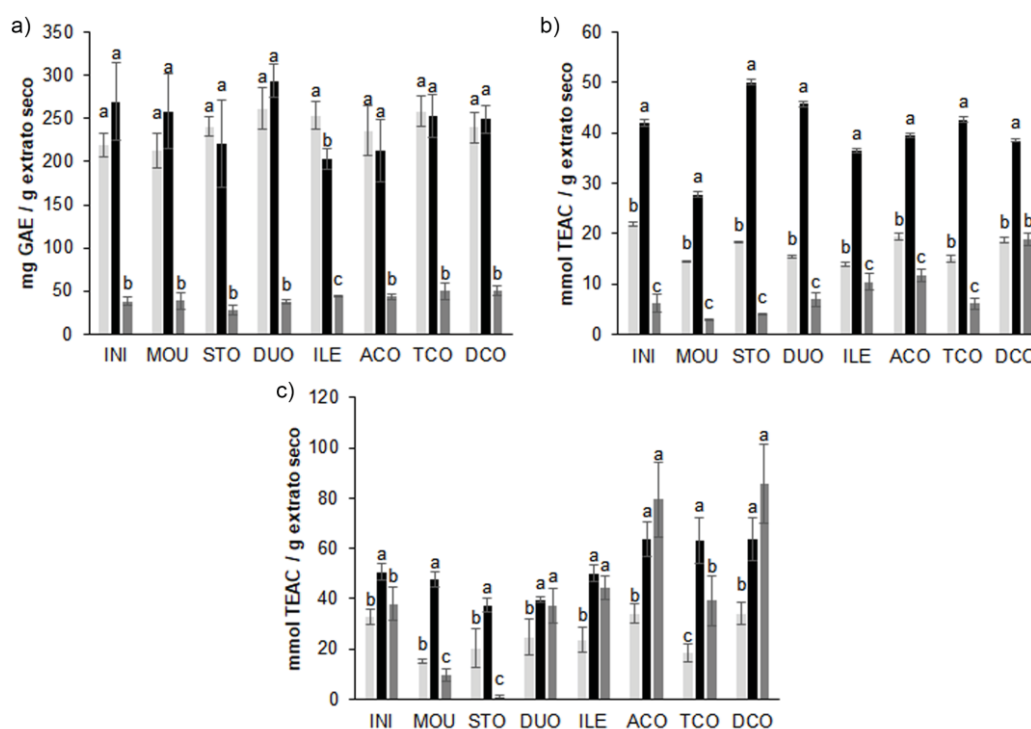
FONTE: O autor (2021).

4.4.3 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

Em geral, o sinal da atividade antioxidante (AA) das substâncias bioativas liberadas pelo ALGmp foi maior do que o observado para WPImp, exceto no duodeno, íleo, cólon ascendente e descendente pela metodologia ABTS (FIGURA 4.14). Essa diferença não pode ser atribuída ao pré-tratamento do WPI por desnaturação a 75 °C, pois já foi relatado que a torra das folhas de erva-mate mantém os componentes antioxidantes (BRACESCO et al., 2011). Por outro lado, ALGmp tem uma porosidade maior (FIGURA 4.10; FIGURA 4.15b e 4.15d) e uma distância de difusão menor (FIGURA 4.15a e 4.15c) do

que WPImp, pois encolheu para um formato de hemácia após a secagem. Embora a umidade de ALGmp (8,9%) fosse menor do que WPImp (10,2%), o polissacarídeo é conhecido por reter água coordenada durante a reticulação com cálcio e liberá-la apenas em temperaturas mais altas (LIU et al., 2016a; LIU et al., 2016b). A aparente menor porosidade do WPImp aprisiona os compostos antioxidantes em seu núcleo, diminuindo sua difusão para o meio digestivo, o que justifica sua menor liberação de compostos fenólicos totais (TPC). Essa redução da porosidade e a diminuição de liberação foram relatadas anteriormente quando amido e quitosana foram utilizados em conjunto com o ALG para encapsular o extrato de erva-mate (DELADINO et al., 2008; LÓPEZ-CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2014).

FIGURA 4.14 – SIMULAÇÃO DA PRESENÇA DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DURANTE A DIGESTÃO DO EXTRATO PURO E DOS HIDROGÉIS CONTENDO O EXTRATO



FONTE: O autor (2021).

a) TPC: compostos fenólicos totais; GAE: equivalente de ácido gálico;

b) DPPH; TEAC: capacidade antioxidante equivalente ao trolox;

c) ABTS;

EXT: extrato de erva-mate, cinza claro;

ALGmp: micropartículas de alginato contendo extrato de erva-mate;

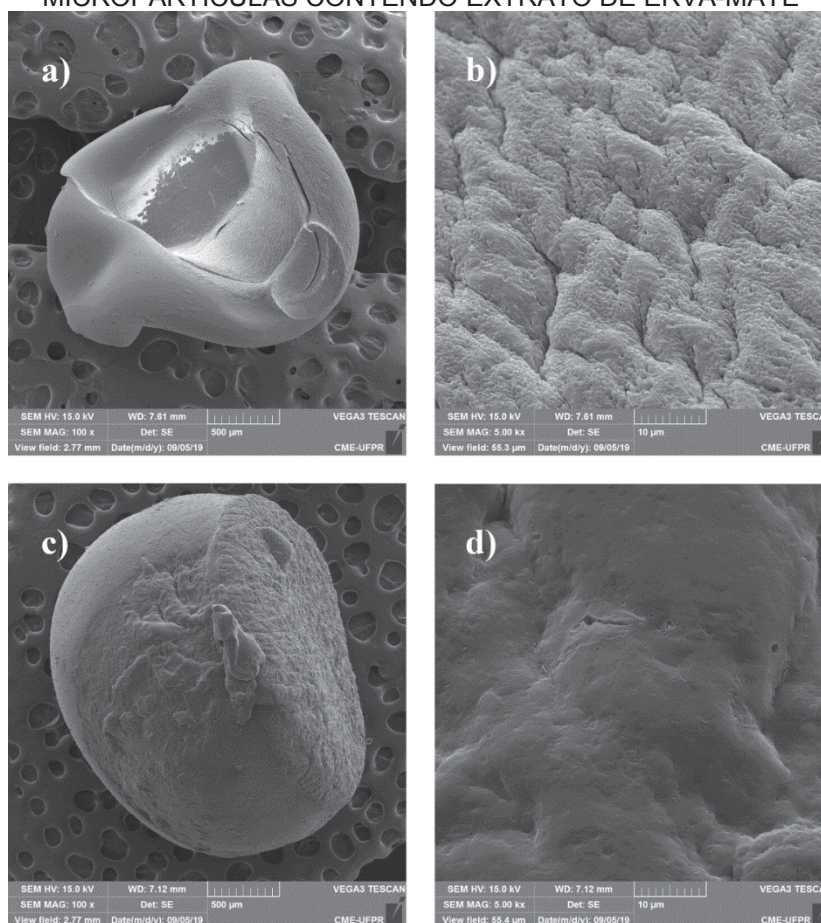
WPImp: micropartículas de proteína de soro de leite contendo extrato de erva-mate;

INI: início; MOU: boca; STO: estômago; DUO: duodeno; ILE: íleo; ACO: cólon ascendente;

TCO: cólon transverso; DCO: cólon descendente;

a,b,...letras iguais significam que não há diferença significativa entre o mesmo método e diferentes partes do sistema digestivo (n=3);

FIGURA 4.15 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO EXTRATO DE ERVA-MATE



FONTES: O autor (2021).

a) e b) alginato (ALGmp) com ampliação de 100X e 5000X
 c) e d) proteína de soro de leite (WPImp) com ampliação de 100X e 5000X.

TPC foi preservado ($p < 0,05$) apenas por ALGmp (FIGURA 4.14a). A AA do mate foi atribuída à alta concentração de polifenóis (ácido 3-cafeoilquínico, ácido 4-cafeoilquínico, ácido 5-cafeoilquínico e ácido 3,5-cafeoilquínico; representando 82%) e outros compostos fenólicos, como flavonoides (10%) e rutina (7%) (MATEOS et al., 2008).

WPImp não foi capaz de permitir a difusão de moléculas fenólicas presentes em EXT, embora tenha sido relatado que ambas as hidrosferas (ALG e WPI) permitem a migração de grandes biomoléculas, como a insulina (CENDON et al., 2018). Por outro lado, a eficiência de encapsulação do ALG relatada anteriormente mostrou que aproximadamente metade dos compostos bioativos de EXT foram retidos na esfera. Isso sugere que o ALG não interage molecularmente com tais fenóis, enquanto o WPI os retém pela interação com

seus aminoácidos, possivelmente por ligação de hidrogênio, aromaticidade ou reação ácido-base de Lewis.

Para a estimativa de TPC, o conteúdo de compostos antioxidantes liberados na boca foi semelhante aos demais compartimentos do sistema digestivo. Portanto, não houve contribuição adicional devido à presença de enzimas, eletrólitos e surfactantes adicionais, ou seja, a liberação ocorre inteiramente em condições orais. Essa é uma diferença em relação a relatos anteriores, que afirmam que a liberação da maioria dos compostos antioxidantes da erva-mate das micropartículas de ALG ocorria no ambiente ácido do estômago (DELADINO et al., 2008; LÓPEZ-CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2014). Além disso, o TPC liberado do ALGmp foi igual ao conteúdo de EXT na maioria das seções gastrointestinais, exceto no ILE (FIGURA 4.15).

Para a metodologia DPPH (FIGURA 4.14b), o ALG foi essencial para proteger as moléculas antioxidantes hidrofílicas fenólicas liberadas, que deveriam ser degradadas em poucos dias se não encapsuladas. O WPI foi ineficiente para a neutralização desse radical específico, embora no cólon descendente seu resultado tenha sido semelhante ao observado para EXT. ALGmp protegeu EXT durante o armazenamento antes do teste (50 dias), mas o pH mais baixo para ALG + solução EXT gotejada (pH = 3,6), assim como EXT (pH = 5,0) também pode intensificar o sinal analítico para a metodologia DPPH (OLIVEIRA, 2015), o que justificaria o nível superior para essas amostras em relação à solução WPI + EXT (6,4) ao utilizar esta metodologia específica. Os resultados do DPPH mostram que a liberação de compostos antioxidantes foi maior no ambiente gástrico no caso do ALGmp (FIGURA 4.14b), corroborando estudos anteriores que aplicaram a mesma metodologia (DELADINO et al., 2008; LÓPEZ-CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2014). No entanto, como mencionado antes, a presença de ácidos pode superestimar essa propriedade. Mesmo considerando este efeito, o WPImp apresentou maior atividade antioxidante do DPPH nos cortes intestinais quando comparado ao ambiente do estômago, exceto para o cólon transverso, e a atividade foi igual a EXT no DCO.

Para a metodologia ABTS, ALGmp foi geralmente semelhante ao WPImp, mostrando uma maior AA em MOU, STO e TCO, o que está de acordo com estudos anteriores (DELADINO et al., 2008, LÓPEZ-CÓRDOBA;

DELADINO; MARTINO, 2014). O fato de o radical ABTS identificar não apenas compostos hidrofílicos, mas também hidrofóbicos (GUPTA, 2015; FLOEGEL et al., 2011), sugere que existem outras famílias de moléculas com a capacidade de proteger contra a oxidação. Além disso, o WPImp melhorou a AA do EXT a partir do ILE, revelando que o uso do WPImp é conveniente para disponibilizar os antioxidantes no cólon, onde esterases celulares e microbianas transformam ácidos hidroxicinâmicos em ácido cafeico, que pode então ser absorvido pela corrente sanguínea (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007), disseminando os efeitos benéficos por todo o corpo.

Concluindo, os compostos antioxidantes presentes em EXT foram preservados pelo ALGmp e pelo WPImp. A operação de secagem, assim como a de desnaturação térmica do WPI antes da esferificação, não causou perda estatisticamente significativa de compostos antioxidantes. Isso é compatível com o relato de que a produção de chá de erva-mate torrado (com temperaturas de processo muito superiores) não causa a perda de suas propriedades antioxidantes (BRACESCO et al., 2011). ALGmp protegeu os compostos fenólicos, detectados pelo método Folin-Ciocalteu. Por outro lado, a AA com ABTS das micropartículas foi maior do que EXT puro no duodeno simulado e seções intestinais subsequentes.

Esses resultados revelam que a produção de um alimento funcional inovador a base de WPI pode ser uma forma de valorizar esse resíduo da indústria de queijaria ao disponibilizar compostos promotores da saúde humana. Alternativamente, um produto similar à base de ALG também pode ser produzida. Estudos *in vivo* devem ser desenvolvidos para complementar o conhecimento.

CONCLUSÕES

Os hidrogéis produzidos com alginato por gotejamento são geralmente maiores, mais esféricos e mais translúcidos do que os produzidos com proteína de soro de leite. As esferas de proteína são opacas e, assim como as de alginato de zinco, chumbo, cobre ou cobalto, apresentaram as maiores absorvâncias de radiação ultravioleta, o que pode proteger microrganismos ou compostos sensíveis encapsulados. Por outro lado, as esferas com baixa absorvância de ultravioleta são úteis para aplicações de fotocatalise. O gluconato de cálcio e o cloreto de zinco estão entre os sais que produziram os hidrogéis de alginato mais transparentes à luz visível. Este é um ponto positivo para curativos de alginato, por permitir uma avaliação clínica visual da regeneração do tecido, além do efeito inibidor de crescimento de microrganismos do zinco.

Os cátions com maior número atômico produziram esferas de alginato mais resistentes e o inverso foi observado para a proteína de soro de leite devido aos mecanismos distintos de interação envolvidos na reticulação iônica dos biopolímeros. Os hidrogéis de proteína de soro de leite reticulada com sais de cálcio e com cloretos de cobalto e manganês são os mais rígidos. No caso do alginato, maiores resistências mecânicas foram observadas com uso dos sais de cádmio, zinco, chumbo, cobre e estrôncio, bem como com o gluconato de cálcio. Esta é uma qualidade desejável em hidrogéis, uma vez que o material deve manter sua integridade durante sua aplicação como adsorvente, curativo ou durante sua digestão quando usado para fins alimentares ou farmacêuticos.

Os hidrogéis de proteína retiveram umidade até uma temperatura maior (180 °C) que os de alginato (110 °C), o que pode ser benéfico para as características mecânicas de filmes biodegradáveis e produtos encapsulados em aplicações de alta temperatura. Nos alginatos foi possível observar a degradação dos resíduos das cadeias poliméricas em oxalatos, carbonatos e óxidos, o que possibilita a recuperação dos cátions divalentes. Infelizmente, a degradação dos hidrogéis de proteína não foi tão organizada. A proteína de soro de leite apresentou maiores temperaturas de pico de degradação do que o alginato (todos acima de 296 °C), indicando a maior estabilidade térmica da

proteína, sugerindo sua aplicação como material de retardado de chama e para a produção de filmes biodegradáveis assim como já é sugerido para o alginato. Dentre os hidrogéis de alginato, o de cálcio apresentou a maior umidade e reteve umidade até a maior temperatura. O hidrogel de alginato de zinco foi o mais termolábil e teve a maior perda de massa durante a degradação do biopolímero, provavelmente devido a seu menor raio atômico e consequente menor interação com o alginato. Tanto a desnaturação térmica quanto a subsequente reticulação com cátions divalentes aumentam a estabilidade térmica das proteínas de soro de leite.

O alginato de cálcio tem área superficial importante suficiente para ser usado para a produção de carvão ativado para aplicações de adsorção e catálise, as quais devem ser mais profundamente estudadas. A pirólise de esferas de proteína de soro de leite produzidas com cálcio neste trabalho não produziu poros para que seja plausível sua aplicação como carvão ativado.

Na produção das esferas de alginato com extrato aquoso de erva-mate, o pH ácido de 3,6 foi o único que evitou a oxidação do extrato durante a secagem dos hidrogéis. Foi necessário diminuir a concentração de proteína de soro de leite, a temperatura e o tempo que vinham sendo usados no tratamento térmico da mistura da proteína com o extrato de erva-mate para viabilizar o posterior gotejamento e a esferificação. Também foi necessário adicionar uma pequena quantidade de solução de alginato de sódio para facilitar a esferificação. As interferências do extrato na desnaturação da proteína e possivelmente na reticulação do alginato são aspectos importantes para ser investigados futuramente.

A liberação dirigida revelou que os hidrogéis de proteína de soro de leite e de alginato proporcionaram maior ação antioxidante protetora em comparação com o extrato bruto nas seções do trato digestivo a partir do duodeno de acordo com o teste com o reagente ABTS. Os hidrogéis de ambos os biopolímeros não foram degradados durante a digestão simulada, o que pode ter relação com a ausência da flora intestinal na simulação e, no caso da proteína, com a presença de cátions divalentes e de taninos da erva-mate que podem ter tornado o hidrogel inacessível às enzimas proteolíticas utilizadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível utilizar as proteínas do soro de leite para produzir hidrogéis similares aos de alginato em um processo similar de gotejamento em solução de cátions divalentes, necessitando um pré-tratamento térmico adicional. As propriedades diferem em alguns pontos, e os resultados apresentados neste trabalho são essenciais para o desenvolvimento de novos produtos e processos de hidrogéis com valorização de um dos componentes de efluente de queijaria, com aplicações para indústrias de alimentos, farmacêutica, biotecnológica e ambiental.

O tipo de sal de cátion divalente utilizado influencia a resistência mecânica, a resistência térmica e a transparência à luz visível e à radiação ultravioleta, permitindo a manipulação das propriedades do hidrogel formado. A avaliação das propriedades das hidroesferas é importante para processos de produção, manipulação e aplicação no desenvolvimento de aplicações de encapsulamento, adsorção, catálise, curativos, filmes biodegradáveis e, possivelmente no caso do alginato, a aplicação como carvão ativado.

O extrato encapsulado em hidrogéis de proteína de soro de leite e de alginato apresentaram atividade antioxidante maior que o extrato puro. A zona onde a maior parte dos compostos foi encontrada com esta metodologia é o cólon, mostrando que o encapsulamento com a proteína de soro de leite pode aumentar a presença de compostos bioativos do extrato de erva-mate na região onde ocorre a maior absorção de compostos fenólicos da erva-mate. Dessa forma, estudos complementares são necessários para conhecer o perfil de compostos com atividade antioxidante presentes nas seções do trato digestivo.

REFERÊNCIAS

- ABIAD; ABIFISA; ABENUTRI **Pesquisa: Hábitos de consumo de Suplementos Alimentares no Brasil**. 2015. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/495039527/Dra-Tatiana-Pires-ABIAD-Suplementos-Alimentares-Apresentacao-TP-No-ILSI-12-06-2017>. Acesso em: 20 fev. 2021.
- AGUIRRE-CALVO, T. R. Effect of *in vitro* digestion-fermentation of Ca(II)-alginate beads containing sugar and biopolymers over global antioxidant response and short chain fatty acids production. **Food Chemistry**, v. 333, p. 1274-1283, 2020.
- AL-MAYAH, A. M. R. Simulation of Enzyme Catalysis in Calcium Alginate Beads. **Enzyme Research**, v. 2012, p. 1-13, 2012.
- ALAVI, F. et al. Cold gelation of curcumin loaded whey protein aggregates mixed with k-carrageenan: Impact of gel microstructure on the gastrointestinal fate of curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 85, p. 267-280, 2018.
- ALAM, M. D.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143–152, 2013.
- ALVES, M. B.; MEDEIROS, F. C. M.; SUAREZ, P. Cadmium Compounds as Catalysts for Biodiesel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 16, p. 7176-7182, 2010.
- ALVES, P. A. G. **Utilização do repiso de tomate na alimentação do leitão: digestibilidade, atividade fermentativa e morfologia da mucosa intestinal**. 67 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica) - Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2013.
- AMMALA, A. et al. Degradation studies of poly olefins incorporating transparent nanoparticulate zinc oxide UV stabilizers. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 4, p. 167-174, 2002.

- ANBINDER, P. S. et al. Yerba mate extract encapsulation with alginate and chitosan systems: interactions between active compound encapsulation polymers. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, v. 1, 2011.
- ANCHORDOQUY, J. M. et al. Parenteral Zinc Supplementation Increases Pregnancy Rates in Beef Cows. **Biological Trace Element Research**, 2019.
- ANNADURAI, G.; JUANG, R.; LEE, D. Factorial design analysis for adsorption of dye on activated carbon beads incorporated with calcium alginate. **Advances in Environmental Research**, v. 6, p. 191-198, 2002.
- ARNAO, M.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 73, p. 239-244, 2001
- AVENDAÑO-PÉREZ, G. et al. Interactions of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Typhimurium* with gut bacteria. **Anaerobe**, v. 33, p. 90–97, 2015.
- AZEVEDO, V. M. et al. Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 179-188, 2015.
- BAILEY, S.E. et al. A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. **Water Research**, v. 33, n. 11, p. 2469-2479, 1999.
- BARRETO, P. L. M.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, p. 147-52, 2003.
- BATISTA-FILHO, M.; RISSIN, A. Deficiências nutricionais: ações específicas do setor saúde para o seu controle. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 9, n. 2, p. 130-135, 1993.
- BAUMGART, F. Stiffness - an unknown world of mechanical science? **Injury**, v. 31, p. S-B14-S-B23, 2000.

BELLICH B. et al. Water evaporation from gel beads: A calorimetric approach to hydrogel matrix release properties. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 103, p. 81-88, 2011.

BELSCAK-CVITANOVIC, A. et al. Protein-reinforced and chitosan-pectin coated alginate microparticles for delivery of flavan-3-ol antioxidants and caffeine from green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 361-374, 2015.

BEZERRA, C. V. et al. Green banana (*Musa cavendishii*) flour obtained in spouted bed– Effect of drying on physico-chemical, functional and morphological characteristics of the starch. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 241-249, 2013.

BHATTACHARYA, P. T.; MISRA, S. R.; HUSSAIN, M. Nutritional Aspects of Essential Trace Elements in Oral Health and Disease: An Extensive Review. **Scientifica**, v. 2016, p. 1-12, 2016.

BLANDINO, A.; MACÍAS, M.; CANTERO, D. Formation of Calcium Alginate Gel Capsules: Influence of Sodium Alginate and CaCl₂ Concentration on Gelation Kinetics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 6, p. 686-689, 1999.

BOATENG, J.S. et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.

BOSCO, F. et al. Thermal stability and flame resistance of cotton fabrics treated with whey proteins. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 372-377, 2013.

BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, v. 20, 4785-7892, 2000.

BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular Basis of Ca²⁺ - Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 1089-1096, 2001.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378– 384, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393–405, 2007.

BRODKORB, A. et al. INFOGEST: static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, p. 991–1014, 2019.

BRYANT, C. M.; MCCLEMENTS, D. J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. Trends in **Food Science & Technology**, v.9, n. 4, p. 143–151, 1998.

BOKKHIM, H. et al. Characterization of alginate-lactoferrin beads prepared by extrusion gelation method. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 270-276, 2016.

CAVALLARO, G. et al. Alginate gel beads filled with halloysite nanotubes. **Applied Clay Science**, v. 72, p. 132-137, 2013.

CENDON, F. V. et al. Effect of matrix composition, sphere size and hormone concentration on diffusion coefficient of insulin for controlled gastrointestinal delivery for diabetes treatment. **Journal of Microencapsulation**, v. 35, n. 1, p. 13-25, 2018.

CHAN, E. et al. Effect of formulation of alginate beads on their mechanical behavior and stiffness. **Paticuology**, v.9, p. 228-234, 2011.

CHAN, E. et al. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion–dripping method. **Journal of Colloidal and Interface Science**, v. 338, p. 63-72, 2009.

CHANDRAMOULI, V. et al. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 27-35, 2004.

CHANG, J.; HUANG, J. Selective Adsorption/Recovery of Pb, Cu, and Cd with Multiple Fixed Beds Containing Immobilized Bacterial Biomass. **Biotechnology Progress**, v. 14, p. 735-741, 1998.

CHANG, Y. et al. Development of protein-based high-oxygen barrier films using an industrial manufacturing facility. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 2, p. 303-310, 2019.

CHEN, Y.; CHEN, C.; HSIEH, J. Propylene glycol alginate-induced coacervation of milk proteins: A proteomics approach. **Food Hydrocolloids**, v.53, p. 233-238, 2016.

CHEN, L., OPARA, U. L. Texture measurement approaches in fresh and processed foods — A review. **Food Research International**, v. 51, p. 823-835, 2013.

CHEN, H.; WANG, Y.; SCHIRALDI, D. A. Foam-like materials based on whey protein isolate. **European Polymer Journal**, v.49, p. 3387-3391, 2013.

CHEN, K. L.; MYLON, S. E.; ELIMELECH, M. Enhanced Aggregation of Alginate-Coated Iron Oxide (Hematite) Nanoparticles in the Presence of Calcium, Strontium, and Barium Cations. **Langmuir**, v. 23, p. 5920-5928, 2007.

CHESSON, A.; GARDNER, P. T.; WOOD, T. J. Cell wall porosity and available surface area of wheat straw and wheat grain fractions. **Journal Science Food Agricultural**, v. 75, p. 289-295, 1997.

CHOI, C. et al. Dual-functional alginate crosslinker: Independent control of crosslinking density and cell adhesive properties of hydrogels via separate conjugation pathways. **Carbohydrate Polymers**, v. 252, 117-128, 2021.

CINELLI, P. et al. Whey protein layer applied on biodegradable packaging film to improve barrier properties while maintaining biodegradability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 108, p. 151-157, 2014.

- CRUZ, A. et al. Study of the contribution of homogeneous catalysis on heterogeneous Fe (III)/alginate mediated photo-Fenton process. **Chemical Engineering Journal**, v. 318, p. 272-280, 2017.
- D'ARRIGO, G. et al. Hyaluronic acid methacrylate derivatives and calcium alginate interpenetrated hydrogel networks for biomedical applications: physico-chemical characterization and protein release. **Colloid and Polymer Science**, v. 290, p. 1575-1582, 2012.
- DABROWSKI, A. Steam-Carbon Gasification Catalyzed by Calcium: Assessment of the Porous Structure of Active Carbons from Plum Stones and Synthetic Active Carbons. **Adsorption**, v. 3, p. 233-242, 1997.
- DALPONTE, I. et al. Formulation and optimization of a novel TiO₂/calcium alginate floating photocatalyst. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 992-1001, 2019.
- DALPONTE, I. et al. Photocatalytic degradation of tartrazine with immobilized TiO₂ in alginate beads. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1165-1169, 2016.
- DAVARCI, F. et al. The influence of solution viscosities and surface tension on calcium alginate microbead formation using dripping technique. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 119-127, 2017.
- DÉAT-LAINÉ, E. et al. Development and in vitro characterization of insulin loaded whey protein and alginate microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, p. 136-144, 2012.
- DELADINO, L. et al. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 126-134, 2008.
- DELADINO, L.; NAVARRO, A. S.; MARTINO, M. N. Carrier systems for yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) to enrich instant soups. Release mechanisms under different pH conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, p. 163-169, 2013.

DESAI, K. H.; SCHWENDEMAN, S. P. Active self-healing encapsulation of vaccine antigens in PLGA microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 165, p. 62-74, 2013.

DESTRO, B. G. I.; JORGE, R. M. M.; MATHIAS, A. L. Maximization of essential oil antioxidant capacity via star anise hydrodistillation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 4, p. 1679-1688, 2019.

DOHERTY, S. B. et al. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1604-1617, 2011.

DRAGET, K. I. Alginates. **Handbook of Hydrocolloids (Second Edition)**, p. 807-828, 2009.

DRAGET, K. I.; BRAEK, G. S.; SMIDROD, O. Alginate acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p. 31-38, 1994.

DURANTE, M. et al. Effects of Sodium Alginate Bead Encapsulation on the Storage Stability of Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) Bran Oil Extracted by Supercritical CO₂. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 10689-10695, 2012.

EMBRAPA GADO DE LEITE **Indicadores: Leite e Derivados**, v. 9, n. 85, 2018. Disponível em:
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/188342/1/Indicadores-leite-85-dez.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2021.

ETCHEPARE, M. A. et al. Microencapsulação de probióticos pelo método de extrusão associado a interações eletrostáticas. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 75-86, 2015.

FANG, Y. et al. Multiple Steps and Critical Behaviours of the Binding of Calcium to Alginate. **Journal of Physical Chemistry**, v. 111, p. 2456-2462, 2007.

- FIALHO, S. L.; CUNHA, A. S. J. Sistemas de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, p. 173-179, 2007.
- FIGUEIRA, F. C.; HOTZA D.; BERNARDIN, A. M. Obtaining grits by gelation of ceramic suspensions. **Cerâmica**, v. 60, n. 356, p. 457-64, 2014.
- FINOTELLI, P. V. et al. Microcapsules of alginate/chitosan containing magnetic nanoparticles for controlled release of insulin. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 81, p. 206-211, 2010.
- FLOEGEL, A. et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, 2011.
- FOLIN, O.; DENIS, W. On Phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 12, n. 2, 1912.
- FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, 1927.
- FORE, H. H. et al. Child malnutrition and COVID-19: the time to act is now. **The Lancet**, v. 22, p. 517-518, 2020.
- FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H. S. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2101-2110, 2000.
- GAJO, F. F. S. et al. Diagnóstico da destinação do soro de leite na mesorregião do Campo das Vertentes – Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 1, p. 26-37, 2016.
- GALLAGHER, P. K. **Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry**. Amsterdam, Elsevier, 1998.
- GBASSI, G. K. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 103-105, 2009.

- GEORGIEVA, V.; VLAEV, L.; GYUROVA, K. Non-isothermal degradation kinetics of CaCO₃ from different origin. **Journal of Chemistry**, 2013.
- GOMES, R. A. R. et al. O Setor de Produtos Lácteos. **Brazil dairy trends – ITAL**, 2017.
- GRANATO, D. et al. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? **Food Chemistry**, v. 264, p. 471-475, 2018.
- GREENWALD, I. The dissociation of some calcium salts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 124, p. 437-452, 1938.
- GUPTA, D. Methods for determination of antioxidant capacity: A review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 2, p. 546-566, 2015.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- HAIDA, H. et al. In vitro evaluation of calcium alginate gels as matrix for iontophoresis electrodes. **Journal of Medical and Dental Science**, v. 59, p. 9-16, 2012.
- HAMED, O. et al. Design, synthesis and antimicrobial properties of cellulose-based amine film. **Polymer Bulletin**, 2021.
- HAQUE, Z. Z.; ARYANA, K. J. Effect of Copper, Iron, Zinc and Magnesium Ions on Bovine Serum Albumin Gelation. **Food Science and Technology Research**, v. 8, n. 1, p. 1-3, 2002.
- HARPER, B. A. et al. Characterization of “wet” alginate and composite films containing gelatin, whey or soy protein. **Food Research International**, v. 52, p. 452-459, 2013.
- HASSAN, A. F.; ABDEL-MOHSEN, A. M.; FOUUDA, M. M. G. Comparative study of calcium alginate, activated carbon, and their composite beads on methylene blue adsorption. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 192-8, 2014a.

HASSAN, A. F.; ABDEL-MOHSEN, A. M.; ELHADIDY, H. Adsorption of arsenic by activated carbon, calcium alginate and their composite beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 125-30, 2014b.

HASSAN, R. M. Alginate polyelectrolyte ionotropic gels Part III Kinetics of exchange of chelated divalent transition metal ions especially cobalt(II) and copper(II) by hydrogen ions in capillary ionotropic metal alginate polymembrane gels. **Journal of Materials Science**, v. 26, p. 5806-5810, 1992.

HAUG, A., SMIDSRØD, O. The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 19, p. 341-351, 1965.

HE, R.; HOCKING, R. K.; TSUZUKI, T. Co-doped ZnO nanopowders: location of cobalt and reduction in photocatalytic activity. **Materials Chemistry and Physics**, v. 132, p. 1035-1040, 2012.

HEATH, M. R.; PRINZ, J. F. **Food Texture: Measurement and Perception - Oral processing of foods and the sensory evaluation of texture**. Aspen Publishers, Gaithersburg, 1999.

HORZIC, D. et al. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. **Food Chemistry**, v. 115, 441-448, 2009.

HOSSEINI-BANDEGHARAEI, A. et al. Use of a selective extractant-impregnated resin for removal of Pb(II) ion from waters and wastewaters: Kinetics, equilibrium and thermodynamic study. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 3, p. 581-591, 2014.

HOUSE, J. E. **Inorganic Chemistry**. California: Elsevier, 2008.

HU, B. et al. Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, p. 3-15, 2017.

HU, X. et al. Copper/activated carbon as catalyst for organic wastewater treatment. **Carbon**, v. 37, p. 631-637, 1999.

HUANG, J. et al. Floatable, macroporous structured alginate sphere supporting iron nanoparticles used for emergent Cr(VI) spill treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 115-122, 2016.

HUNDRE, S. Y.; KARTHIK, P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Effect of whey protein isolate and β -cyclodextrin wall systems on stability of microencapsulated vanillin by spray-freeze drying method. **Food Chemistry**, v. 174, p. 16-24, 2015.

HUQ, T. Nanocrystalline cellulose (NCC) reinforced alginate based biodegradable nanocomposite film. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1757-1763, 2012.

IDRIS, A.; SUZANA, W. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1117-1123, 2006.

ILGIN, P.; OZAY, H.; OZAY, O. A new dual stimuli responsive hydrogel: Modeling approaches for the prediction of drug loading and release profile. **European Polymer Journal**, v. 113, p. 244-253, 2019.

ISHIHARA, S. et al. Compression test of food gels on artificial tongue and its comparison with human test. **Journal of Texture Studies**, v. 44, p. 104-114, 2012.

KAMATH, K. R.; PARK, K. Biodegradable hydrogels in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 11, p. 59-84, 1993.

KANG, L. et al. Effects of whey protein nutritional supplement on muscle function among community-dwelling frail older people: A multicenter study in China. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 83, p. 7-12, 2019.

KASPCHAK, E. et al. Effect of divalent cations on bovine serum albumin (BSA) and tannic acid interaction and its influence on turbidity and in vitro protein digestibility. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 486-492, 2019.

- KAYGUZUS, H. et al. Surfactant and metal ion effects on the mechanical properties of alginate hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 220-224, 2016.
- KHAIROU, K.S. Kinetics and mechanism of the non-isothermal decomposition I: Some divalent cross-linked metal-alginate ionotropic gels. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 103, p. 81-88, 2011.
- KHOSRAVI, A. A. et al. Green luminescence from copper doped zinc sulphide quantum particles. **Applied Physics Letter**, v. 67, p. 2702, 1998.
- KIKUCHI, A. Pulsed dextran release from calcium-alginate gel beads. **Journal of Controlled Release**, v. 47, p. 21-29, 1997.
- KUMAR, A.; THAKUR, P.; KUMAR, A. In vitro evaluation of insulin release from chitosan-alginate macrobeads. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, 2021.
- KUO, C.; MA, P. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. **Biomaterials**, v. 22, p. 511-521, 2001.
- LAMELAS, C. et al. Quantifying Pb and Cd Complexation by Alginates and the Role of Metal Binding on Macromolecular Aggregation. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 2756-2764, 2005.
- LANCY, E. D.; TUOVINEN, O .H. Ferrous ion oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* immobilized in calcium alginate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 94-99, 1984.
- LANGTON, M.; ASTRÖM, A.; HERMANSSON, A. Influence of microstructure on the sensory quality of whey protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 2, p. 217-230, 1997.
- LEE, K. Y., MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012.

LEE, P.; ROGERS, M. A. Effect of calcium source and exposure-time on basic caviar spherification using sodium alginate. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 1, 96-100, 2012.

LEE, S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Survival of Freeze-Dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in Chitosan-Coated Calcium Alginate Microparticles. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7300-7305, 2004.

LEEB, E. et al. Influence of denaturation and aggregation of β -lactoglobulin on its tryptic hydrolysis and the release of functional peptides. **Food Chemistry**, v. 187, p. 545-554, 2015.

LEITE, M. T.; BARROZO, M. A. S.; RIBEIRO, E. J. Canonical Analysis Technique as an Approach to Determine Optimal Conditions for Lactic Acid Production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. **International Journal of Chemical Engineering**, 2012.

LEON, A. M. et al. Mechanical properties of whey protein/Na alginate gel microparticles. **Journal of Food Engineering**, v. 188, p. 1-7, 2016.

LEONG, J. et al. Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. **Particuology**, v.24, p. 44-60, 2016.

LIANG, Y. et al. Cosynthesis of Cargo-Loaded Hydroxyapatite/Alginate Core-Shell Nanoparticles (HAP@Alg) as pH-Responsive Nanovehicles by a Pregel Method. **American Chemical Society**, v. 4, p. 6720-6727, 2012.

LIDE, D. R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. CRC Press, Boca Raton, 2005.

LIN, Y. et al. Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. **Biomaterials**, v. 26, p. 2105-2113, 2005.

- LIU, Y. et al. Effect of reactive time on flame retardancy and thermal degradation behavior of bio-based zinc alginate film. **Polymer Degradation and Stability**, v. 127, p. 20-31, 2016a.
- LIU, Y. et al. Bio-based barium alginate film: Preparation, flame retardancy and thermal degradation behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 139, p. 106-114, 2016b.
- LIU, Y. et al. The Flame Retardancy, Thermal Properties, and Degradation Mechanism of Zinc Alginate Films. **Journal of Macromolecular Science**, v. 53, p. 1074-1089, 2014.
- LIU, S.; YU, H.; HUANG, K. Structural characteristics and biocompatibility of a casein-based nanocomposite for potential biomedical applications. **Journal of Materials Science**, v. 53, p. 3959-3971, 2018.
- LOH, Q. L.; WONG, Y. Y.; CHOONG, C. Combinatorial effect of different alginate compositions, polycations, and gelling ions on microcapsule properties. **Colloid and Polymer Science**, v. 290, p. 619-629, 2012.
- LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Release of yerba mate antioxidants from corn starch–alginate capsules as affected by structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 150-157, 2014.
- LOTFIPOUR, F.; MIRZAEI, S.; MAGHSOODI, M. Evaluation of the effect of CaCl₂ and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of *Lactobacillus acidophilus* loaded alginate beads using response surface analysis. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 2, n. 1, p. 71-78, 2012.
- MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H.; ALLISON, C. Protein degradation by human intestinal bacteria. **The Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 1647–1656, 1986.
- MADUREIRA, A. R. et al. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 465–470., 2011.

MAHAPATRA, K.; RAMTEKE, D.S.; PALIWAL, L.J. Production of activated carbon from sludge of food processing industry under controlled pyrolysis and its application for methylene blue removal. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 95, p. 79-86, 2012.

MALABADI, R. B., STADEN, J. Storability and germination of sodium alginate encapsulated somatic embryos derived from the vegetative shoot apices of mature *Pinus patula* trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 259-265, 2005.

MARESCA, D. et al. Microencapsulation of nisin in alginate beads by vibrating technology: Preliminary investigation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 436-443, 2016.

MARY, M. C. S.; SASIKUMAR, S. Sodium Alginate/Starch Blends Loaded with Ciprofloxacin Hydrochloride as a Floating Drug Delivery System – In Vitro Evaluation. **Iran Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 25-31, 2015.

MATA, G. R.; NAVARRO, F. O efeito da suplementação de leucina na síntese proteica muscular. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 3, n. 17, p. 367, 2009.

MATEOS, R. Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 241, p. 232-241, 2018.

MAURO, C. P. **Comprimidos de Liberação Controlada**. São Paulo: Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, 46p., 2007.

MENDOZA-CÓZATL, D. et al. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 653-671, 2005.

MESÍAS, M.; DELGADO-ANDRADE, C. Melanoidins as a potential functional food ingredient. **Current Opinion on Food Science**, v. 14, 37-42, 2017.

MICHELI, M. et al. Effects of double encapsulation and coating on synthetic seed conversion in M.26 apple rootstock. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 3, p. 347-356, 2002.

MINGHOU, J. et al. Studies on the M:G ratios in alginate. **Hydrobiologia**, v. 116, p. 554–556, 1984.

MORATO, P. N. et al. A dipeptide and an amino acid present in whey protein hydrolysate increase translocation of GLUT-4 to the plasma membrane in Wistar rats. **Food Chemistry**, v. 139, p. 853-859, 2013.

NAKAMURA, K. et al. Thermal properties of water insoluble alginate films containing di- and trivalent cations. **Thermochimica Acta**, v. 267, p. 343-353, 1995.

NGUYEN, T.; LAU, Y. S.; YANG, K. Entrapment of cross-linked cellulase colloids in alginate beads for hydrolysis of cellulose. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 862-869, 2016.

NOGUEIRA, M. T. **Extração e caracterização de alginato de sódio da macroalga *Sargassum cymosum* C. Agardh**. 2017. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual de São Paulo, Assis (SP), 2005. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/150488/nogueira_mt_me_assis_int.pdf?sequence=6. Acesso em: 19 fev. 2021.

OLIVEIRA, A. C. S. et al., Development of whey protein isolate/polyaniline smart packaging: Morphological, structural, thermal, and electrical properties. **Journal of Applied Polymer Science**. 2018.

OLIVEIRA, G. L. S. Determination *in vitro* of the antioxidant capacity of natural products by the DPPH•method: review study. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

O'NEIL, M. J. **The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. Nova Jersey: Merck and Co., 2001.

O'NEILL, G. J. et al. In vitro and in vivo evaluation of whey protein hydrogels for oral delivery of riboflavin. **Journal of Functional Foods**, v. 19, 512-521, 2015.

OUWERX, C. et al. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. **Polymer Gels and Networks**, v. 6, p. 393-408, 1998.

OZBEK; H.; FAIR, J. A.; PHILLIPS, S. L. **Viscosity Of Aqueous Sodium Chloride Solutions From 0 - 150°C**. Berkeley: Universidade da California, 1977.

OZSEKER, E. E.; AKKAYA, A. Development of a new antibacterial biomaterial by tetracycline immobilization on calcium-alginate beads. **Carbohydrate Polymer**, v. 151, p. 441-451, 2016.

PALUMBO, M.; FORMOSA, J.; LACASTA, A. M. Thermal degradation and fire behaviour of thermal insulation materials based on food crop by-product. **Construction and Building Materials**, v. 79, p. 34-39, 2015.

PAPAGEORGIU, S. K. et al. Prediction of binary adsorption isotherms of Cu^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} on calcium alginate beads from single adsorption data. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, p. 1347-1354, 2009.

PAREKH, B. B. et al. Thermal, FT-IR and dielectric studies of gel grown sodium oxalate single crystals. **Bulletin of Materials Science**, v. 31, n. 2, p. 143-147, 2008.

PATEL, N. et al. Development and evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxone sodium formulation. **Progress in Biomaterials**, v. 5, p. 117-133, 2016.

PATEL, S. Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 308-319, 2015.

PATHAK, T. S. et al. Effect of cross-linker and cross-linker concentration on porosity, surface morphology and thermal behavior of metal alginates prepared

from algae (*Undaria pinnatifida*). **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 717-724, 2009.

PEDRAZZOLI, P. et al. Effect of whey protein isolate supplementation on body composition, muscle strength, and treatment tolerance in malnourished advanced cancer patients undergoing chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 15, 2019.

PENG, X.; XIONG, Y. KONG, B. Antioxidant activity of peptide fraction from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 196-201, 2009.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, J. L. et al. Thermal analysis of monument patina containing hydrated calcium oxalates. **Thermochimica Acta**, v. 512, n. 1-2, p. 5-12, 2011.

PERRY, R. H.; GREEN, D. W; MALONEY, J. O. **Perry's Chemical Engineers' Handbook**. New York: McGraw-Hill, 1997.

PILATTI-RICCIO, D. et al. Impact of the use of saccharides in the encapsulation of *Ilex paraguariensis* extract. **Food Research International**, v. 125, 2019.

RAHMAN, M. M. et al. Optical properties and X-ray photoelectron spectroscopic study of pure and Pb-doped TiO₂ thin films. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 60, n. 2, p. 201-210, 1999.

RAJ, C. J.; JOSHI, R. K.; VARMA, K. B. R. Synthesis from zinc oxalate, growth mechanism and optical properties of ZnO nano/micro structures. **Crystal Research and Technology**, v. 46, n. 11, p. 1181-1188, 2011.

RAMLI, S. H. M et al. Coatless alginate pellets as sustained-release drug carrier for inflammatory bowel disease treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 370-381, 2016.

RAMOS, O. L. et al. Physical effects upon whey protein aggregation for nano-coating production. **Food Research International**, v. 66, p. 344-355, 2014.

RE, R. et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REFAAT, A. A. Biodiesel production using solid metal oxide catalysts. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 203-221, 2011.

REN, Q., ZHAO, C. NO_x and N₂O Precursors from biomass pyrolysis: nitrogen transformation from amino acid. **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 4236-4240, 2012.

ROSS, A. B., et al. Influence of cation on the pyrolysis and oxidation of alginates. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 91, p. 344-51, 2011.

ROTHENBERG, E.; WENDIN, K. **Modifying Food Texture Volume 2: Texture modification of food for elderly people**. Elsevier, 2015.

SAID, A. A.; HASSAN, R. M. Thermal decomposition of some divalent metal alginate gel compounds. **Polymer Degradation and Stability**, v. 39, p. 393-397, 1993.

SANKALIA, M. G. et al. Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 2, p. 215-232, 2006.

SANTANA, A. A.; KIECKBUSCH, T. G. Physical evaluation of biodegradable films of calcium alginate plasticized with polyols. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 4, p. 835-845, 2013.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, 2004.

SHANG, Y.; YU, X.; ROMERO-GONZÁLEZ, M. E. Screening of algae material as a filter for heavy metals in drinking water. **Algal Research**, v. 12, p. 258-261, 2015.

SHEDAM, M. R.; SHEDAM, R. M.; MATHAD, S. N. Microstructures of $\text{CdC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ Single Crystal Grown in Silica Gel. **Journal of Nano and Electronic Physics**, v. 8, n. 4(2), p. 1-4, 2016.

SHIM, J. et al. Simultaneous removal of phenol, Cu and Cd from water with corn cob silica-alginate beads. **Journal of Hazardous Materials**, v. 272, p. 129-136, 2014.

SHIMOMURA, Y. et al. Exercise Promotes BCAA Catabolism: Effects of BCAA Supplementation on Skeletal Muscle during Exercise. **The Journal of Nutrition**, v. 134, 1583S-1587S, 2004.

SHPIGELMAN, A. et al. β -Lactoglobulin-naringenin complexes: Nano-vehicles for the delivery of a hydrophobic nutraceutical. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 214-224, 2014.

SHUKLA, A. K. et al. Micronutrients in Soils, Plants, Animals and Humans. **Indian Journal of Fertilisers**, v. 14, n. 4, p. 30-54, 2018.

SILVA, R. Hydrogel matrices based on elastin and alginate for tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 614-625, 2018.

SILVA, R. R.; SIQUEIRA, E. Q.; NOGUEIRA, I. S. Impactos ambientais de efluentes de laticínios em curso d'água na Bacia do Rio Pomba. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 23, n. 2, 2018.

SIKORSKI, P. et al. Evidence for Egg-Box-Compatible Interactions in Calcium-Alginate Gels from Fiber X-ray Diffraction. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 2098-2103, 2007.

- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.
- SMIJS, T. G.; PAVEL, S. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 4, p. 95-112, 2011.
- SMITH, A. M.; SENIOR, J. J. Alginate Hydrogels with Tuneable Properties. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 2021.
- SOLAH, V. A. et al. Differences in satiety effects of alginate- and whey protein-based foods. **Appetite**, v. 54, p. 485-491, 2010.
- SOLEIMANI, M.; KAGHAZCHI, T. Adsorption of gold ions from industrial wastewater using activated carbon derived from hard shell of apricot stones – An agricultural waste. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5374-5383, 2008.
- SOUZA, R. S. C. Evaluation of the antioxidant potential of whey protein concentrated by ultrafiltration and hydrolyzed by different commercial proteases. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 2019.
- SUDARYANTO, Y. et al. High surface area activated carbon prepared from cassava peel by chemical activation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 734-739, 2006.
- SUNTHAR, T.P.M. et al. Antibacterial and Antifungal Properties of Composite Polyethylene Materials Reinforced with Neem and Turmeric. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, 2020.
- SVANBERG, L. et al. Effect of anthocyanins on lipid oxidation and microbial spoilage in value added emulsions with bilberry seed oil, anthocyanins and cold set whey protein hydrogels. **Food Chemistry**, v. 272, p. 273-278, 2019.
- TANG, Z. et al. Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage Felix O1 encapsulated in alginate microspheres. **Food Research International**, v. 52, p. 460-466, 2013.

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

TELLO, F. et al. Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: Production, characterization and anti-oxidative properties. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 670-678, 2015.

TORRES, M. L. et al. Purification of alginate improves its biocompatibility and eliminates cytotoxicity in matrix for bone tissue engineering. **Algal Research**, v. 40, p. 101499, 2019.

VAN DER MAAREAL, J.R.C. **Introduction to Biopolymer Physics**. Singapore: World Scientific, 2007

VAN VLIERBERGHE, S.; DUBRUEL, P.; SCHACHT, E. Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 5, p. 1387-1408, 2011.

VAIJA, J.; LINKO, Y.; LINKO, P. Citric acid production with alginate bead entrapped *Aspergillus niger* ATCC 9142. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 7, p. 51-54, 1982

VEIGA, F. J. B. Medicamentos orais de liberação controlada: comprimidos matriciais hidrófilos. **Boletim da Faculdade de Farmácia de Coimbra**, v. 12, n. 2, p. 17-87, 1988.

VERRUCK, S. et al. Evaluation of the interaction between microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 added in goat's milk Frozen Yogurt and *Escherichia coli* in the large intestine. **Food Research International**, v. 127, 2020.

VOO, W. et al. Calcium alginate hydrogel beads with high stiffness and extended dissolution behaviour. **European Polymer Journal**, v. 75, p. 343-353, 2016.

WALTERS, R. H. et al. **Next Generation Drying Technologies for Pharmaceutical Applications**. Wiley Online Library, 2014.

WAN, Z.; HAMEED, B. H. Transesterification of palm oil to methyl ester on activated carbon supported calcium oxide catalyst. **Bioresources Technology**, v. 102, p. 2659-2664, 2011.

WANG, C. X. et al. High-speed compression of single alginate microspheres. **Chemical Engineering Science**, v. 60, p. 6649-6657, 2005.

WANG, F., LU, X., LI, X. Selective removals of heavy metals (Pb²⁺, Cu²⁺, and Cd²⁺) from wastewater by gelation with alginate for effective metal recovery. **Journal of Hazardous Materials**, v. 308, p. 75-83, 2016.

WANG, L. et al. Effect of resveratrol or ascorbic acid on the stability of α -tocopherol in O/W emulsions stabilized by whey protein isolate: Simultaneous encapsulation of the vitamin and the protective antioxidant. **Food Chemistry**, v. 196, p. 466-474, 2016.

WANG, Z. et al. Sol-gel transition of alginate solution by the addition of various divalent cations: ¹³C-nmr spectroscopic study. **Biopolymers**, v. 33, n. 4, p. 703-711, 1993.

WATT, I. M. **The principles and practice of Electron Microscopy**. Nova Iorque, Cambridge University Press, 489p., 1997.

WENING, K., BREITKREUTZ, J. Oral drug delivery in personalized medicine: Unmet needs and novel approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404 (1-2), p. 1-9, 2011.

WICHCHUKIT, S. et al. Whey protein/alginate beads as carriers of bioactive component. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p.66-73, 2013.

WIJAYANTI, H. B.; BANSAL, N.; DEETH, H. C. Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 1235-1251, 2014.

YANG, C. H. et al. Strengthening Alginate/Polyacrylamide Hydrogels Using Various Multivalent Cations. **Applied Materials & Interfaces**, v. 5, p. 10418-10422, 2013.

YU, J.; WANG, J.; JIANG, Y. Removal of Uranium from Aqueous Solution by Alginate Beads. **Nuclear Engineering and Technology**, v. 49, n. 3, p. 534-540, 2017.

ZHANG, J. Effects of divalent metal ions on the flame retardancy and pyrolysis products of alginate fibres. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, p. 1034-1040, 2012.

ZHAO, X. et al. Preparation, characterization and evaluation in vivo of Ins-SiO₂-HP55 (insulin-loaded silica coating HP55) for oral delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, p. 278-284, 2013.

ZHUANG, X. et al. Growth and characterisation of potassium cobalt nickel sulfate hexahydrate for UV light filters. **Crystal Research and Technology**, v. 41, n. 10, p. 1031-1035, 2006.

ZOHAR-PEREZ, C. Structure of Dried Cellular Alginate Matrix Containing Fillers Provides Extra Protection for Microorganisms against UVC Radiation. **Radiation Research**, v. 160, n. 2, p. 198-204, 2004.