

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS -UFAM

FACULDADE DE TECNOLOGIA - FT

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE
MATERIAIS - PPGCEM

AUMENTO DA BIODISPONIBILIDADE DE BROMELINA NO INTESTINO
ATRAVÉS DE ESTEREOCOMPLEXAÇÃO DE ALGINATO E AMINOÁCIDOS

PHILIPPI CAVALCANTE RICARDO

MANAUS

2020

PHILIPPI CAVALCANTE RICARDO

AUMENTO DA BIODISPONIBILIDADE DE BROMELINA NO INTESTINO
ATRAVÉS DE ESTEREOCOMPLEXAÇÃO DE ALGINATO E AMINOÁCIDOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Campelo Felix

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Lima Serudo

MANAUS

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ricardo, Philipi Cavalcante
R488a Aumento da biodisponibilidade de bromelina no intestino através de estereocomplexação de alginato e aminoácidos / Philipi Cavalcante Ricardo . 2020
314 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Pedro Henrique Campelo Felix
Coorientador: Ricardo Lima Serudo
Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Proteínas. 2. L-lisina. 3. Encapsulação. 4. Simplex-centroid. I. Felix, Pedro Henrique Campelo. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me proporcionar o dom da vida e me manter amparado a todo momento. Agradeço por todas as dádivas e milagres que operou no desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, base da minha vida e que sempre me proporciona educação, respeito, amor e carinho e sem eles não conseguiria realizar este trabalho. Agradeço aos meu pai Antônio Oliveira Ricardo e a minha mãe Ana Elítia Pinheiro Cavalcante, especialmente, a minha mãe que é um exemplo de mulher, mãe, e guerreira uma pessoa com uma história de vida cheia de desafios e vitórias, mãe você é a inspiração da minha vida. Ao querido irmão Gabriel Cavalcante Ricardo que me apoiou todos os dias durante a realização deste trabalho e que sempre está ao meu lado quando eu mais preciso. Vocês fazem parte dessa conquista, o meu muito obrigado.

Agradeço ao meu orientador o Professor Doutor Pedro Henrique Campelo Felix por me guiar na jornada de desenvolvimento científico e profissional e, por me mostrar que através da ciência se pode transpor barreiras e transformar o mundo num lugar melhor.

Agradeço ao meu grande amigo Ricardo Lima Serudo um tremendo profissional que me ensinou a ter pensamento disruptivo e fora da caixa. A você meu amigo o meu muito obrigado.

Agradeço a minha amiga e namorada Syra Kelly Murabac Silva Oliveira pelo apoio, incentivo, paciência, amor e carinho a mim depositados. A você meu amor o meu muito obrigado.

Ainda, não poderia esquecer-me dos meus grandes amigos que me ajudaram direta e indiretamente na composição e conclusão desse trabalho, com eles minha vida é mais fácil e minhas obrigações se tornam mais leves, são pessoas que levarei para sempre em minha memória e em meu coração, especialmente, Victor Ramos, Andreza Silveira, Matheus Coutinho, Jéssica Martins, Vanderleya Mateus, Joel Chaar, Miguel Novo, Johmar de Souza e todos os amigos que até aqui me ajudaram.

Jamais poderia deixar de agradecer aos meus amigos e companheiros do Nanopol: Laiane Souza, Josi Moreira, Matheus Biondo, Sidney Gomes, Suzan Xavier, Jéssica Montenegro, Kallil Araújo e ao professor Edgar A. Sanches, agradeço por todo o companheirismo, troca de conhecimentos, conversas e apoio que tornaram meus dias mais leves e felizes.

Meus agradecimentos também à banca avaliadora pela disponibilidade em contribuir para o aperfeiçoamento do trabalho.

À CAPES, da qual o programa PPGCEM faz parte.

À UFAM, pela estrutura e pelos profissionais que tive a honra de conhecer e trabalhar, em especial ao programa PPGCEM o qual sempre foi solícito no atendimento e questões burocráticas, deixo aqui o meu muito obrigado.

À UEA, pela parceria e estrutura que pude utilizar, em especial, ao HUB – Tecnologia e Inovação e ao Laboratório ILUM – Desenvolvimento e Inovação, meus sinceros agradecimentos.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta no desenvolvimento e aperfeiçoamento deste trabalho, deixo aqui o meu muito obrigado!

RESUMO

O abacaxi contém enzimas proteolíticas com propriedades biológicas de interesse comercial, conhecidas como bromelinas. As bromelinas apresentam potencial no uso como analgésico, como anti-inflamatório e em tratamentos de câncer. Apesar dos efeitos terapêuticos, proteínas como a bromelina sofrem desnaturação quando administradas por via oral, sendo degradadas na fase de digestão gástrica devido ao baixo pH e ao ataque de enzimas digestivas. Os processos de microencapsulação têm demonstrado grande potencial na proteção de proteínas e como sistemas de liberação controlada. Assim, este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de sistemas encapsulantes utilizando alginato de sódio como material carreador e aminoácidos carregados positivamente como agentes estabilizantes para a liberação controlada de bromelina no intestino, utilizando testes *in vitro*. Os sistemas foram produzidos a partir do planejamento experimental de misturas *simplex centroid*. As caracterizações foram realizadas por FTIR o qual demonstrou que a bromelina foi encapsulada em todos os sistemas, por XRD onde foi observado que os sistemas se apresentam como sólidos amorfos e, por MEV que demonstrou que a morfologia dos sistemas formados segue um padrão de micropartículas rugosas. A aplicação da análise estatística demonstrou que os sistemas formados apresentam comportamento que pode ser avaliado por um modelo quadrático, com $p < 0,05$. Foi possível estudar como os aminoácidos interagem com a bromelina e o alginato, onde a bromelina livre apresentou redução de 74% no conteúdo proteico e atividade de $4,7 \text{ U.mL}^{-1}$ ao final da digestão gástrica e, redução de 82% no teor de proteínas e atividade de $2,0 \text{ U.mL}^{-1}$ ao final da digestão intestinal, enquanto a microencapsulação com alginato e l-lisina apresentou a melhor interação, gerando aumento na estabilidade da bromelina, tanto em termos da quantidade de proteínas, que se manteve acima de 59% até o final da fase intestinal quanto da atividade enzimática que atingiu $4,3 \text{ U.mL}^{-1}$ ao final da fase intestinal. Dessa forma, foi possível desenvolver sistemas de liberação controlada por pH, para aumento da estabilidade e conseqüente biodisponibilidade da bromelina no trato intestinal, com até cinco vezes mais proteínas livres e até duas vezes mais atividade enzimática.

Palavras chave: Proteínas, l-lisina, encapsulação, *simplex centroid*.

ABSTRACT

Pineapple contains proteolytic enzymes with biological properties of commercial interest, known as bromelains. Bromelains have potential for use as an analgesic, as an anti-inflammatory and in cancer treatments. Despite the therapeutic effects, proteins such as bromelain undergo degradation when administered orally, being degraded in the gastric digestion phase due to low pH and the attack of digestive enzymes. Microencapsulation processes have demonstrated great potential in the protection of proteins and as controlled release systems. Thus, this work aimed to develop encapsulating systems using sodium alginate as carrier material and positively charged amino acids as stabilizing agents for the controlled release of bromelain in the intestine, using *in vitro* tests. The systems were produced using experimental planning of centroid simplex mixtures. The characterizations were performed by FTIR which demonstrated that the bromelain was encapsulated in all systems, by XRD where it was observed that the systems are presented as amorphous solids and, by SEM which demonstrated that the morphology of the formed systems follows a microparticle pattern rough. The application of statistical analysis demonstrated that the formed systems present behavior that can be evaluated by a quadratic model, with $p < 0.05$. It was possible to study how the amino acids interact with bromelain and alginate, where free bromelain showed a 74% reduction in protein content and an activity of 4.7 U.mL^{-1} at the end of gastric digestion and, a reduction of 82% in content of protein and activity of 2.0 U.mL^{-1} at the end of intestinal digestion, while microencapsulation with alginate and l-lysine showed the best interaction, generating an increase in the stability of bromelain, both in terms of the amount of proteins, which was maintained greater than 59% until the end of the intestinal phase, and of the enzymatic activity that reached 4.3 U.mL^{-1} at the end of the intestinal phase. Therefore, it was possible to develop pH controlled release systems, to increase the stability and consequent bioavailability of bromelain in the intestinal tract, with up to five times more free proteins and up to twice more enzyme activity.

Keywords: Proteins, l-lysine, encapsulation, simplex centroid.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Composição química média do abacaxi.....	19
Tabela 2:	Valores dos efeitos e erros da Soma Quadrática, Graus de Liberdade e Média Quadrática para os modelos avaliados.....	49
Tabela 3:	Valores de significância estatística p e regressão para os modelos calculados.....	50
Tabela 4:	Sumário dos efeitos para a recuperação de sólidos (%)......	50
Tabela 5:	Valores dos efeitos e erros da Soma Quadrática, Graus de Liberdade e Média Quadrática para os modelos avaliados.....	53
Tabela 6:	Valores de significância estatística p e regressão para os modelos calculados.....	54
Tabela 7:	Sumário dos efeitos para o teor de umidade (%)......	54
Tabela 8:	Valores dos efeitos e erros da Soma Quadrática, Graus de Liberdade e Média Quadrática para os modelos avaliados.....	93
Tabela 9:	Valores de significância estatística p e regressão para os modelos calculados.....	93
Tabela 10:	Sumários dos efeitos para a quantidade de proteínas no fim do tempo em SFG.....	93
Tabela 11:	Valores dos efeitos e erros da Soma Quadrática, Graus de Liberdade e Média Quadrática para os modelos avaliados.....	98
Tabela 12:	Valores de significância estatística p e regressão para os modelos calculados.....	99
Tabela 13:	Sumário dos efeitos para a atividade enzimática(U/mL), após digestão em solução de fluido gástrico.....	99
Tabela 14:	Valores dos efeitos e erros da Soma Quadrática, Graus de Liberdade e Média Quadrática para os modelos avaliados.....	104
Tabela 15:	Valores de significância estatística p e regressão para os modelos calculados.....	105
Tabela 16:	Sumário dos efeitos para a quantidade de peptídeos de bromelina livre, após digestão em solução de fluido gástrico seguido por fluido intestinal.....	105
Tabela 17:	Valores dos efeitos e erros da Soma Quadrática, Graus de Liberdade e Média Quadrática para os modelos avaliados.....	109
Tabela 18:	Valores de significância estatística p e regressão para os modelos calculados.....	110
Tabela 19:	Sumário dos efeitos para a quantidade de peptídeos de bromelina livre, após digestão em solução de fluido gástrico....	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Morfologia do abacaxizeiro.....	18
Figura 2:	Produção brasileira de abacaxi por região em 2017.....	20
Figura 3:	Representação cartoonizada das bromelinas do caule e do fruto, à esquerda bromelina do caule e, à direita bromelina do fruto.....	21
Figura 4:	Mecanismo de ação da bromelina na ativação de peptídeos e na fibrinólise.....	23
Figura 5:	Mecanismo de ação da bromelina na inibição parcial da síntese trombótica.....	24
Figura 6:	Representação dos tipos de encapsulado aplicados na proteção de proteínas os quais podem ser emulsões de combinação água(A), óleo(O), surfactante(S) e lipídios sólidos nanoparticulados (SLNs), além de lipossomos e géis biopoliméricos como alginato.	25
Figura 7:	Princípio de transferência de calor e massa no processo de secagem por spray drying.....	27
Figura 8:	Variação das concentrações no plasma sanguíneo dos medicamentos em sistemas de liberação controlada (linha vermelha), por via injetável (linha azul pontilhada) e por comprimido não revestido (linha preta pontilhada).....	28
Figura 9:	Representação do alginato e suas posições dos grupamentos funcionais.....	31
Figura 10:	Modelo de modificação de alginato por via de estereocomplexação.....	32
Figura 11:	Em (a), estrutura comum aos aminoácidos, em (b), estrutura da serina em modelo bola-e-bastão.....	32
Figura 12:	Estados de protonação da lisina, arginina e histidina.....	34
Figura 13:	Sistema digestivo humano.....	35
Figura 14:	Plano triangular equilátero de experimentos.....	39
Figura 15:	Pontos de experimentos do <i>design simplex lattice</i>	40
Figura 16:	Pontos de experimentos do <i>design simplex centroid</i>	41
Figura 17:	Equipamento spray dryer utilizado nas sínteses dos sistemas.....	44
Figura 18:	Proporção de massa de sólidos recuperada nos sistemas estudados.	49
Figura 19:	Superfície de resposta para a recuperação de sólidos (%)......	51
Figura 20:	Curva de nível para a Recuperação de Sólidos (%)......	52
Figura 21:	Proporção de teor de umidade nos sistemas estudados.....	53
Figura 22:	Superfície de resposta para o teor de umidade (%)......	55
Figura 23:	Curva de nível para o teor de umidade (%)......	55
Figura 24:	Espectro de transmissão do sistema Lis, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina e combinação com e sem bromelina.....	57

Figura 25:	Região de <i>fingerprint</i> do sistema Lis, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina e combinação com e sem bromelina.....	58
Figura 26:	Espectro de transmissão do sistema Arg, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-arginina e combinação com e sem bromelina.....	60
Figura 27:	Região de <i>fingerprint</i> do sistema Arg, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina e combinação com e sem bromelina.....	60
Figura 28:	Espectro de transmissão do sistema His, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-histidina e combinação com e sem bromelina.....	62
Figura 29:	Região de <i>fingerprint</i> do sistema His, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-histidina e combinação com e sem bromelina.....	62
Figura 30:	Espectro de transmissão do sistema LA, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina, l-arginina e combinação com e sem bromelina.....	64
Figura 31:	Região de <i>fingerprint</i> do sistema LA, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina, l-arginina e combinação com e sem bromelina.....	65
Figura 32:	Espectro de transmissão do sistema LH, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina, l-histidina e combinação com e sem bromelina.....	66
Figura 33:	Região de <i>fingerprint</i> do sistema LH, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina, l-histidina e combinação com e sem bromelina.....	67
Figura 34:	Espectro de transmissão do sistema AH, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-arginina, l-histidina e combinação com e sem bromelina.....	69
Figura 35:	Região de <i>fingerprint</i> do sistema AH, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-arginina, l-histidina e combinação com e sem bromelina.....	69
Figura 36:	Espectro de transmissão do sistema LAH, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina, l-arginina, l-histidina e combinação com e sem bromelina.....	71
Figura 37:	Região de <i>fingerprint</i> do sistema LAH, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina, l-arginina, l-histidina e combinação com e sem bromelina.....	71
Figura 38:	Difratogramas dos padrões utilizados nas sínteses.....	74
Figura 39:	Difratogramas dos sistemas sintetizados.....	74
Figura 40:	Difratogramas dos sistemas e padrão de alginato.....	75
Figura 41:	Morfologia do sistema Lis da combinação entre alginato, bromelina e l-lisina, micrografias a 2 µm.....	77

Figura 42:	Morfologia do sistema Lis, à esquerda micrografia a 10 μm e, a direita, micrografia a 20 μm	77
Figura 43:	Morfologia do sistema Arg da combinação entre alginato, bromelina e l-arginina, à esquerda micrografia a 2 μm e, a direita, micrografia a 5 μm	78
Figura 44:	Morfologia do sistema Arg, à esquerda micrografia a 10 μm e, a direita, micrografia a 20 μm	78
Figura 45:	Morfologia do sistema His, combinação entre alginato, bromelina e l-histidina, à esquerda micrografia a 2 μm e, a direita, micrografia a 5 μm	79
Figura 46:	Morfologia do sistema His, micrografia a 10 μm	79
Figura 47:	Morfologia do sistema LA da combinação entre alginato, bromelina, l-lisina e l-arginina, à esquerda micrografia a 2 μm e, à direita micrografia a 5 μm	80
Figura 48:	Morfologia do sistema LA, micrografias a 10 μm	80
Figura 49:	Morfologia do sistema LH da combinação entre alginato, bromelina, l-lisina e l-histidina, micrografias a 2 μm	81
Figura 50:	Morfologia do sistema LH, micrografia a 10 μm	81
Figura 51:	Morfologia do sistema AH da combinação entre alginato, bromelina, l-arginina e l-histidina, à esquerda micrografia a 2 μm e, a direita, micrografia a 5 μm	82
Figura 52:	Morfologia do sistema AH, micrografias a 10 μm	82
Figura 53:	Morfologia do sistema LAH da combinação entre alginato, bromelina, l-lisina, l-arginina e l-histidina, à esquerda micrografia a 2 μm e, a direita, micrografia a 5 μm	83
Figura 54:	Morfologia do sistema LAH, à esquerda micrografia a 10 μm e, a direita, micrografia a 20 μm	83
Figura 55:	Esquema representativo da secagem e formação das partículas dentro do spray dryer.....	84
Figura 56:	Liberção controlada em pH 3,0.....	86
Figura 57:	Liberção controlada em pH 7,0.....	87
Figura 58:	Mecanismo de atração e repulsão das redes de alginato nos quais as setas vermelhas indicam as forças de atração entre os ânions e o meio ácido nas redes de alginato, e as setas azuis as forças repulsivas entre os ânions e a hidroxila advinda do meio básico.....	89
Figura 59:	Simulação das micropartículas com bromelina em pH 3,0 e pH 7,0	89
Figura 60:	Estudo de Liberação controlada em SFG.....	90
Figura 61:	Forma das cadeias de alginato, à esquerda cadeias em solução tampão e, à direita as cadeias em solução salina.....	91
Figura 62:	Fração de peptídeos ao final da digestão em solução de fluido gástrico.....	92
Figura 63:	Superfície de nível para os sistemas estudados.....	94
Figura 64:	Curva de nível para os sistemas estudados.....	95

Figura 65:	Processo de desnaturação e agregação da bromelina ao ser exposta a SFG.....	96
Figura 66:	Processo de hidratação e difusão de SFG nas microcápsulas, neste caso, para o sistema com l-arginina o qual é capaz de interagir fortemente com a bromelina e evitar processos de agregação.....	96
Figura 67:	Atividade enzimática ao final da digestão em SFG para os sistemas em estudo.....	98
Figura 68:	Superfície de nível para os sistemas estudados.....	100
Figura 69:	Curva de nível para os sistemas estudados.....	101
Figura 70:	Processo proteolítico em SFG para a bromelina livre.....	102
Figura 71:	Processo proteolítico em SFG para a bromelina imobilizada nas redes de alginato.....	102
Figura 72:	Fração proteica livre ao final da digestão em SFG seguida por SFI.....	104
Figura 73:	Superfície de nível para os sistemas analisados.....	106
Figura 74:	Curva de nível para os sistemas analisados.....	107
Figura 75:	Alteração da forma e rompimento do equilíbrio das estruturas de alginato, com liberação das bromelinas imobilizadas em rede.....	108
Figura 76:	Atividade enzimática ao final da digestão em SFI.....	109
Figura 77:	Superfície de nível para os sistemas estudados.....	111
Figura 78:	Curva de nível para os sistemas estudados.....	112
Figura 79:	Ilustração da degradação e desnaturação da bromelina na presença e ausência da l-arginina.....	113
Figura 80:	Ilustração da degradação e desnaturação da bromelina em SFI.....	113

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 ABACAXI.....	18
3.1.1 Bromelina.....	21
3.2 ENCAPSULAMENTO	25
3.2.1 Spray Dryer	27
3.3 LIBERAÇÃO CONTROLADA	28
3.3.1 Alginato.....	29
3.3.2 Alginato e Modificações	30
3.3.3 Aminoácidos	32
3.4 SISTEMA DIGESTIVO	34
3.4.3 Biodisponibilidade	36
3.5 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.....	38
3.5.1 Design de Misturas.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 REAGENTES	42
4.2 PRODUÇÃO DOS SISTEMAS.....	43
4.2.1 Planejamento dos Experimentos	43
4.2.2 Síntese dos sistemas	44
4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CARACTERIZAÇÃO	45
4.3.1 Teor de Umidade.....	45
4.3.2 Recuperação de Sólidos	45
4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	45
4.3.4 Difratomia de Raios-X (DRX)	45
4.3.5 Análises de Espectroscopia de Luz Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	46
4.4 ANÁLISES DE DIGESTIBILIDADE.....	46
4.4.1 Dosagem de proteínas	46
4.4.2 Atividade Enzimática	46
4.4.3 Ensaios de Liberação Controlada.....	47
4.4.4 Ensaios de Digestão <i>in vitro</i>	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49

5.1 PARÂMETROS FÍSICOS DE SECAGEM POR SPRAY DRYER.....	49
5.1.1 Recuperação de Sólidos	49
5.1.2 Teor de Umidade.....	53
5.2 ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO.....	57
5.2.1 Análises de FTIR.....	57
5.2.2 Análises de DRX.....	74
5.2.3 Análises de MEV	77
5.3 ANÁLISES DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	86
5.3.1 Liberação em pH 3,0.....	86
5.3.2 Liberação em pH 7,0.....	87
5.3.3 Liberação em Solução de Fluido Gástrico - SFG.....	90
5.4 ANÁLISES DE DIGESTIBILIDADE.....	92
5.4.1 Análises de Digestibilidade Solução de Fluido Gástrico - SFG.....	92
5.4.2 Análises de Digestibilidade Solução de Fluido Intestinal – SFG + SFI.....	103
6. CONCLUSÃO.....	114
7. PERSPECTIVAS.....	115
8. REFERÊNCIAS	116
9. APÊNDICE	127

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui histórico de um dos maiores produtores de abacaxi do mundo, chegando em 2018 a quinta posição com produção de mais 2,0 milhões de toneladas. Dentre as regiões de maior produção se destacam o Norte, Nordeste e Sudeste no qual o Nordeste produz 40% de toda a safra do país. Embora seja um dos maiores produtores do mundo, a produção brasileira é destinada quase exclusivamente ao consumo *in natura* do fruto (EMBRAPA, 2017; FAO, 2019).

Além do sabor e aroma acentuados, o abacaxi contém enzimas proteolíticas com propriedades biológicas de interesse, conhecidas por bromelinas. As bromelinas são caracterizadas por uma mistura de diferentes tíois endopeptidases e outros componentes ainda não completamente caracterizados. As bromelinas estão presentes em diversas partes do abacaxi, principalmente, no caule (EC. 3.4.22.32) e na fruta (EC.3.4.22.33) os quais são comercialmente viáveis, sendo a primeira vendida no mercado, como fitoterápico, nutracêutico e aditivo farmacológico (CHOBOTOVA; VERNALLIS; MAJID, 2010; PAVAN et al., 2012; RATHNAVELU et al., 2016).

As enzimas produzidas no abacaxi possuem diversas aplicações, nas indústrias de alimentos, têxtil, cosmética e farmacêutica. Dentre as aplicações, a indústria farmacêutica apresenta grande potencial, devido as aplicações da bromelina em diversos tipos de enfermidades, como no debridamento de feridas, como agente anti-inflamatório, potencializador de antibiótico etc. (CHOBOTOVA; VERNALLIS; MAJID, 2010; RAMLI; AZNAN; ILLIAS, 2017).

Devido a dificuldades em se desenvolver produtos nutracêuticos, sistemas de liberação controlada são muito interessantes para uso de substâncias amplamente conhecidas. As bromelinas são proteínas com atividades biológicas amplamente discutidas em literatura, possuem propriedades muito interessantes e, mais recentemente, sido aplicadas em tratamentos de câncer e fármacos com atividade anti-inflamatória (BHATTACHARYYA, 2008; CHOBOTOVA; VERNALLIS; MAJID, 2010). Entretanto, apesar dos efeitos terapêuticos, as proteínas sofrem degradação no estômago devido ao baixo pH e ao ataque de enzimas digestivas, necessitando de sistemas capazes de resistir ao ambiente estomacal e liberar as proteínas no meio intestinal (TYAGI; PECHENOV; ANAND SUBRAMONY, 2018).

O alginato é um biopolímero com propriedades físicas muito interessantes, como na formação de esferas após processos de reticulação com íons, principalmente cálcio. Por se tratar de um polímero de origem natural, possui propriedades biológicas de interesse, como não toxicidade e baixa imunogenicidade, além de biocompatibilidade celular e biodegradabilidade no corpo humano (DE VOS et al., 2014; BATISTA, et al., 2019).

Apesar de aplicado no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, a utilização de alginato como agente encapsulante apresenta a desvantagem de formação de poros, da ordem de 5 a 200nm o que dificulta o desenvolvimento de cinéticas precisas de liberação controlada. Dessa forma, a utilização de técnicas de modificação é muito empregada para o desenvolvimento e aplicação de sistemas eficientes (FERNANDO et al., 2019).

Portanto, para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada utilizando alginato, é necessária compreensão de mecanismos de modificação das redes, uma vez que o alginato apresenta grupamentos funcionais carbonila e hidroxila, essenciais para o desenvolvimento desses sistemas. Dentre as diversas técnicas físicas de modificação das estruturas de alginato, a estereocomplexação é uma das que possuem maior potencial, devido a funcionalização ocorrer por via de interações eletrostáticas fracas, sem a necessidade de adição de solventes tóxicos (THANKI; DELLACHERIE; SIX, 2005; HOARE; KOHANE, 2008).

Dessa forma, o trabalho tem por objetivo o estudo e desenvolvimento de sistemas encapsulantes de alginato de sódio utilizando processos de estereocomplexação com aminoácidos, para o aumento da biodisponibilidade de bromelina.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o microencapsulamento de bromelina utilizando alginato de sódio combinado a aminoácidos carregados positivamente para aumento da biodisponibilidade no intestino por meio da técnica de estereocomplexação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

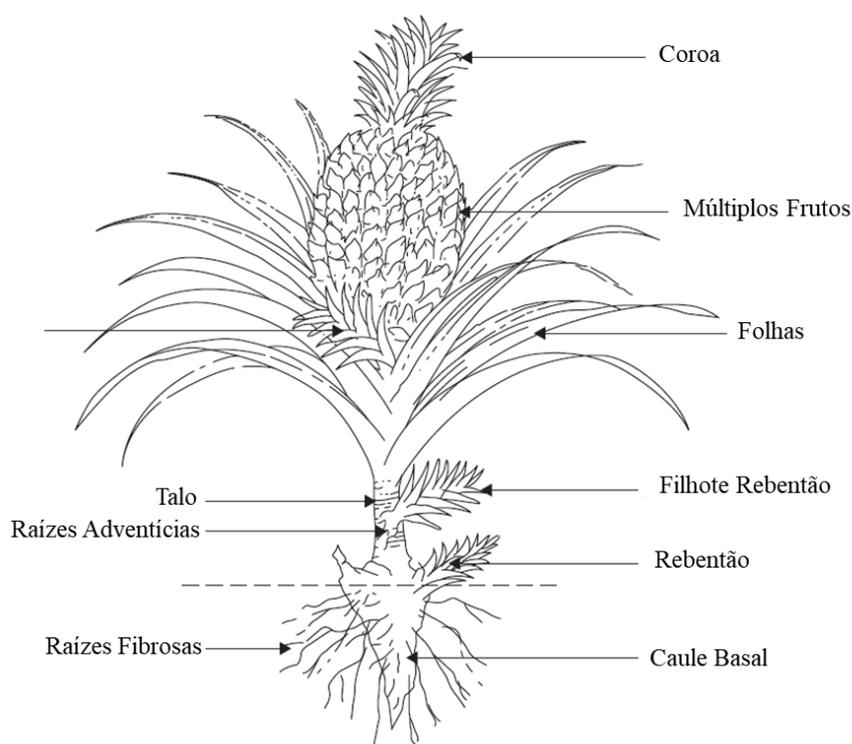
- Avaliar o efeito da combinação do alginato de sódio e l-lisina, l-arginina e l-histidina e suas combinações nas propriedades físico-químicas da bromelina encapsulada, através de análises de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IR/FTIR), Difractometria de Raios-X(DRX) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e, o impacto no teor de umidade e recuperação de sólidos nas partículas formadas.
- Monitorar o comportamento de liberação através de simulação da digestão *in vitro* e compreender o efeito dos diferentes aminoácidos na manutenção do teor e atividade enzimática da bromelina.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ABACAXI

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.) é uma planta da subclasse das monocotiledôneas, de gêneros *Ananas* e *Pseudoananas* da espécie *Ananas comosus* pertencente à família Bromeliaceae, única de sua família a ser produzida comercialmente devido ao seu fruto (TODKAR; PATIL, 2019). A planta atinge de 1 a 2 m de altura e largura, suas folhas são em espiral e terminam em flores que produzem frutos reunidos que compõem uma só infrutescência conhecido por abacaxi, conforme apresentado na Figura 1. O caule em seu centro atinge de 25 a 50 cm de comprimento, cercado por folhas que após a idade adulta e com fruto de abacaxi maduro, produzem de 60 a 80 folhas em formato de espada, ainda, apresentam pequenos filhotes que ao serem cultivados produzirão novas plantas e novas infrutescências e, conseqüente, novos frutos (LOBO; PAULL, 2017; SANEWSKI; BARTHOLOMEW; PAULL, 2018).

Figura 1: Morfologia do abacaxizeiro.



Fonte: Adaptado de HASSAN; OTHMAN; SIRIPHANICH, 2011.

Originário da América do Sul de países como Paraguai e Brasil, o abacaxizeiro foi exportado para outras partes do mundo através de viajantes, historiadores e, principalmente, seus colonizadores portugueses e espanhóis os quais disseminaram diversas informações sobre o abacaxi, desde seu plantio até a colheita (SCHERER et al., 2015). Por volta do século 16, o abacaxi já havia ganhado escala e produção em diversas regiões do mundo, tais como China, Índia, Costa Africana, Holanda e Inglaterra. Tais países obtiveram sucesso no cultivo do fruto, devido a características únicas de adaptação da planta a diferentes solos e ambientes tropicais favoráveis (SANEWSKI; BARTHOLOMEW; PAULL, 2018).

Além do sabor doce e aroma acentuado, o abacaxi é rico em nutrientes essenciais, tais como vitaminas, fibras e sais minerais (CORRÊA et al., 2017). Dessa forma, sua composição faz dele um ótimo candidato para dietas balanceadas e de alto valor nutritivo. A Tabela 1 mostra a composição química do abacaxi e as quantidades nutricionais para 100g do fruto (BORTOLATTO; LORA, 2008).

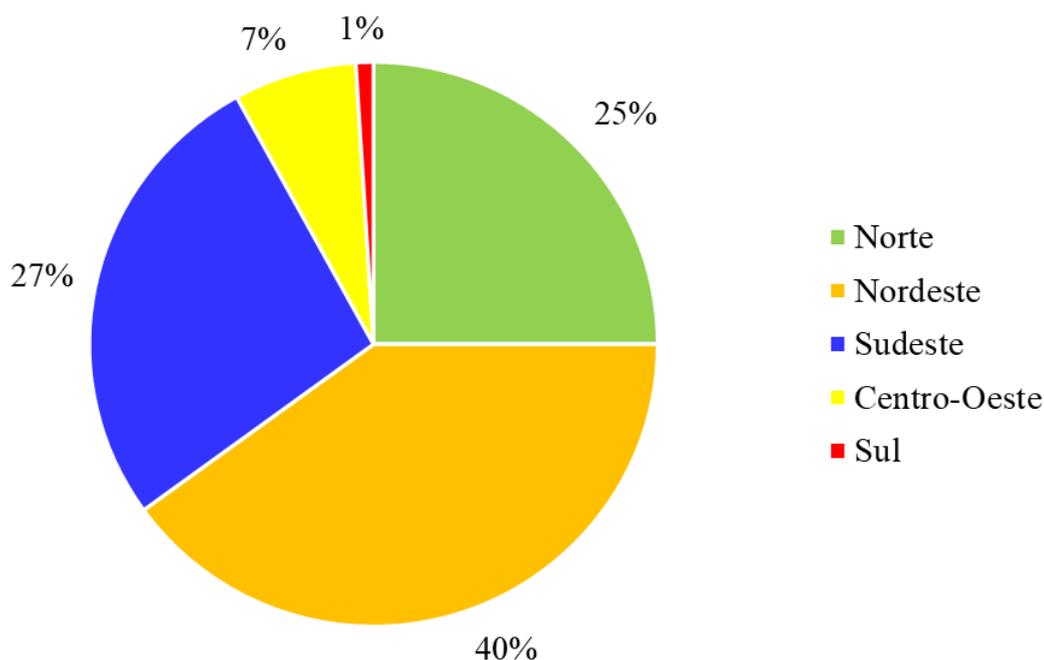
Tabela 1: Composição química média do abacaxi.

Parâmetro	Quantidade (100g do fruto)
Calorias (kcal)	62,16
Proteínas (%)	1,47
Lipídios (%)	0,24
Fibra (%)	0,60
Carboidrato (%)	13,53
Umidade (%)	83,78
Cálcio(mg)	18,00
Ferro(mg)	0,50
Fósforo(mg)	8,00
Vitamina C(mg)	28,10
Niacina (mg)	0,82
Tiamina (µg)	80,00
Riboflavina (µg)	128,00
Retinol (µg)	5,00

Fonte: Adaptado de BORTOLATTO; LORA, 2008.

No ano de 2018 o Brasil produziu mais de 2,0 milhões de toneladas de abacaxi, sendo o maior produtor da América do Sul e o quinto maior produtor no mundo (FAO, 2019). Grande parte da produção brasileira se concentra nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste, no qual a região Nordeste é responsável por 40% da produção, conforme Figura 2 (EMBRAPA, 2017). A maior parte da produção é destinada ao consumo interno, uma vez que o abacaxi fresco possui baixo tempo de prateleira e alta susceptibilidade a danos mecânicos devido às suas características físicas e bioquímicas o que dificulta a exportação para os grandes consumidores mundiais, como EUA e EU (FAO, 2018).

Figura 2: Produção brasileira de abacaxi por região em 2017.



Fonte: Adaptado de EMBRAPA, 2017.

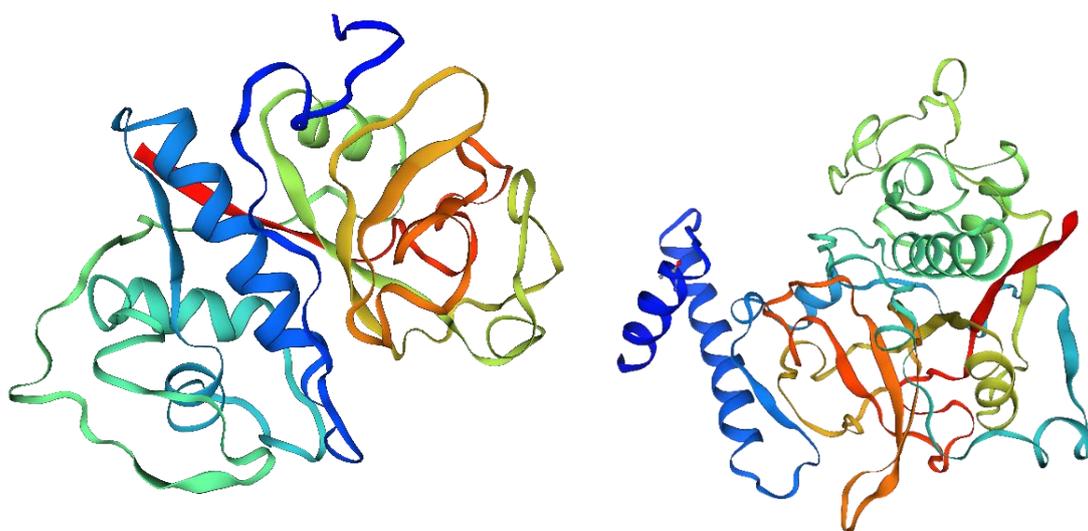
Dentre os diversos componentes que constituem o abacaxi, a bromelina é o princípio ativo de maior aplicação na medicina que ele possui. Classificada como cisteína protease, a bromelina possui diversas propriedades terapêuticas efetivas no tratamento de diversas enfermidades e, por se tratar de uma enzima proteolítica, seu consumo auxilia na digestão de proteínas e no trânsito intestinal. Ainda, possui efeitos vasodilatadores, propriedades anti-inflamatórias e antitumorais (CHOBOTOVA; VERNALLIS; MAJID, 2010; RATHNAVELU et al., 2016).

3.1.1 Bromelina

Bromelina é o nome dado ao extrato bruto de proteínas com função digestiva presentes nos vegetais da família Bromeliaceae, das quais o abacaxi (*Ananas comosus* L.) é o mais conhecido. As bromelinas constituem uma complexa mistura de diferentes tíois endopeptidases e outros componentes ainda não caracterizados, como fosfatases, glucose oxidases, peroxidases, celulases, glicoproteínas, carboidratos, e muitos outros. São encontradas em diversas partes do abacaxizeiro, como caule, folhas, casca e fruta, entretanto, apenas as produzidas no caule e na fruta são comercialmente viáveis (PAVAN et al., 2012; RATHNAVELU et al., 2016).

As bromelinas são diferenciadas principalmente por seu peso molecular e ponto isoelétrico nas quais a bromelina do caule apresenta peso molecular de 33kDa e ponto isoelétrico em pH 9,5, sendo a proteína mais encontrada nos tecidos do abacaxi, enquanto, a bromelina do fruto apresenta peso molecular de 28kDa e ponto isoelétrico em pH 4,6 que apesar de se apresentar em menores quantidades se comparada a do caule, apresenta atividade enzimática mais acentuada (ARSHAD et al., 2014; MANZOOR et al., 2016). A Figura 3, mostra as diferenças estruturais entre a bromelina do caule e a bromelina da fruta.

Figura 3: Representação cartoonizada das bromelinas do caule (à esquerda) e do fruto (à direita).



Fonte: SWISS-MODEL(2019a) e SWISS-MODEL(2019b).

Dessa forma, a produção e disponibilização comercial da bromelina do caule é uma realidade de Mercado, já que sua fonte, o caule, é obtido como resíduo do processamento do fruto o qual é consumido *in natura* ou processado para consumo na indústria de alimentos (RAMLI; AZNAN; ILLIAS, 2017).

As bromelinas possuem aplicações em diversas áreas, como na medicina, saúde, alimentos e cosméticos. São utilizadas como amaciante de carne, agente digestivo, ativo cosmético, agente fibrinolítico, anti-inflamatório, potenciador de antibiótico, agente de desbridamento de feridas etc. (RAMLI; AZNAN; ILLIAS, 2017). O Quadro 1 mostra as utilizações industriais da bromelina.

Quadro 1: Aplicações industriais da bromelina comercial.

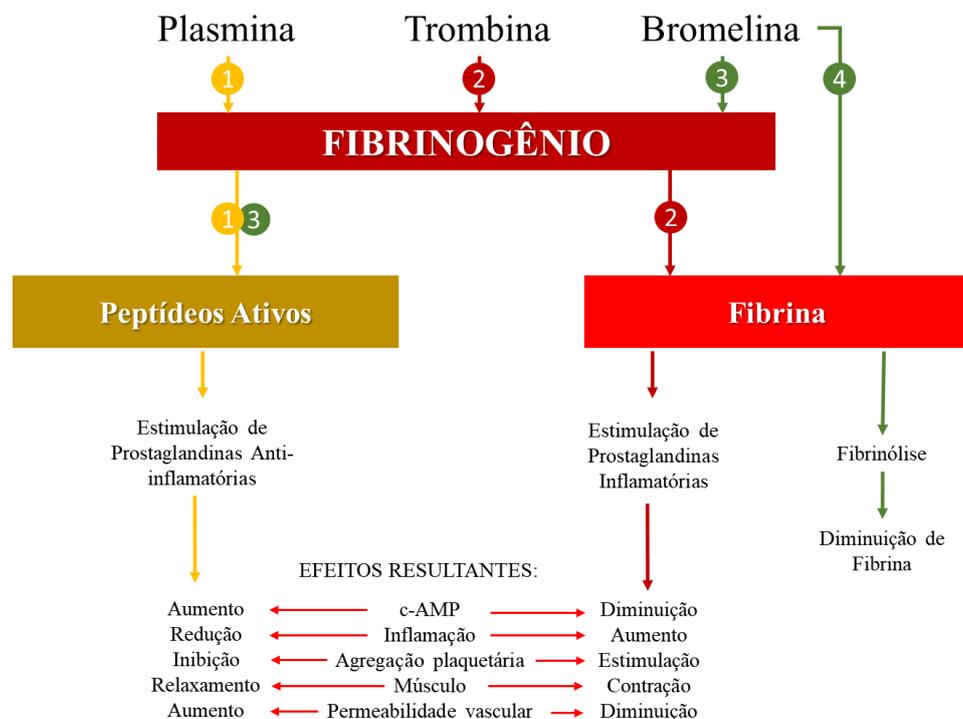
Aplicação	Propriedade
Industria de Panificação	Relaxante de massa permitindo que a massa suba uniformemente
	Produção de farinha hipoalergênica
Tenderização	Hidrólise de proteínas de miofibrilas da carne
	Agente de hidrólise para carne, ostra, frango e lula
Hidrolisado de Proteína de Peixe	Agente de hidrólise de proteína de peixe
Agente Anti escurecimento	Inibidor de escurecimento dos frutos e a oxidação do fenol
Produção de Álcool	Estabilizante proteico de cervejas
	Agente bloqueador de turbidez
Alimentação Animal	Agente de degradação estimada de proteínas nos alimentos para ruminantes
Indústria Têxtil	Agente de amolecimento no cozimento de casulos
	Removedor de impurezas em lã e fibras de seda
	Agente auxiliador para tingimento de fibras proteicas
Clareamento Dental	Removedor de manchas, placas e restos de comida da superfície dos dentes
Indústria Cosmética	Agente de tratamento de acne, rugas e pele seca
	Agente de redução de hematomas e inchaço pós-injeção

Adaptado de ARSHAD et al., 2014

Além das aplicações na indústria de alimentos, bebidas, têxtil e cosmética, as aplicações da bromelina no uso farmacêutico têm ganhado destaque, tendo em vista sua forte atividade proteolítica, anti-inflamatória e baixa toxicidade. Estudos classificam a bromelina como substância de baixíssima toxicidade, com dose letal superior a 10g/kg para camundongos, ratos e coelhos. Dessa forma, o uso de bromelina em diversas áreas farmacêuticas, principalmente aquelas relacionadas a terapias, tratamento e suplementação tem crescido (HALE, 2004; DEBNATH et al., 2019; ORLANDI-MATTOS et al., 2019).

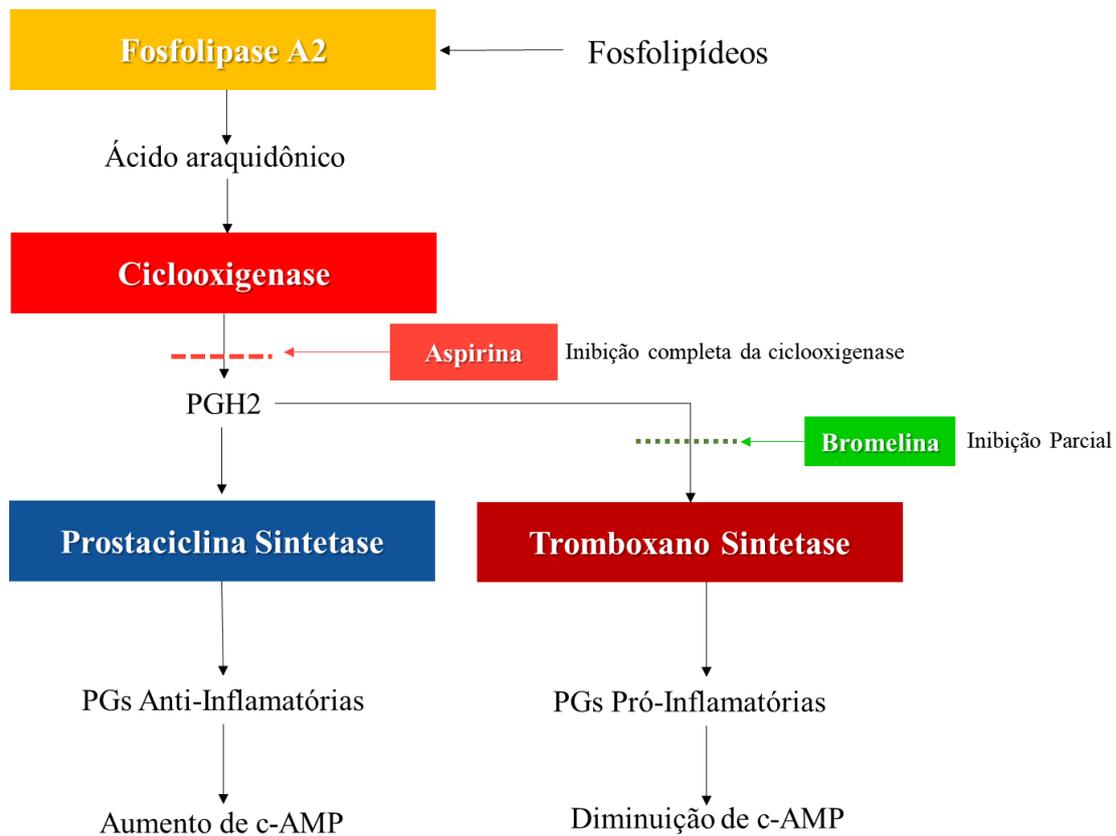
As principais aplicações farmacológicas, incluem atividades fibrinolítica e antitrombótica, conforme Figuras 4 e 5 respectivamente. Ainda, possui propriedades de modificação estrutural da superfície de células, prevenindo edemas, agregação plaquetária e metástases. Devido sua capacidade proteolítica, apresenta ação na permeabilidade de tecidos o que auxilia na melhor absorção de antibióticos, no desbridamento de tecidos necrosados e em tecidos lesionados por queimaduras, na modulação de citocinas e do sistema imune, nas propriedades mucolíticas e na digestão, na cicatrização de feridas e no aumento da aptidão cardiorrespiratória (TAUSSIG, 1980).

Figura 4: Mecanismo de ação da bromelina na ativação de peptídeos e na fibrinólise.



Fonte: Adaptado de TAUSSIG, 1980.

Figura 5: Mecanismo de ação da bromelina na inibição parcial da síntese trombótica.



Fonte: Adaptado de TAUSSIG, 1980.

Alguns estudos correlacionam o uso de bromelina em terapias oncológicas, para a redução, retardamento e tratamento de câncer. Os avanços indicam a regressão, diminuição e retardo dos cânceres de mama, leucemia e ovário. Ainda, da capacidade de antimetástase em câncer de pulmão e da inibição de fatores proteicos em melanoma (CHOBOTOVA; VERNALLIS; MAJID, 2010; RATHNAVELU et al., 2016; WANG et al., 2018; DEBNATH et al., 2019; KWATRA, 2020).

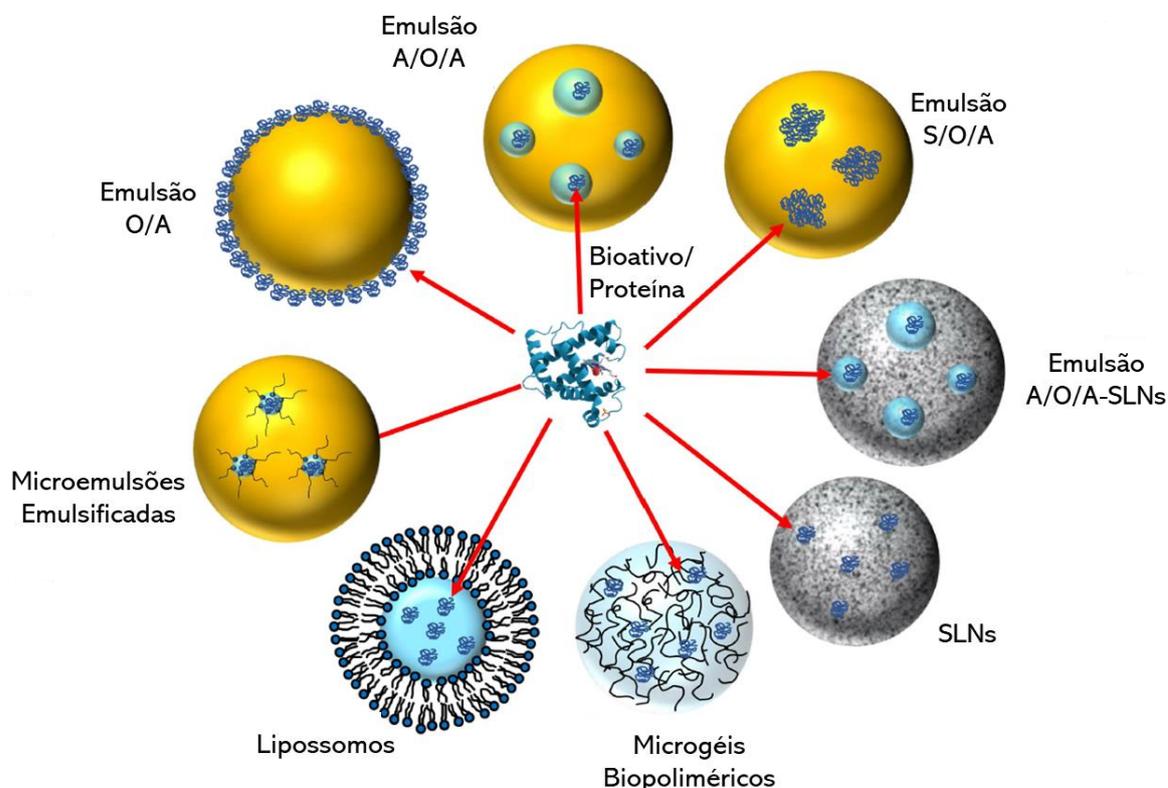
Apesar de muito utilizada na indústria farmacêutica a correta dosagem de bromelina ainda é desconhecida, tendo em vista que sua biodisponibilidade e bioacessibilidade ainda são um desafio. Por ser uma proteína, a bromelina é degradada no suco gástrico por ação combinada do pH gástrico e da pepsina, uma forte protease estomacal. Estudos demonstram a absorção de bromelina no organismo humano é realizada somente no trato intestinal e com pouco mais 40% de efetividade, ainda algumas literaturas utilizam formulações com doses superiores a 60mg por dia para uso terapêutico (BHATTACHARYYA, 2008).

Assim, a fragilidade de enzimas e proteínas como a bromelina ainda é um grande entrave na utilização com aplicações farmacológicas, já que uma pequena mudança na estrutura conformacional pode reduzir sua atividade. Além de desafios no aumento do tempo de estocagem e da estabilidade, para maior bioacessibilidade e biodisponibilidade no organismo humano (TYAGI; PECHENOV; ANAND SUBRAMONY, 2018).

3.2 ENCAPSULAMENTO

Encapsulamento é conhecido como o processo capaz de estabilizar ou proteger determinado composto ativo num material carreador, a fim de gerar sistema estável e protetor de tamanho e propriedades variadas (ZUIDAM; SHIMONI, 2010; GAONKAR, et al., 2014; MCCLEMENTS, 2018). A Figura 6 apresenta os tipos de encapsulados mais utilizados em processos de proteção de proteínas.

Figura 6: Representação dos tipos de encapsulado aplicados na proteção de proteínas os quais podem ser emulsões de combinação água(A), óleo(O), surfactante(S) e lipídios sólidos nanoparticulados (SLNs), além de lipossomos e géis biopoliméricos como alginato.



Fonte: Adaptado de MCCLEMENTS, 2018.

A aplicação da tecnologia de encapsulamento é amplamente utilizada nas indústrias alimentícia e farmacêutica, com a finalidade de preservar compostos bioativos, tais como polifenóis, micronutrientes, enzimas, antioxidantes, fármacos etc., protegendo contra condições extremas ou variáveis de luz, oxigênio, pH, umidade, calor e cisalhamento, aumentando assim a validade, estabilidade e viabilidade do agente encapsulado (MCCLEMENTS, 2017; SHISHIR et al., 2018; MCCLEMENTS, 2020).

O processo também é empregado para adquirir ou modificar propriedades físicas dos agentes ativos ou mesmo dos materiais encapsulantes, como para mascarar aromas ou sabores desagradáveis, manusear materiais tóxicos de forma segura, reduzir perdas por evaporação e inflamabilidade de líquidos, confinar gotículas de líquido em partículas sólidas, diminuir a reatividade de agente ativo, na manutenção e modulação de agente ativo etc. Ainda, é a técnica mais empregada na liberação controlada de fármacos e bioativos em determinadas condições ou meios, a taxas necessárias ou cinética ideal (TUPUNA et al., 2018; WANG; SELOMULYA, 2020).

Os materiais de parede possuem diferenças significativas em suas propriedades físico-químicas, como peso molecular, polaridade, solubilidade etc. o que influencia diretamente nas propriedades dos sistemas. Portanto, a natureza do material governa os resultados do processo de encapsulamento e são a chave para atingir as características desejadas no produto, seja na morfologia da partícula, na eficiência de encapsulamento ou na estabilidade e viabilidade do agente protegido (CALVO et al., 2012; LABUSCHAGNE, 2018; TUPUNA et al., 2018).

Além do material de parede, o tamanho da partícula também é ponto crucial para a aplicação final do agente protegido, pois critérios de estabilidade mecânica, morfologia e área superficial são muito importantes para o encapsulamento adequado e geração de partículas funcionais (ARSLAN et al., 2015). Os processos de encapsulamento utilizam técnicas capazes de reduzir o tamanho das partículas, gerando matrizes da ordem de 1 a 1000 μm até nanosistemas da ordem de 0,01 a 1 μm (DA COSTA NETO et al., 2019).

A seleção do processo de encapsulamento é determinada pelas propriedades físicas e químicas dos materiais e da aplicação pretendida dos agentes encapsulados. Dessa forma, o processo de formação de determinado produto pode requerer da combinação de duas ou mais das técnicas, como no caso da microencapsulação por

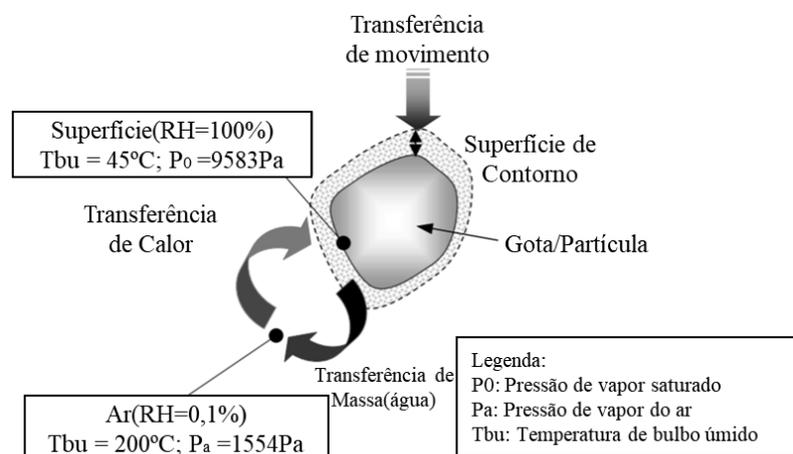
emulsificação seguida de secagem por pulverização, utilizada para a produção de sistemas ricos em compostos bioativos (BOTREL et al., 2014; DI BATTISTA et al., 2017).

3.2.1 Spray Dryer

Dentre diversas tecnologias empregas na encapsulação de compostos bioativos, a técnica de secagem por spray drying é a mais efetiva e mais comumente utilizada, além de ser uma das mais antigas. A técnica apresenta muitas vantagens, frente a processos concorrentes como a liofilização pode ser até dez vezes mais barato, apresenta versatilidade de configuração de parâmetros operacionais como injeção de ar, fluxo de sprays, variação de pulverizadores o que possibilita o atendimento a diversos tipos de parâmetros de qualidade e eficiência, principalmente no setores industriais do ramo de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (ARPAGAUS et al., 2018).

A secagem por spray drying é especialmente útil na secagem de sistemas de encapsulamento de bioativos sensíveis ao calor, pois o aumento da temperatura na matriz permanece limitado durante todo o processo de secagem. Durante a maior parte do tempo de secagem, a superfície da partícula permanece úmida e a temperatura local do ar circundante não excede a 50°C. Conseqüentemente, a alteração físico-química de compostos sensíveis ao calor, como oxidação, desnaturação e perda de propriedades biológicas permanece limitada (NANDIYANTO; OKUYAMA, 2017). A Figura 7 mostra o mecanismo do processo de secagem e temperaturas atingidas.

Figura 7: Princípio de transferência de calor e massa no processo de secagem por spray drying.



Fonte: Adaptado de NANDIYANTO; OKUYAMA, 2017.

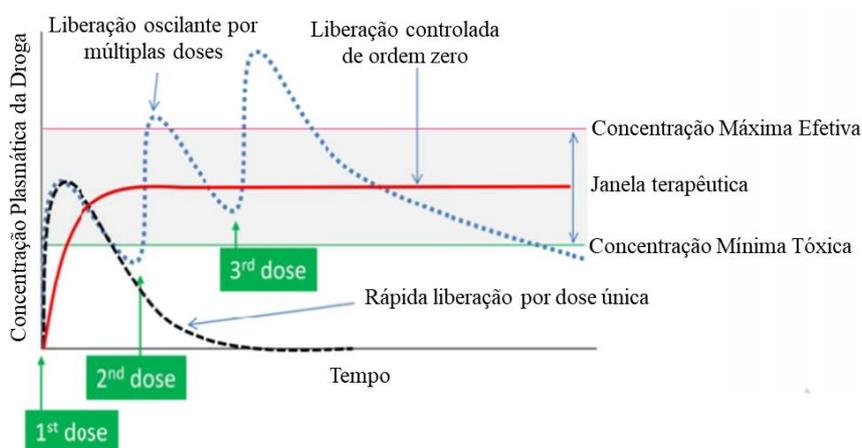
3.3 LIBERAÇÃO CONTROLADA

A liberação controlada se refere a presença ou entrega de determinada substância através da resposta a um estímulo, como variações de pH, ataque enzimático, luz, campo magnético, temperatura, ultrassom, osmose e controle eletrônico, ou mesmo com relação ao tempo. É definido como uma técnica cujo um ou mais elementos ativos se tornam viáveis em determinado local e tempo a uma dada taxa específica de entrega (BRUNEAU et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

Devido à dificuldade e altos custos no desenvolvimento de novos medicamentos, a indústria farmacêutica busca o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, uma vez que existem muitas vantagens na aplicação desses sistemas, como também muitos desafios (MÄDER et al., 2018).

As principais vantagens estão relacionadas com a integridade da substância, como também na entrega a determinada taxa de dosagem, incluem também a manutenção da concentração do ativo e efeito terapêutico, aumento da eficiência do tratamento e menores quantidades de ativo, diminuição de efeitos colaterais, menor frequência de administração e aumento da conveniência e confiança do paciente (LAU et al., 2018; CHENG et al., 2019). A Figura 8 mostra como variam as concentrações no plasma sanguíneo dos medicamentos em sistemas de liberação controlada, por via injetável e comprimido.

Figura 8: Variação das concentrações no plasma sanguíneo dos medicamentos em sistemas de liberação controlada (linha vermelha), por via injetável (linha azul pontilhada) e por comprimido não revestido (linha preta pontilhada).



Fonte: Adaptado de LEE; YEO, 2015.

Os principais desafios no desenvolvimento de sistemas com liberação controlada são a biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de revestir altas quantidades de ativo e liberação em determinado local e mecanismo de liberação. Dentre os maiores desafios no desenvolvimento desses sistemas, está o desenvolvimento de sistemas capazes de entregar macromoléculas como peptídeos e proteínas em determinadas partes do sistema digestivo (GUPTA; MOHANTY, 2017; KANG et al., 2018; WAGNER; GRAN; PEPPAS, 2018).

Os fármacos proteicos têm grande especificidade e atividade a baixas concentrações quando comparados as drogas químicas. Esses atributos tornam os fármacos proteicos indispensáveis no tratamento e combate a diversas doenças humanas (LEADER; BACA; GOLAN, 2008; SAUNA et al., 2017).

Os principais desafios no desenvolvimento de formulações farmacêuticas compostas por proteínas, está a instabilidade física e química dessas substâncias, principal razão pela qual são administradas tradicionalmente por injeção, ao invés de via oral como a maioria dos medicamentos químicos (WAGNER; GRAN; PEPPAS, 2018). Problemas como como degradação ácida no estômago, ataque proteolítico no trato gastrointestinal, baixa permeabilidade na mucosa gastrointestinal e metabolização rápida pelo organismo são os principais desafios a serem vencidos.

Dentre os diversos materiais utilizados em sistemas de liberação controlada, os polímeros naturais têm ganhado destaque, em virtude de suas propriedades bioquímicas desejadas, como baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Biopolímeros como alginato de sódio, quitosana, celulose, gelatina e pectina são cada vez mais empregados no desenvolvimento desses sistemas (RAHMANI; SHEARDOWN, 2018; KAHYA; ERIM, 2019; MAO et al., 2019; KAUR; JINDAL; JINDAL, 2020).

3.3.1 Alginato

O alginato é um biopolímero natural derivado de algas marinhas e um heteropolímero composto por dois tipos de resíduos β -D-manurônico (bloco M) e ácido α -L-gulurônico (bloco G) de forma linear, dispostos na repetição de blocos GG, MM ou blocos MG de forma alternada. Por ser um polímero natural, apresenta diversas aplicações

biotecnológicas e biomédicas, uma vez que possui alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, não imunogenicidade, capacidade quelante e possibilidade de modificação química (DONG; WANG; DU, 2006; DE VOS et al., 2014; BATISTA, et al., 2019).

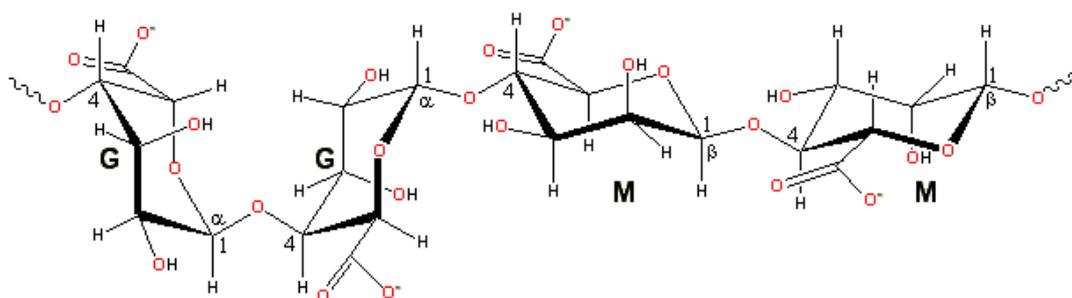
O encapsulamento com alginato, é especialmente útil para encapsulamento de biomoléculas, principalmente macromoléculas, uma vez que a matriz gelatinosa é inerte e formada sob condições brandas de temperatura e pH. Apesar de muito empregada no encapsulamento de macromoléculas como proteínas e peptídeos, a matriz formada apresenta poros de 5 a 200nm o que leva a sistemas de rápida liberação. Dessa forma, algumas estratégias são empregadas para reduzir a difusão, como combinações com outros polímeros, modificações químicas por ligação covalente, modificações por hidrofobicidade e complexação com polímeros de diferentes cargas (YANG; XIE; HE, 2011; FERNANDO et al., 2019).

3.3.2 Alginato e Modificações

Os hidrogéis são muito utilizados na indústria farmacêutica em formulações de sistemas de liberação controlada, especialmente o alginato de sódio devido a sua fácil manipulação e características inertes a diversas drogas farmacêuticas. A literatura apresenta vários métodos de modificação física e química em redes de alginato, no entanto, para a modificações eficientes é essencial conhecer as propriedades químicas das reações envolvidas na modificação ou reticulação das redes (HOARE; KOHANE, 2008; FERNANDO et al., 2019).

Os métodos de modificação utilizam da reatividade química dos grupos funcionais do alginato, especialmente as dos grupos hidroxila nas posições C2 e C3 e do grupamento carboxila na posição C6. Devido as diferenças na reatividade dos grupos funcionais hidroxila e carbonila, as reações quimio-seletivas a determinado grupamento funcional, ocorrem relativamente de forma direta. Entretanto, alcançar reações seletivas a apenas um dos grupos hidroxila é mais desafiador, uma vez que eles exibem apenas pequenas diferenças de reatividade, devido suas localizações na cadeia (VENKATESAN, ANIL e KIM, 2017). A Figura 9 mostra os grupos funcionais da rede de alginato, assim como as posições relativas.

Figura 9: Representação do alginato e suas posições dos grupamentos funcionais.



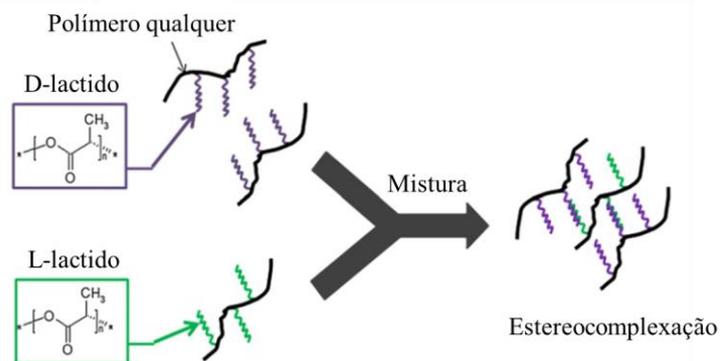
Fonte: Adaptado de ARAB et al., 2019.

As técnicas de modificação de dividem em interações físicas e reações químicas. Nas modificações físicas, utiliza-se dos grupos funcionais para interações entre cadeia grupo funcional, como interações hidrofóbicas, interações de carga, interações por interações de hidrogênio, estereocomplexação e química supramolecular, enquanto que nas modificações químicas, os grupos funcionais sofrem ligações químicas ou reticulação, como ligação covalente, ligação por moléculas pequenas, ligação polímero-polímero e otimização por gelificação *in situ* por UV (HOARE; KOHANE, 2008; YANG; XIE; HE, 2011).

O principal desafio na utilização de métodos de modificação química é a utilização de agentes de ligação, pois devido sua alta reatividade apresentam algum nível de toxicidade, como glutaraldeído, 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxissuccinimida (NHS), p-benzoquinona (PBQ) e muitos outros, o que dificulta consideravelmente a aplicação em sistemas farmacológicos (MOHY ELDIN et al., 2015; MASINA et al., 2017; BANKS et al., 2019; FERNANDO et al., 2019; MAO et al., 2019).

Dentre as diversas modificações em estruturas de hidrogéis, a estereocomplexação através dos grupamentos funcionais se apresenta como alternativa, já que se pode utilizar pequenas moléculas funcionais, como l-lactídeo e d-lactídeo os quais quando aplicados a dextrano induzem a gelatinização espontânea em água, resultando em redes com excelentes biocompatibilidade e biodegradabilidade, sem a necessidade de etapas de lavagem, diálise ou uso de solventes orgânicos os quais interagem fortemente com proteínas e peptídeos gerando degradação (THANKI; DELLACHERIE; SIX, 2005; (HOARE; KOHANE, 2008). A Figura 10, mostra as interações entre oligômeros de ácido láctico e polímeros.

Figura 10: Modelo de modificação de alginato por via de estereocomplexação.

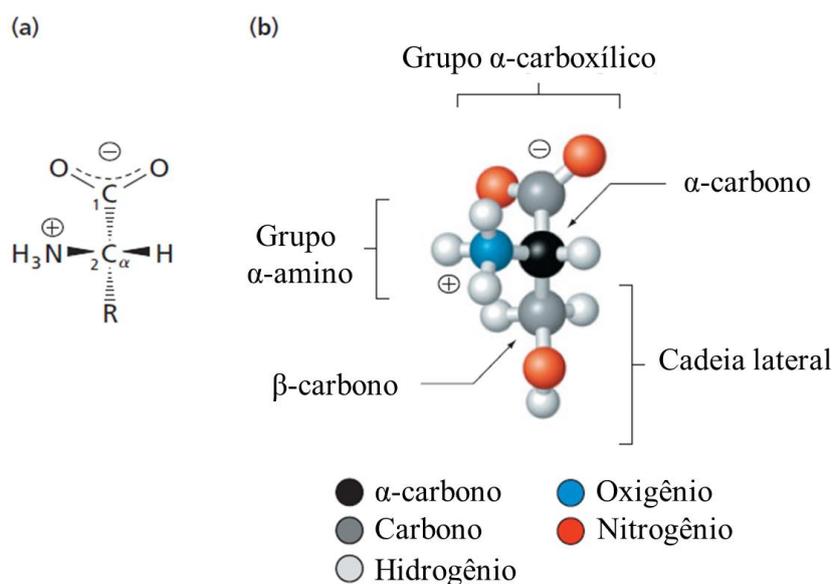


Fonte: Adaptado de HOARE; KOHANE, 2008.

3.3.3 Aminoácidos

Conhecidos por compor proteínas e por funções biológicas, os aminoácidos são substâncias que apresentam um átomo de carbono, denominado como carbono α , ligado a grupamento carboxila (COOH) e grupamento amino (NH₂). São classificados quanto as cadeias laterais ou grupamento R, que varia com a estrutura, tamanho e carga elétrica (NELSON e COX, 2018). A Figura 11 apresenta a estrutura geral dos aminoácidos.

Figura 11: Em (a), estrutura comum aos aminoácidos, em (b), estrutura da serina em modelo bola-e-bastão.



Fonte: Adaptado de MORAN, 2011.

São conhecidos mais de 700 aminoácidos, a maioria classificados como α -aminoácidos e produzidos por fungos, bactérias, algas e plantas. Dentre os aminoácidos conhecidos, apenas 20 são utilizados na síntese de proteínas, conhecidos por aminoácidos comuns ou aminoácidos padrão os quais recebem abreviação especial composta por três letras. As abreviações são empregadas para indicação da composição e sequência de aminoácidos constituintes das proteínas (MORAN, 2011; BARRETT, 2012; NELSON e COX, 2018).

As propriedades físicas e bioquímicas dos aminoácidos são diretamente correlacionadas com o grupamento funcional e da habilidade em apresentar ou não polarização. A classificação dos aminoácidos é apresentada no Quadro 2, no qual são divididos em cinco classes, baseadas nas habilidades de interação do grupamento R com água e ionização às variações de pH (MORAN, 2011; NELSON e COX, 2018).

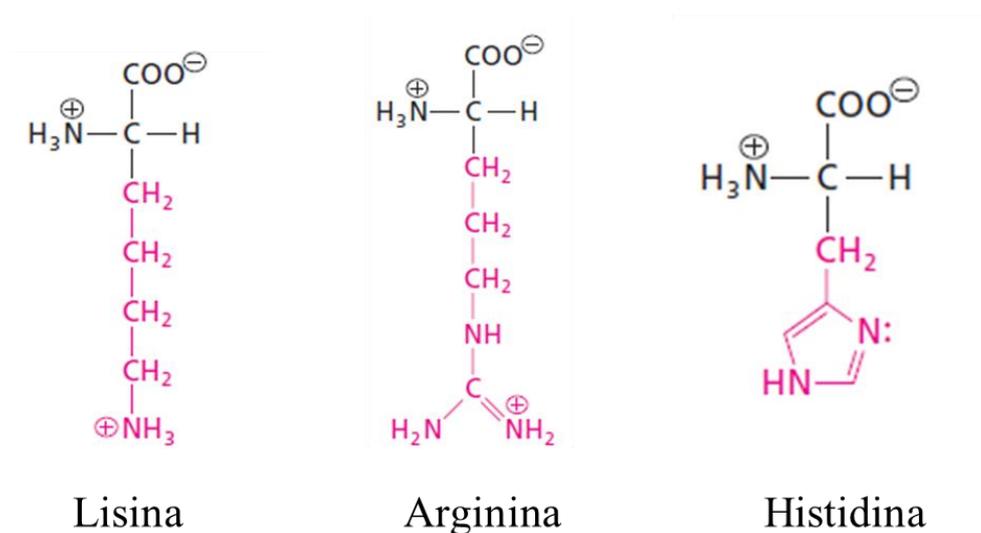
Quadro 2: Classificação dos aminoácidos e valores de pKa e pI.

Classificação	Aminoácido	Abreviação	Valores de pKa			pI
			pK ₁ (-COOH)	pK ₂ (-NH ₃)	pK _R (Grupo R)	
Grupos R alifático não polar	Glicina	Gli	2,34	9,6	-	5,97
	Alanina	Ala	2,34	9,69	-	6,01
	Proline	Pro	1,99	10,96	-	6,48
	Valine	Val	2,32	9,62	-	5,97
	Leucina	Leu	2,36	9,6	-	5,98
	Isoleucina	Ile	2,36	9,68	-	6,02
	Metionina	Met	2,28	9,21	-	5,74
Grupos R Aromáticos	Fenilalanine	Phe	1,83	9,13	-	5,48
	Tirosina	Tyr	2,2	9,11	10,07	5,66
	Triptofano	Trp	2,38	9,39	-	5,89
Grupos R Polares Não Carregados	Serina	Ser	2,21	9,15	-	5,68
	Treonina	Thr	2,11	9,62	-	5,87
	Cisteína	Cys	1,96	10,28	8,18	5,07
	Aspargina	Asn	2,02	8,8	-	5,41
	Glutamina	Gln	2,17	9,13	-	5,65
Grupos R Carregados Positivamente	Lisina	Lys	2,18	8,95	10,53	9,74
	Histidina	His	1,82	9,17	6	7,59
	Arginina	Arg	2,17	9,04	12,48	10,76
Grupos R Carregados Negativamente	Aspartato	Asp	1,88	9,6	3,65	2,77
	Glutamato	Glu	2,19	9,67	4,25	3,22

Fonte: Adaptado de NELSON e COX, 2018.

Dentre as classificações dessas substâncias, os aminoácidos são classificados como aminoácidos carregados positivamente. Os aminoácidos com características básicas sob pH 7,0 são: a lisina, com um segundo grupamento amino primário na cadeia alifática, a arginina, com grupamento guanidínio positivamente carregado e a histidina, com grupamento aromático imidazol (NELSON e COX, 2018). A Figura 12 apresenta aminoácidos carregados positivamente.

Figura 12: Estados de protonação da lisina, arginina e histidina.



Fonte: Adaptado de MORAN, 2011.

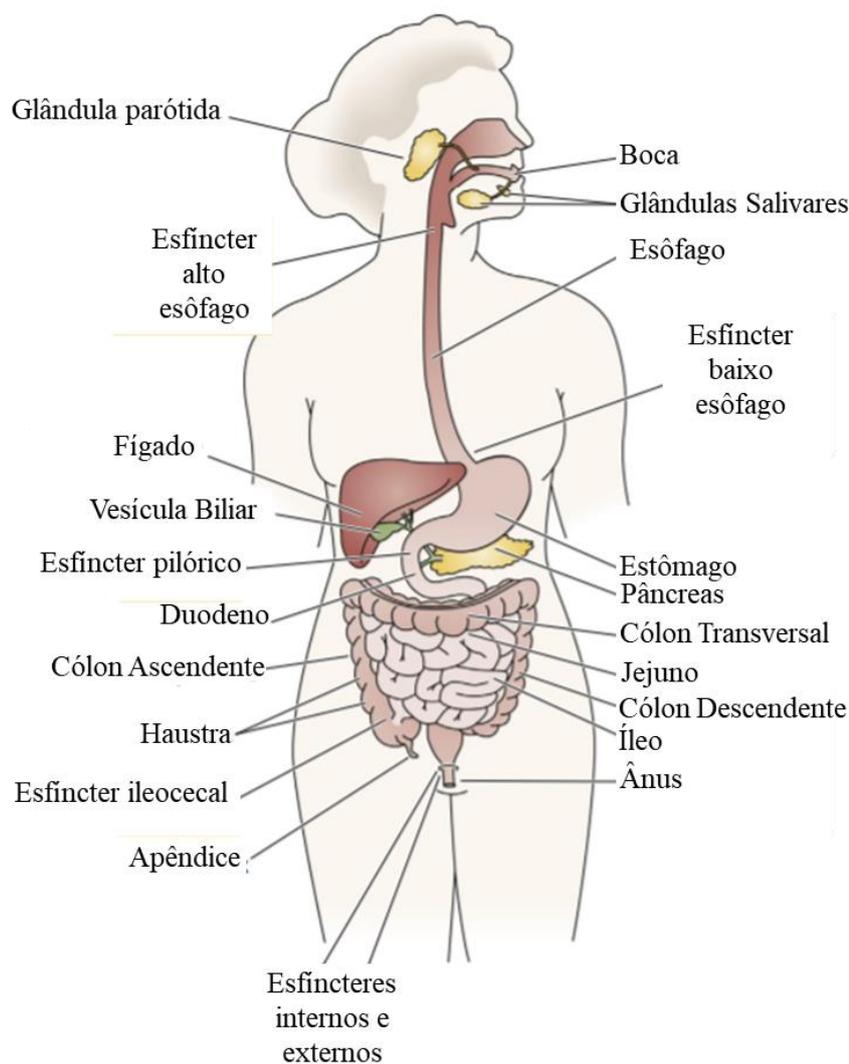
3.4 SISTEMA DIGESTIVO

O sistema gastrointestinal compreende os órgãos interligados desde a boca até o ânus, compreende ainda o pâncreas, responsável pela secreção de sucos digestivos no intestino, além do fígado e vesícula biliar, responsáveis por funções metabólicas vitais e produção de substâncias essenciais na absorção de nutrientes (KESHAV, 2009; BROWNLEE, 2014; TYAGI; PECHENOV; ANAND SUBRAMONY, 2018)).

Nos seres humanos, o trato é altamente especializado, estruturado e funcional. A boca e os dentes realizam a desintegração física dos alimentos e ataque enzimático inicial realizado por enzimas amilolíticas, são conectados ao estômago por um poderoso tubo muscular, conhecido como esôfago. No estômago, os alimentos são armazenados por

determinado tempo para a realização dos principais processos digestivos. Após o processamento no estômago, o bolo alimentar é enviado ao jejuno e íleo onde sofre processos digestivos mais especializados, além dos processos de absorção dos nutrientes, por fim o cólon realiza reabsorção da água da corrente advinda do jejuno e íleo formando uma massa semissólida que é posteriormente excretada, a Figura 13 apresenta o sistema digestivo humano (TYAGI; PECHENOV; ANAND SUBRAMONY, 2018; CARLSON, 2019).

Figura 13: Sistema digestivo humano.



Fonte: Adaptado de CARLSON, 2019.

No processo de digestão, enzimas digestivas são produzidas em diferentes partes do sistema gastrointestinal, incluindo boca, estômago e pâncreas, sendo o último o maior

produtor de enzimas digestivas. Quando há desequilíbrio na sua função, efeitos de má absorção de nutrientes e controle de açúcares são observados (KESHAV, 2009; BROWNLEE, 2014).

Além de enzimas, o processo de digestão necessita de metabólitos para a digestão de cadeias complexas de gorduras e vitaminas lipossolúveis. Dessa forma, o fígado juntamente a vesícula biliar produzem sais específicos para emulsão e absorção de ácidos graxos, além de fosfolipídios, colesterol, bilirrubina, eletrólitos e metais traços, imunoglobulinas e glicoproteínas (KESHAV, 2009; CARLSON, 2019).

O sistema digestivo apresenta grande área superficial o qual necessita de proteção contra lesões e processos inflamatórios, principalmente aqueles ocasionados por microorganismos patógenos e substâncias tóxicas ou irritantes, ingeridas junto com os alimentos, além da própria população de bactérias que povoam o intestino (TYAGI; PECHENOV; ANAND SUBRAMONY, 2018; GOUBA et al., 2019).). A literatura estima que o número de espécies diferentes de bactérias vivas presente no sistema, possa variar de 500 a 1000. Nas fezes, a quantidade em massa de bactérias vivas varia até 10^8 a 10^{10} por grama, enquanto no corpo humano pode conter até 10^{12} (KASTL et al., 2020).

Portanto, desequilíbrios na mucosa intestinal são muito desafiadores para o sistema imunológico, uma vez que podem levar a um quadro de inflamação grave, gerando até doenças severas como colite, úlcera e doença inflamatória intestinal (HULLAR, BURNETT-HARTMAN e LAMPE, 2014; BARBARA et al., 2016; BAJAJ et al., 2018; GOUBA et al., 2019).

3.4.3 Biodisponibilidade

A alta eficiência, baixa toxicidade e boa biocompatibilidade fazem dos peptídeos e proteínas soluções muito interessantes no tratamento de várias doenças. Entretanto, devido a fragilidade em ambientes biológicos, além da hidrofobicidade e grande peso molecular, dificultam a baixa permeabilidade e dosagem adequada a níveis farmacêutico o que limita o uso sistêmico e obriga a administração por via injetável. O uso de injetáveis, causa ansiedade, dor e trauma aos pacientes, além de necessidade de profissionais treinados para a administração, enquanto a por via oral é não invasiva, indolor e de fácil aplicação (GONÇALVES et al., 2018; TYAGI; PECHENOV; ANAND SUBRAMONY, 2018).

Dentre as proteínas de maior desafio, a insulina é frequentemente utilizada como exemplo de proteína alvo de estudos de biodisponibilidade. Geralmente, é administrada por via subcutânea em pacientes com diabetes, atingindo níveis de biodisponibilidade de somente 0,5%. Estima-se que formulações orais carregadas de proteína atinjam níveis de biodisponibilidade acima de 5-10% de modo que a proteína, ainda em associação com a formulação ou não, possa ser transportado no momento certo para o local certo para uma atividade biológica sistêmica eficiente (RAMESAN; SHARMA, 2014; AGUIRRE et al., 2016).

A administração oral de proteínas ou peptídeos é considerada um grande desafio da administração de medicamentos. Dessa forma, centenas de sistemas de administração de medicamentos são propostos para proteger essas grandes moléculas no trato gastrointestinal e melhorar sua absorção (AGUIRRE et al., 2016; MALHAIRE et al., 2016).

O trato gastrointestinal (GI) é responsável pelo processo de digestão dos alimentos e, também, a principal barreira entre o organismo e os possíveis patógenos. O GI é composto por várias seções que diferem em composições químicas e enzimáticas, bem como em pH e funções no processo de digestão. Apesar da digestão de proteínas e peptídeos iniciar na mastigação juntamente às enzimas salivares, os principais danos são causados no ambiente ácido do estômago e continuam no intestino delgado (KESHAV, 2009; PAWAR et al., 2014).

Para o desenvolvimento de sistemas protetores eficazes, é necessário considerar três barreiras. A primeira, a barreira química constituída por secreções digestivas, moléculas imunológicas, produtos celulares como citocinas, mediadores inflamatórios e peptídeos antimicrobianos. A segunda, formada pela camada de muco e a viscosidade do quimo ou dos fluidos digestivos que funcionam como barreira física. Finalmente, a barreira biológica que envolve mecanismos biológicos complexos e regulados sensivelmente para atravessar o epitélio do intestino e endotélio vascular (KESHAV, 2009; ENSIGN; CONE; HANES, 2012; RENUKUNTLA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2018).

Apesar dos desafios, é interessante atingir o intestino delgado, pois representa uma seção de absorção de 200m² coberto por uma fina camada de muco pouco aderente (PAWAR et al., 2014; CARLSON, 2019).

3.5 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

A utilização de planejamento de experimentos é empregada em diversos campos do conhecimento e com diferentes aplicações, como: projetos de engenharia, melhoria da qualidade, pesquisa industrial e fabril, pesquisa básica em química, biologia, gestão de negócios e pesquisa de marketing dentre outras (MONTGOMERY, 2013; HASHIBA et al., 2020; KRAUS et al., 2020).

O primeiro cientista a aplicar e desenvolver os métodos de planejamento de experimentos foi Ronald Aylmer Fisher o qual apresentou ideias para planejamento e análise de experimentos que têm sido usados como base para inferências e previsões válidas em vários campos de aplicação até hoje. Na época de seus estudos, Fisher enfrentou vários desafios pois havia grande variação em experimentos agrícolas e biológicos que muitas vezes confundiam os resultados, além do fato de que os experimentos eram demorados e caros de realizar, isso o motivou a desenvolver técnicas experimentais que poderiam (LAWSON, 2014):

- Eliminar o máximo possível da variação natural;
- Evitar que variações não removidas confundissem ou enviesassem os efeitos testados;
- Detectar a causa e efeito com a quantidade mínima de esforço experimental necessário.

O planejamento de experimentos visa fornecer um plano para coletar dados de uma forma que eles podem ser analisados estatisticamente de forma a facilitar a interpretação e correlação ou não dos dados coletados. Esta é uma abordagem organizada que ajuda a evitar partidas falsas e incompletas respostas a perguntas de pesquisa (MONTGOMERY, 2013; LAWSON, 2014).

3.5.1 Design de Misturas

Muitos produtos, como misturas de fibras têxteis, massas, tintas, polímeros e cerâmicas são feitas misturando ou combinando dois ou mais componentes ou ingredientes juntos. As características de um produto que é composto de uma mistura de componentes é geralmente uma função da proporção de cada componente na mistura e não a quantidade total presente (BOX; DRAPER, 2007; NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2010).

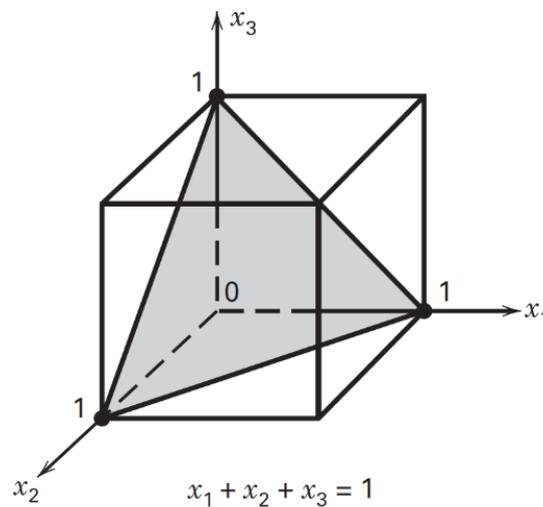
Segundo NETO et. al. (2010) a proporção do i -ésimo componente for x_i , e houver k componentes em uma mistura, então as proporções devem satisfazer as restrições:

$$0,0 \leq x_i \leq 1,0, \text{ para cada componente e } \sum_{i=1}^k x_i = 1,0$$

Portanto, numa mistura de três componentes a variação e soma das variáveis sempre é 1,0, por exemplo, $0,0 \leq x_1 \leq 1,0$, $0,0 \leq x_2 \leq 1,0$, $0,0 \leq x_3 \leq 1,0$ sendo $x_1 + x_2 + x_3 = 1,0$.

Quando se aplica a restrição $x_1 + x_2 + x_3 = 1,0$, reduz-se a região experimental tridimensional a um plano triangular equilátero sombreado bidimensional (DOUGLASC, 2009), conforme apresentado na Figura 14.

Figura 14: Plano triangular equilátero de experimentos.



Fonte: MONTGOMERY, 2013.

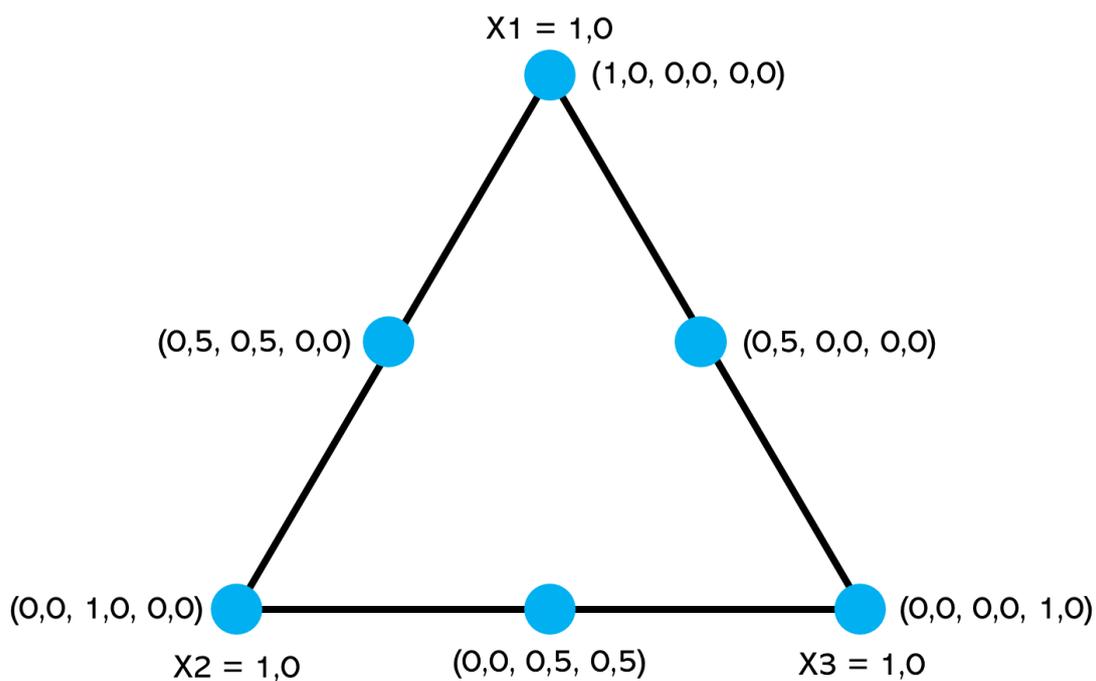
O *design simplex* é empregado no estudo dos efeitos dos componentes da mistura na variável de resposta. Um projeto de rede *simplex lattice* $\{p, m\}$ para componentes p consiste em pontos definidos pelas seguintes configurações de coordenadas: as proporções assumidas por cada componente tomam os valores $m + 1$ igualmente espaçados de 0,0 a 1,0, e todas as combinação(misturas) possíveis das proporções, conforme Equação 1 (MONTGOMERY, 2013).

Equação 1:

$$x_i = 0, \frac{1}{m}, \frac{2}{m}, \dots, 1 \text{ com } i = 1, 2, \dots, p$$

A Figura 15 apresenta os pontos dos experimentos para o *design simplex lattice*.

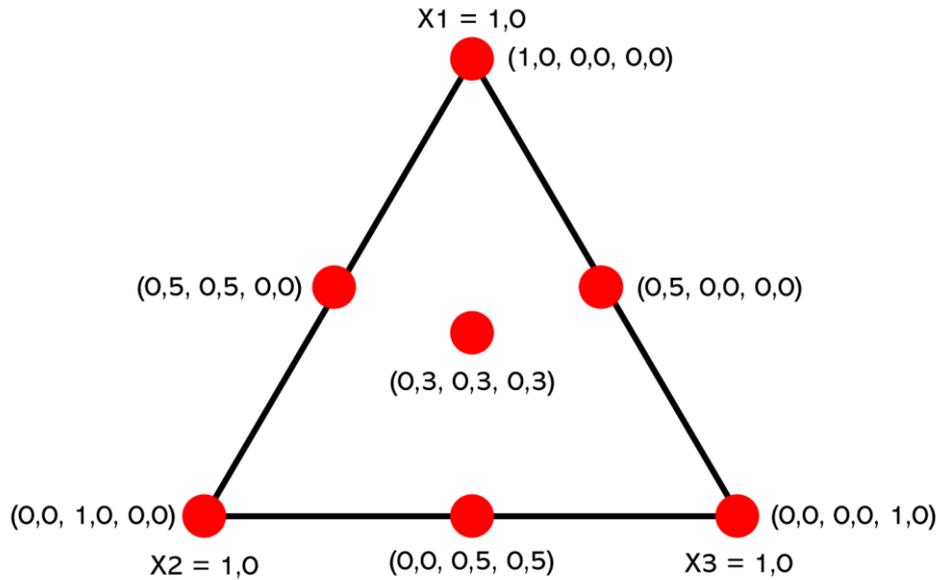
Figura 15: Pontos de experimentos do *design simplex lattice*.



Fonte: Adaptado de LAWSON, 2014.

A forma alternativa de se avaliar um sistema de mistura é a aplicação do modelo *simplex centroid* o qual difere do modelo *simplex lattice* pela adição de um ponto central que combina a composição dos três componentes ((MONTGOMERY, 2013); LAWSON, 2014), conforme disposto na Figura 16.

Figura 16: Pontos de experimentos do *design simplex centroid*.



Fonte: Adaptado de LAWSON, 2014.

Devido às restrições, os modelos de mistura diferem dos polinômios usuais empregados em planejamentos de superfície de resposta. Dessa forma, as formas padrão dos modelos de mistura que estão em uso generalizado são dispostas nas Equação 2, 3, 4 e 5.

Equação 2, modelo linear:

$$E(y) = \sum_{i=1}^p \beta_i x_i$$

Equação 3, modelo quadrático:

$$E(y) = \sum_{i=1}^p \beta_i x_i + \sum_{i<j}^p \beta_{ij} x_i x_j$$

Equação 4, modelo cúbico completo:

$$E(y) = \sum_{i=1}^p \beta_i x_i + \sum_{i<j}^p \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^p \delta_{ij} x_i x_j (x_i - x_j) + \sum_{i<j<k} \beta_{ijk} x_i x_j x_k$$

Equação 5, modelo cúbico especial:

$$E(y) = \sum_{i=1}^p \beta_i x_i + \sum_{i<j}^p \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j<k} \beta_{ijk} x_i x_j x_k$$

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Todas as soluções serão preparadas utilizando água deionizada, com sistema de purificação por destilação seguida de absorção em resina iônica, ambos da marca Marte.

Os reagentes químicos empregados possuíam pureza analítica (PA), enquanto os reagentes empregados nas medições foram da marca Sigma-Aldrich ou de fornecedores comerciais com alta qualidade analítica.

Alginato de Sódio PA (Êxodo Química)

Cloreto de Cálcio PA (Êxodo Química)

Fosfato de Sódio Monobásico PA (Êxodo Química)

Fosfato de Sódio Bibásico PA (Êxodo Química)

Ácido Acético Glacial PA (Êxodo Química)

Bromelina do Caule 2 U.mg⁻¹ (Meteoric Biopharmaceuticals, CAS 37189-34-7)

L-lisina PA(Synth)

L-arginina PA(Synth)

L-histidina PA(Synth)

Pepsina 1:10000 NF (Êxodo Química, CAS 9001-75-6)

Pancreatina 8 NF (Meteoric Biopharmaceuticals, CAS 8049-47-6)

Sais biliares (Meteoric Biopharmaceuticals, CAS 8008-63-7)

Azo-caseína PA (Sigma-Aldrich)

Coomassie Brilliant Blue R-250 PA (Sigma-Aldrich)

Cloreto de Potássio PA (Synth)

Bicarbonato de Sódio PA (Êxodo Química)

Cloreto de Sódio PA (Dinâmica Química)

Cloreto de Magnésio PA (Dinâmica Química)

Bicarbonato de Amônio PA (Êxodo Química)

Ácido Clorídrico PA (Dinâmica Química)

Álcool Isopropílico PA (Êxodo Química)

Brometo de Potássio PA (Sigma-Aldrich)

Ácido Tricloroacético PA (Dinâmica Química)

Hidróxido de Sódio PA (Êxodo Química)

4.2 PRODUÇÃO DOS SISTEMAS

4.2.1 Planejamento dos Experimentos

O software *Statística versão 10.0.228.2*, fora empregado para o planejamento dos experimentos os quais seguiram os parâmetros de máximo e mínimo dispostos no Quadro 5, além de análises dos resultados, confecção de gráficos e testes estatísticos. O planejamento foi aplicado utilizando delineamento experimental de misturas *simplex centroid* com triplicata do ponto central.

Os sistemas foram produzidos utilizando quantidades fixas de alginato e bromelina, uma vez que o objetivo do estudo fora a avaliação dos efeitos da aplicação dos aminoácidos carregados positivamente na interação alginato-bromelina-aminoácidos. Dessa forma, foram empregados os aminoácidos l-lisina, l-arginina e l-histidina na proporção de 1:1 em massa de alginato para aminoácido e de 0,2:0,8 de massa de bromelina para mistura de alginato e aminoácidos.

A combinação das quantidades dos aminoácidos e alginato fora realizada no programa *Statística*, onde l-lis, l-arg e l-hist, correspondem a l-lisina, l-arginina e l-histidina respectivamente e, são dispostas no Quadro 3 que apresenta os valores de variação de massa de aminoácidos empregados nos sistemas.

Quadro 3: Valores de máximo e mínimo aplicados no planejamento dos experimentos.

Código	Ordem de Execução	Bromelina(m/v)	Alginato(m/v)	L-lis(m/v)	L-arg(m/v)	L-his (m/v)
Lis	7(C)	0,500	1,000	1,000	0,000	0,000
Arg	5	0,500	1,000	0,000	1,000	0,000
His	3	0,500	1,000	0,000	0,000	1,000
LA	7(C)	0,500	1,000	0,500	0,500	0,000
LH	2	0,500	1,000	0,500	0,000	0,500
AH	4	0,500	1,000	0,000	0,500	0,500
LAH (C)	1	0,500	1,000	0,333	0,333	0,333
LAH (C)	7(C)	0,500	1,000	0,333	0,333	0,333
LAH (C)	6	0,500	1,000	0,333	0,333	0,333

As sínteses foram realizadas em ordem aleatório e, em dias diferentes, conforme ordem de execução apresentado no Quadro 4. Ainda, foram sintetizados sistemas sem a presença de bromelina, pois foram necessários para a correta medição de taxas de absorvância de base para os ensaios de medição analítica.

4.2.2 Síntese dos sistemas

O preparo das soluções de síntese fora realizado com água destilada e deionizada à temperatura ambiente nas quais o alginato fora hidratado utilizando agitador mecânico da marca Fisatom de modelo 713D à velocidade de $2500 \text{ rpm}\cdot\text{min}^{-1}$ por 1 hora, em seguida, adicionados os aminoácidos e misturados até a completa dissolução, por fim, adicionada a massa de bromelina e misturada com bastão de vidro até completa dissolução.

As microcápsulas foram sintetizadas em spray dryer da marca LabMaa de modelo MSDi 1.0 no qual fora empregado $0,75 \text{ m}^3\cdot\text{min}^{-1}$ de vazão de sopro, 120°C de temperatura de entrada, $0,4 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ de vazão de injeção de solução de síntese, $35 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ de injeção de ar de pulverização e atomizador de 1,2 mm. A Figura 17 mostra a foto o equipamento utilizado nas sínteses.

Figura 17: Equipamento spray dryer utilizado nas sínteses dos sistemas.



Fonte: Própria.

4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CARACTERIZAÇÃO

4.3.1 Teor de Umidade

As medições de teor de umidade dos sistemas formados foram realizadas em balança de medição de umidade com fonte de calor infravermelho da marca Marte de modelo ID50 através da medição gravimétrica de secagem das cápsulas a 105°C até peso constante. Dessa forma, o teor de umidade foi estabelecido de acordo com a equação 6.

Equação 6:

$$\text{Teor de Umidade (\%)} = \left(\frac{\text{Massa inicial} - \text{Massa Final}}{\text{Massa inicial}} \right) * 100$$

Na qual a massa inicial corresponde a massa de micropartículas adicionada à balança e, a massa final a quantidade de massa medida ao final da secagem.

4.3.2 Recuperação de Sólidos

As medições de recuperação de sólidos dos sistemas formados foram realizadas gravimetricamente, em balança analítica da marca Shimadzu de modelo AUW220. Assim, a recuperação de sólidos totais fora calculada de acordo com a Equação 7.

Equação 7:

$$\text{Recuperação de Sólidos (\%)} = \left(\frac{\text{Massa inicial} - \text{Massa Final}}{\text{Massa inicial}} \right) * 100$$

Na qual a massa inicial corresponde a quantidade mássica de alginato, bromelina e aminoácidos utilizadas na produção das soluções dos sistemas e, a massa final a quantidade coletada no frasco receptor do ciclone do spray dryer após a pulverização de toda a solução de síntese dos sistemas.

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das cápsulas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise (LMEA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) no qual foi empregado o microscópio eletrônico de varredura da marca Carl Zeiss, modelo SIGMA equipado com canhão de elétrons de campo (MEV-FEG), onde as amostras foram recobertas com ouro e analisadas por captura de imagens capturadas utilizando canhão de elétrons a 2 kV.

4.3.4 Difratometria de Raios-X (DRX)

As medidas de difração das microcápsulas foram realizadas na Central Analítica do IFAM/CMC do Instituto Federal do Amazonas (IFAM) utilizando o Difrátômetro de Raio-X da marca Shimadzu e modelo XRD-7000, K α Cu, operado em 50kV e 100 mA.

As medidas foram obtidas no modo *stepscanning*, com incremento angular de $0,02^\circ$ em 2θ e 5 segundos/passos, na faixa de 20° a 100° .

4.3.5 Análises de Espectroscopia de Luz Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A determinação das interações eletrostáticas e possíveis interações entre alginato, bromelina e aminoácidos, foram realizadas através de análises no Laboratório ILUM do HUB/UEA em Espectrofotômetro de Luz Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), da marca Shimadzu IR Prestige-21 com software IRsolution versão 1.6 no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} . As varreduras foram aplicadas com modo de varredura em transmitância, de apodização Happ-Genzel, com 64 *scans* e resolução de $1,0\text{ cm}^{-1}$.

4.4 ANÁLISES DE DIGESTIBILIDADE

4.4.1 Dosagem de proteínas

A quantificação de proteínas fora realizada através da aplicação de solução corante Coomassie Brilliant Blue G-250 à concentração de 100 mg.L^{-1} . O método consistiu na adição de 500 uL de solução de Coomassie Brilliant Blue G-250 à 500 uL de amostra em tubo microtubo de 2 mL , com posterior agitação em vórtex por 30 segundos e análise fotométrica a 595 nm em espectrofotômetro de luz ultravioleta e visível UV-Vis da marca Shimadzu. Após o ensaio, o valor de absorvância fora correlacionado através de curva padrão a qual fora obtida utilizando o mesmo procedimento e em base de bromelina padrão na faixa de $0,0$ a $1,0\text{ mg.mL}^{-1}$ (NOBLE, 2014).

4.4.2 Atividade Enzimática

A atividade enzimática fora realizada pelo método de quantificação de digestão de azo-caseína na qual 125 uL de solução de bromelina ou de amostra fora misturada a 125 uL de solução de azo-caseína a $1,0\%(m/v)$ em tubo ependorf de $2,0\text{ mL}$, com agitação em vórtex por 30 segundos e levado a termobloco por 60 minutos a 37°C para a reação proteolítica, após os 60 minutos foram adicionados 750 uL de ácido tricloroacético a $5\%(m/V)$ para a parada da reação e coagulação de proteínas não quebradas, logo após, separadas por centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C , posteriormente, 500 uL do sobrenadante foram adicionados a 500 uL de solução de NaOH a $0,5\text{ mol.L}^{-1}$ e levados para análise fotométrica a 440 nm em espectrofotômetro de luz ultravioleta e visível UV-Vis da marca Shimadzu. A atividade foi determinada pela correlação com curva padrão realizada em espectrofotômetro da marca Shimadzu,

medido pela quantidade de cromóforos resultantes da digestão de azo-caseína em diferentes concentrações, em 60 minutos a 37°C (CÔLHO et al., 2016).

4.4.3 Ensaios de Liberação Controlada

As cápsulas foram avaliadas por liberação controlada em pH 3 e 7 e, também, em solução de simulação de fluido gástrico (SFG) *in vitro*. A solução de pH 3,0 fora preparada utilizando ácido cítrico (C₆H₈O₇) e fosfato de sódio bibásico (Na₂HPO₄), a solução de pH 7,0 fora preparada utilizando fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) e bibásico (Na₂HPO₄) (VOGEL, 1981) e, a solução de simulação de fluido gástrico (SFG) fora preparada de acordo com o Quadro 4.

Quadro 4: Composição da solução de SFG.

Reagente	SFG(1,0X)
KCl(g)	0,2570
KH ₂ PO ₄ (g)	0,0610
NaHCO ₃ (g)	1,0500
NaCl(g)	1,3805
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆ (g)	0,0100
CH ₅ NO ₃ (g)	0,0375
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ (g)	0,0110
HCl(1M)	
Volume Final(mL)	500mL
pH	3,0

Fonte: Adaptado de MINEKUS et, al., 2014.

Para os ensaios de liberação controlada, foram empregados erlenmeyers de 125 mL nos quais 100 mg do sistema correspondente fora adicionado a 10 mL de solução de pH 3,0, 7,0 ou SFG e disposto em incubadora *shaker* com agitação a 150 rpm e temperatura de 37 °C, por 120 min para a SFG tempo necessário para digestão e por 240 min para o pH 3,0 e 7,0, com o intuito de avaliar a estabilidade dos sistemas por tempo superior ao de processos digestivos. Nos primeiros 60 min, uma alíquota de 1 mL fora coletada a cada 15 min, após os 60 min, as alíquotas foram retiradas a cada 30 min, a cada alíquota retirada a quantidade de 1 mL de solução fresca fora adicionada ao mesmo erlenmeyer. Por fim, as alíquotas coletadas foram utilizadas na dosagem de peptídeos de bromelina em 280 nm, utilizando curva padrão previamente realizada (YU et al., 2019; VISENTINI et al., 2020).

4.4.4 Ensaios de Digestão *in vitro*

As cápsulas foram avaliadas pelo processo de digestão *in vitro*, utilizando soluções de simulação de fluido gástrico (SFG) e fluido intestinal (SFI), as soluções foram preparadas a concentração de 1,25 vezes, com adição de solução de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio de acordo com o pH desejado, conforme Quadro 5.

Quadro 5: Composição das soluções de digestão.

Reagente	SFG(1,25X)	SFI(1,25X)
KCl(g)	0,3213	0,3169
KH ₂ PO ₄ (g)	0,0763	0,0681
NaHCO ₃ (g)	1,3125	4,4625
NaCl(g)	1,7256	1,4038
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆ (g)	0,0125	0,0419
CH ₅ NO ₃ (g)	0,0469	0,0000
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ (g)	0,0138	0,0550
HCl(1M)	Variável	-
NaOH(0,1M)	-	Variável
Volume Final(mL)	500mL	500mL
pH	3,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2

Fonte: Adaptado de MINEKUS et al., 2014.

Para a digestão em solução de simulação de fluido gástrico (SFG) foram empregados erlenmeyers de 125 mL nos quais 100 mg do sistema correspondente fora adicionado a 10 mL de solução de fluido gástrico e disposto em incubadora *shaker* com agitação a 150 rpm e temperatura de 37 °C por duas horas, ao final do tempo uma alíquota de 1 mL fora coletada e, após a coleta, 1 mL de solução fresca de SFG fora adicionado ao mesmo erlenmeyer. Após a digestão em fluido gástrico, o pH da solução restante fora ajustado para 7,0 utilizando solução de NaOH a 0,1 mol.L⁻¹, após ajuste, os sistemas foram mantidos sob as mesmas condições de agitação, temperatura e tempo utilizadas na digestão gástrica, ao final das duas horas, uma alíquota de 1 mL fora coletada. Por fim, as alíquotas coletadas foram utilizadas na dosagem de proteínas e quantificação de atividade enzimática (MINEKUS et al., 2014; VISENTINI et al., 2020).

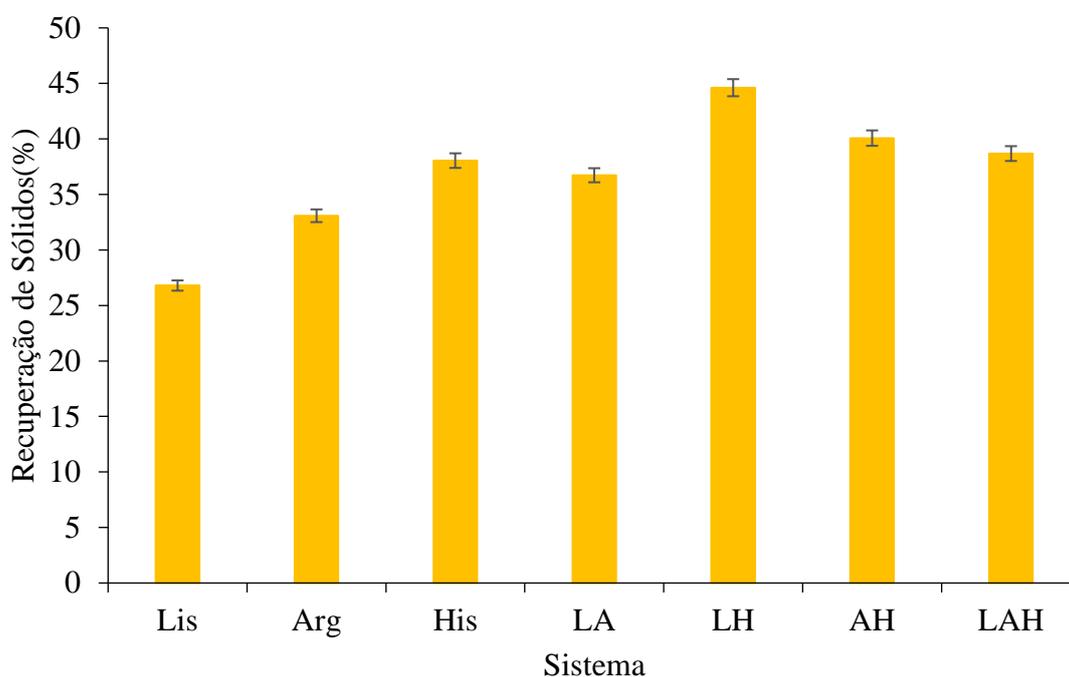
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARÂMETROS FÍSICOS DE SECAGEM POR SPRAY DRYER

5.1.1 Recuperação de Sólidos

Os resultados obtidos para as taxas de recuperação de sólidos totais são demonstrados na Figura 18. A maior recuperação se deu pelo sistema 5 da combinação entre l-lisina e l-histidina na proporção de 0,5:0,5% (m/v) o qual resultou em 44,6% de recuperação de sólidos totais.

Figura 18: Proporção de massa de sólidos recuperada nos sistemas estudados.



Após as análises os resultados foram tratados em software *Statística versão 10.0* para avaliação dos modelos e significância estatística entre os efeitos. As Tabelas 2 e 3 apresentam os valores dos efeitos, erros e significância estatística para os modelos empregados.

Tabela 2: Valores dos efeitos e erros da Soma Quadrática, Graus de Liberdade e Média Quadrática para os modelos avaliados.

Modelo	Efeito Soma Quadrática	Efeito Graus de Liberdade	Efeito Média Quadrática	Erro Soma Quadrática	Erro Graus de Liberdade	Erro Média Quadrática
Linear	70,0398	2	35,0199	127,6187	6	21,2698
Quadrático	105,8272	3	35,2757	21,7916	3	7,2639
Cúbico Especial	20,1253	1	20,1253	1,6663	2	0,8331
Total Ajustado	197,6586	8	24,7073			

Tabela 3: Valores de significância estatística p e regressão para os modelos calculados.

Modelo	F	p	R ²	R ² Ajustado
Linear	1,6465	0,2692	0,3543	0,1391
Quadrático	4,8563	0,1135	0,8898	0,7060
Cúbico Especial	24,1563	0,0390	0,9916	0,9663

Através das Tabelas 2 e 3 é possível verificar que o modelo Cúbico Especial apresenta os menores valores de erro para a Soma Quadrática e Média Quadrática, além disso, é o único modelo que apresenta significância estatística com valor de $p = 0,039$.

O modelo cúbico especial apresenta valor de regressão (R^2) superior a 0,99 o que indica que para as variáveis estudadas os fatores possuem intercorrelação e seu comportamento é melhor descrito por este modelo.

A Tabela 4 apresenta as estimativas dos efeitos significativos ($p < 0,05$) dentro do modelo cúbico especial para a recuperação de sólidos totais (%).

Tabela 4: Sumário dos efeitos para a recuperação de sólidos (%).

Fator	Coefficientes Estimados	t-valor	p-valor	Intervalo de Confiança -95%	Intervalo de Confiança +95%
(A)L-lisina (%)	26,792	29,3532	0,00116	22,865	30,7197
(B)L-arginina (%)	33,078	36,2396	0,00076	29,151	37,0053
(C)L-histidina (%)	38,046	41,6824	0,00058	34,119	41,9733
AB	27,163	6,07462	0,02605	7,924	46,4029
AC	48,778	10,9083	0,0083	29,538	68,0173
BC	18,043	4,03508	0,05628	-1,196	37,2829
ABC	-118,861	-4,91491	0,03899	-222,916	-14,8067

A partir da Tabela 4 é possível obter a equação que descreve o processo de recuperação de sólidos (%) para os sistemas estudados, conforme Equação 8.

Equação 8:

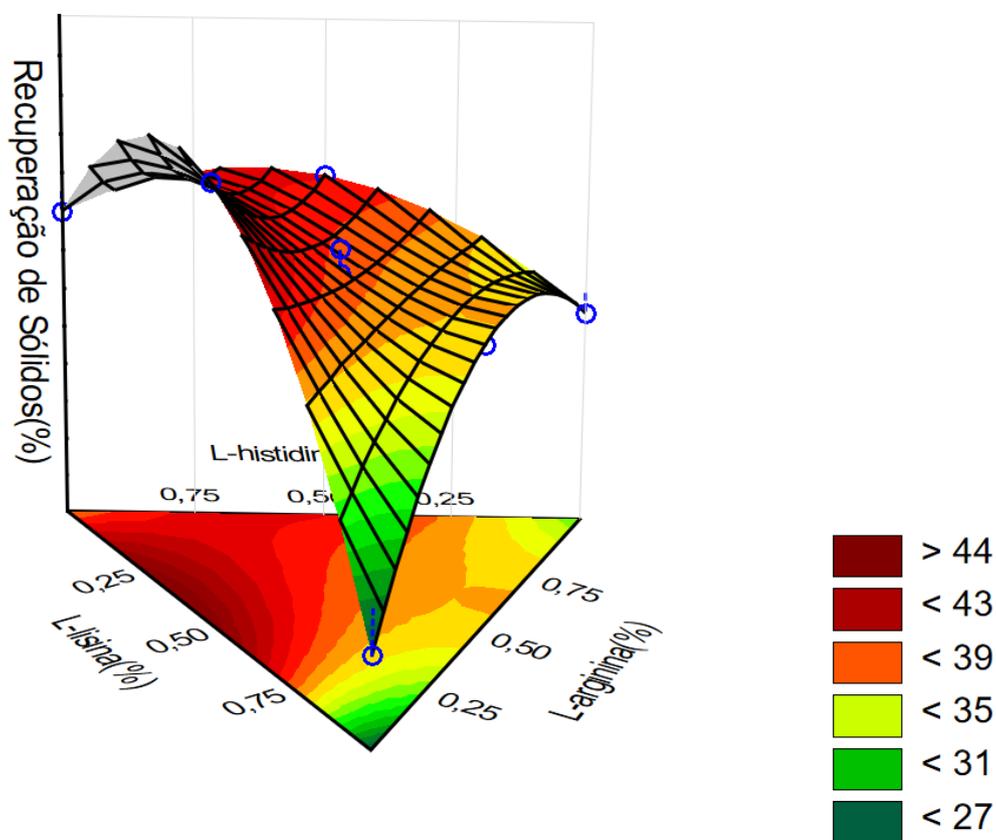
$$\text{Recuperação de Sólidos(\%)} = 26,792*(A) + 33,078*(B) + 38,046*(C) + 27,163*(A)*(B) + 48,778*(A)*(C) + 18,043*(B)*(C) - 118,861*(A)*(B)*(C)$$

O sumário dos efeitos evidencia que todos os aminoácidos empregados influenciam de maneira positiva na recuperação de sólidos os quais apresentam valores estatísticos muito baixos ($p < 0,005$). No entanto, ao se avaliar as combinações entre os aminoácidos é possível observar efeitos de interação menos significativos estatisticamente

se comparado aos efeitos dos aminoácidos individuais, além disso, quando combinados, os aminoácidos apresentam efeito negativo na recuperação de sólidos.

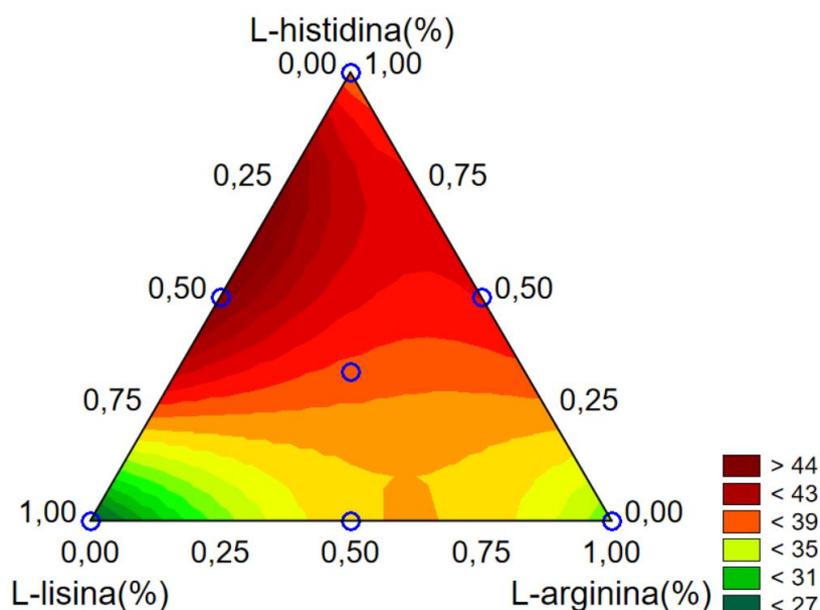
A Figura 19 apresenta a superfície de resposta para os sistemas estudados, é possível verificar que não se apresentam regiões de otimização de resposta, contudo a região de combinação entre l-lisina e l-histidina apresenta região de máximo na proporção entre 0,35% de l-lisina para 0,65% de l-histidina e, para o sistema contendo 1,0% de l-lisina a região de mínimo.

Figura 19: Superfície de resposta para a recuperação de sólidos (%).



A curva de nível na Figura 20 apresenta de maneira mais clara o comportamento das respostas onde é possível verificar que os sistemas apresentam maiores valores para as combinações com l-histidina, enquanto combinações entre l-lisina tendem a apresentar menores valores na recuperação de sólidos. Ainda, quando os aminoácidos são utilizados sem combinação, a quantidade de sólidos recuperada é inferior quando em combinação com outro aminoácido.

Figura 20: Curva de nível para a Recuperação de Sólidos (%).



Ao se observar a Figura 20, é possível compreender que excetuando-se a combinação entre os 3 aminoácidos, todos os efeitos possuem valor positivo na recuperação de sólidos (%), sendo a l-histidina o fator de maior efeito, enquanto que combinação entre os três aminoácidos influenciou negativamente.

Ainda, os valores de efeitos combinados mostram que a l-lisina quando combinada tende a influenciar positivamente na quantidade de massa recuperada, no entanto, quando combinada com os demais aminoácidos apresenta efeito negativo na recuperação de sólidos.

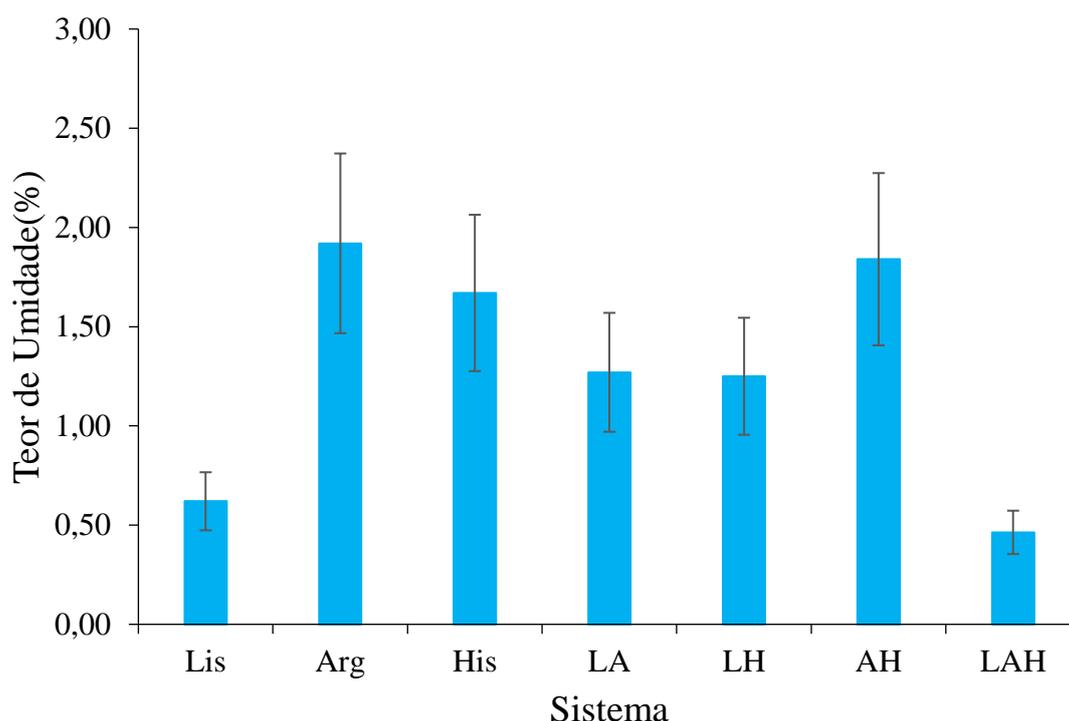
Os efeitos de combinação podem ser associados a uma maior estereocomplexação da rede de alginato à bromelina as quais são resultado da combinação das cargas e conformação das estruturas que ao serem pulverizadas na câmara de secagem, tendem a apresentar maior aderência entre partículas, o que gera maior adesão nas paredes da câmara de secagem maiores taxas de perda de massa para a câmara de secagem (SEVILLE et al., 2007).

Outro fator muito importante ao se ter em conta no rendimento de secagem, é a viscosidade da solução a ser pulverizada, a qual pode ter influência através das interações entre proteína-proteína e proteína-aminoácido. Alguns estudos revelam que tanto a l-lisina quanto l-arginina podem interagir de forma a condicionar as proteínas a gerar menores quantidades de agregação através da diminuição entre interações proteína-proteína (INOUE et al., 2014; MIYATAKE et al., 2016).

5.1.2 Teor de Umidade

Os resultados obtidos para teor de umidade (%) são demonstrados na Figura 21, todos os sistemas apresentaram teor de umidade menor que 2,0%, quantidades muito inferiores aos encontrados em literatura (AMERI; MAA, 2006) que varia entre 4 a 10%. O maior teor de umidade fora para o sistema Arg, com l-arginina na proporção de 1,0%, o qual apresentou 1,8% enquanto que o menor teor de umidade fora o das combinações entre os três aminoácidos com 0,5%.

Figura 21: Proporção de teor de umidade nos sistemas estudados.



Após as análises os resultados foram tratados em software *Statística versão 10.0* para avaliação dos modelos e significância estatística entre os efeitos. As Tabelas 5 e 6 apresentam os valores dos efeitos, erros e significância estatística para os modelos empregados.

Tabela 5: Valores dos efeitos e erros da Soma Quadrática, Graus de Liberdade e Média Quadrática para os modelos avaliados.

Modelo	Efeito Soma Quadrática	Efeito Graus de Liberdade	Efeito Média Quadrática	Erro Soma Quadrática	Erro Graus de Liberdade	Erro Média Quadrática
Linear	1,171693	2	0,585847	1,922907	6	0,320484
Quadrático	0,818286	3	0,272762	1,104621	3	0,368207
Cúbico Especial	1,052354	1	1,052354	0,052267	2	0,026133
Total Ajustado	3,0946	8	0,386825			

Tabela 6: Valores de significância estatística p e regressão para os modelos calculados.

Modelo	F	p	R ²	R ² Ajustado
Linear	1,828	0,239917	0,378625	0,1715
Quadrático	0,74078	0,594446	0,643049	0,048131
Cúbico Especial	40,26864	0,023945	0,98311	0,932441

Através das Tabelas 5 e 6 é possível verificar que apenas o modelo Cúbico Especial apresenta os menores valores de erro para a Soma Quadrática e Média Quadrática, além disso, é o único modelo que apresenta significância estatística com valor de $p = 0,023945$.

O modelo cúbico especial apresenta um valor de regressão (R^2) igual a 0,9831 o que indica que para as variáveis estudadas os fatores possuem intercorrelação e seu comportamento é melhor descrito por este modelo.

A Tabela 7 apresenta as estimativas dos efeitos significativos ($p < 0,05$) dentro do modelo de misturas cúbico especial para o teor de umidade (%).

Tabela 7: Sumário dos efeitos para o teor de umidade (%).

Fator	Coefficiente	Erro Padrão	t-valor	p-valor	Intervalo de Confiança -95%	Intervalo de Confiança +95%
(A)L-lisina (%)	0,62	0,16166	3,83526	0,06175	-0,0756	1,31556
(B)L-arginina (%)	1,92	0,16166	11,8769	0,00702	1,2244	2,61556
(C)L-histidina (%)	1,67	0,16166	10,3305	0,00924	0,9744	2,36556
AB	0,00	0,79196	0,0000	1,00000	-3,4075	3,40753
AC	0,42	0,79196	0,53033	0,64888	-2,9875	3,82753
BC	0,18	0,79196	0,22728	0,84132	-3,2275	3,58753
ABC	-27,18	4,28318	-6,34576	0,02395	-45,609	-8,75098

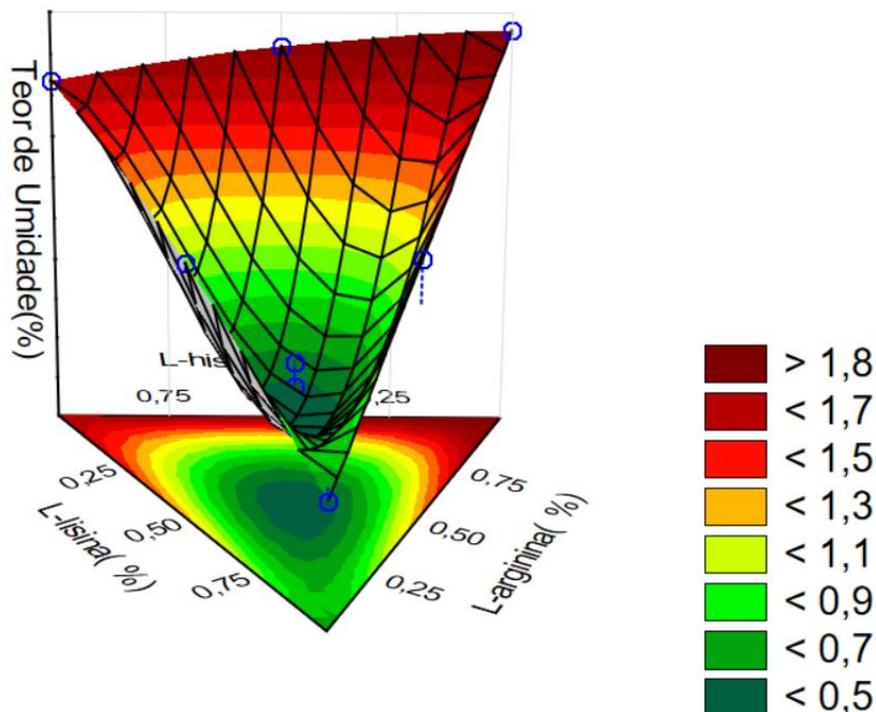
A partir da Tabela 7 é possível obter a equação que descreve o teor de umidade (%) para os sistemas estudados, conforme Equação 9.

Equação 9:

$$\text{Teor de umidade}(\%) = 0,62*(A) + 1,92*(B) + 1,67*(C) + 0,0*(A)*(B) + 0,42*(A)*(C) + 0,18*(B)*(C) - 27,18*(A)*(B)*(C)$$

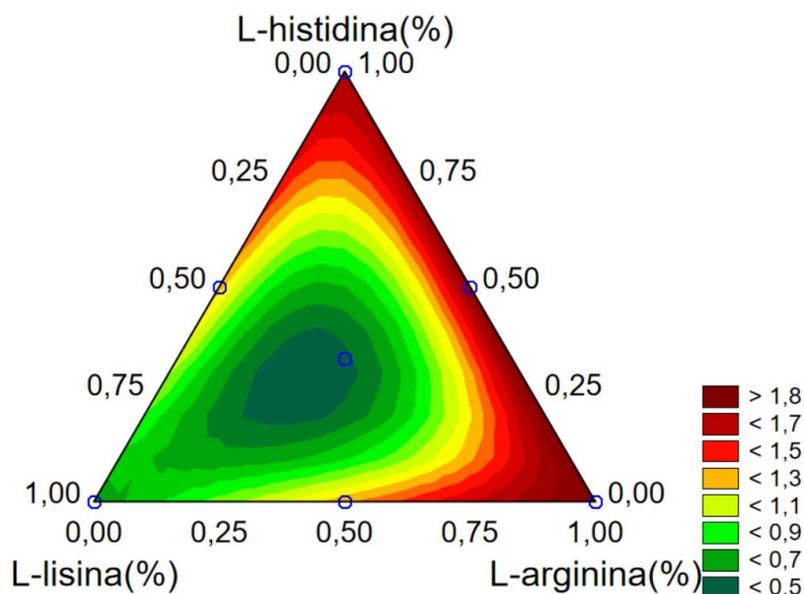
A Figura 22 apresenta a superfície de resposta para os sistemas estudados na qual é possível verificar que há uma região de otimização da resposta, sendo a região de combinação dos três aminoácidos testados, isto é, o ponto central.

Figura 22: Superfície de resposta para o teor de umidade (%).



A curva de nível na Figura 23 apresenta de maneira mais clara o comportamento das respostas onde é possível verificar que a combinação dos aminoácidos, no ponto central, gerou menor teor de umidade.

Figura 23: Curva de nível para o teor de umidade (%).



Ao se observar a Figura 23, é possível observar que a l-histidina e a l-arginina apresentaram efeitos positivos no teor de umidade e tem influência significativa no teor de umidade (%) dos sistemas, enquanto que a combinação entre os aminoácidos gerou efeito negativo.

A literatura não apresenta muitos dados de efeitos de combinação de alginato e aminoácidos ao teor de umidade de sistemas microencapsulados, no entanto, alguns estudos demonstram que a utilização de aminoácidos na redução de processos de agregação entre partículas e recristalização induzidos pelo aumento de umidade. YU et al., (2017) verificaram que a adição dos aminoácidos isoleucina, valina e metionina geraram sistemas estáveis ao armazenamento em sistemas com 60% e 70% de umidade para fármacos de inalação. MAH et al., (2019) verificaram efeito similar no uso de l-leucina e l-isoleucina para estabilização de carreador trealose em sistemas com 50% de umidade. Portanto o uso de aminoácidos na formação de sistemas microencapsulados apresenta grande vantagem contra processos de recristalização induzidos por umidade.

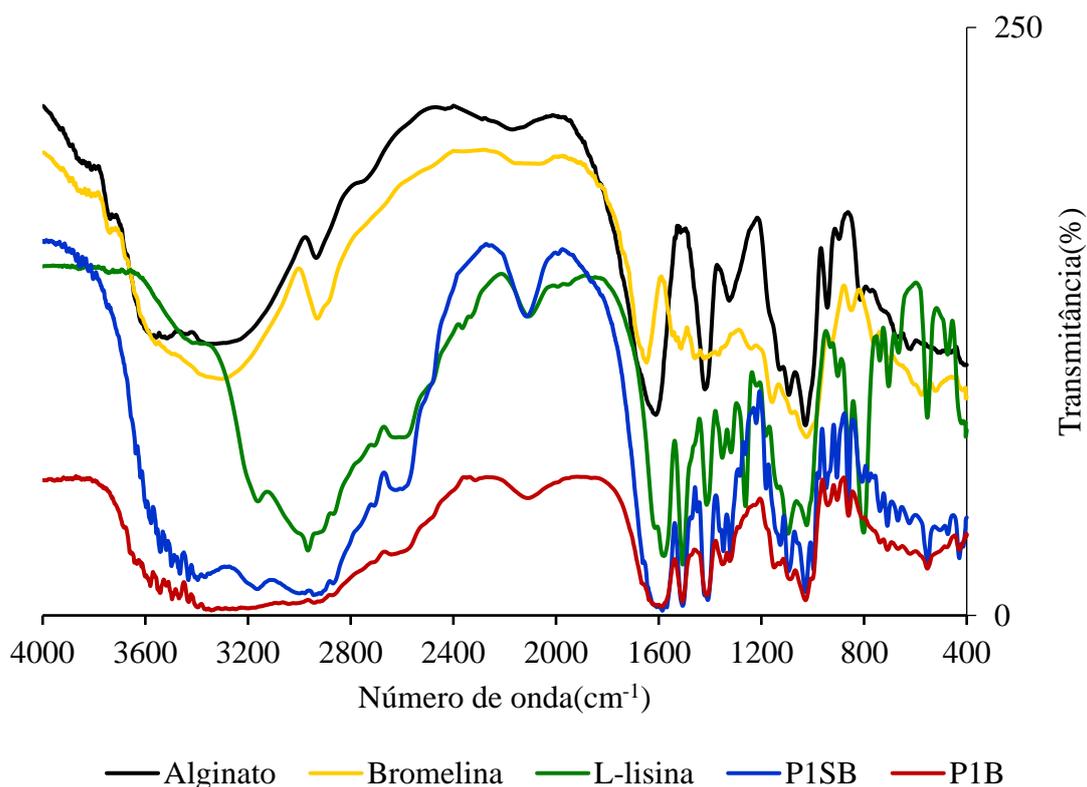
5.2 ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO

5.2.1 Análises de FTIR

As análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas de 4000 a 400 cm^{-1} nas quais é possível observar a combinação das substâncias e dos grupos funcionais para cada sistema sintetizado. Todos os sistemas apresentaram bandas de combinação acentuadas, no entanto, as bandas de transmissão isoladas da bromelina não se apresentaram em nenhum espectro o que indica uma possível supressão de sinal devido ao encapsulamento nos sistemas formados.

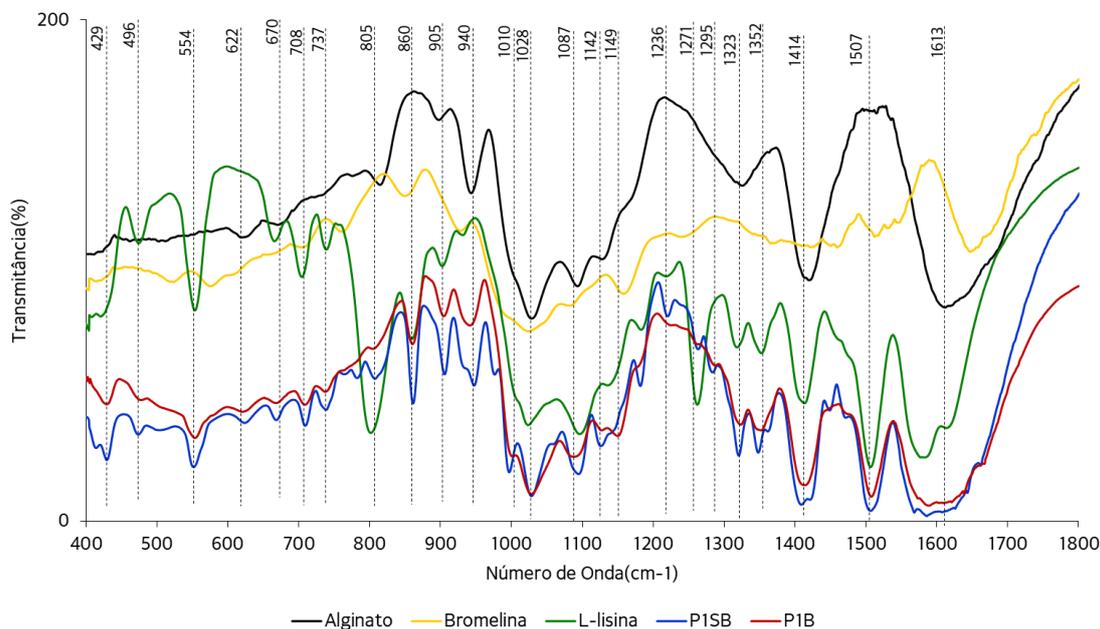
A Figura 24 apresenta o espectro de transmitância para o sistema Lis, o qual é formado por alginato, bromelina e l-lisina.

Figura 24: Espectro de transmissão do sistema Lis, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina e combinação com (P1B) e sem bromelina (P1SB).



A Figura 25 apresenta a região de 400 a 1800 cm^{-1} que compreende a região de menor número de onda até a região de *fingerprint* para os sistemas analisados os quais facilitam a visualização das contribuições específicas de cada substância ao sistema analisado.

Figura 25: Região de *fingerprint* do sistema Lis, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina e combinação com e sem bromelina.



Ao se avaliar os gráficos de transmissância dos padrões e do sistema sem bromelina, é possível verificar que o sistema tende a revestir a bromelina e o aminoácido, uma vez que embora o espectro resultante apresente diversos picos correspondentes a l-lisina, há também, picos de sobreposição entre alginato e l-lisina. Ainda, os picos se apresentam em baixa intensidade e suprimidos pelos sinais de base advindos da combinação com alginato.

Embora o alginato apresente diversas bandas de absorção com picos não muito bem definidos, é possível notar um pico na região de 1323 cm^{-1} o qual se apresenta no sistema sem bromelina e, posteriormente, no sistema com bromelina. A vibração correspondente indica uma vibração de C-H da cadeia de alceno a qual pode ser resultado da interação entre l-lisina e alginato (LOPES; FASCIO, 2004; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2005). O alginato tende a apresentar regiões polarizadas negativamente, enquanto que a l-lisina, por ser um aminoácido carregado positivamente, apresenta carga positiva em sua terminação amina.

O Quadro 6 apresenta os números de onda de transmissão bem como do tipo de vibração e a contribuição correspondente (LOPES; FASCIO, 2004; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2005).

Quadro 6: Números de onda de transmissão e contribuição correspondente ao sistema Lis.

Número de onda (cm ⁻¹)	Vibração	Contribuição
3250	O-H	Combinação, Alginato, Bromelina, L-lisina
3010	O-H, N-H	Combinação, Alginato, Bromelina, L-lisina
2724	N-H	L-lisina
2643	N-H	L-lisina
2116	N-H	L-lisina
1613	C=O	Combinação, Alginato, Bromelina, L-lisina
1589	C-N	L-lisina
1507	C-H	Combinação, Alginato e L-lisina
1414	C-H	L-lisina
1352	C-H	L-lisina
1323	C-O, C-H	Interação Alginato-L-lisina
1295	C-H	L-lisina
1271	C-H, C-N	L-lisina
1236	C-H, C-N	L-lisina
1149	C-N	L-lisina
1142	C-C, C-O, C-N	Combinação, Alginato, L-lisina
1087	C-C, C-O, C-N	Combinação, Alginato, L-lisina
1028	C-C, C-O, C-N	Combinação, Alginato, L-lisina
1010	C-C, C-O	Combinação, Alginato, L-lisina
940	C-C, C-O	Combinação, Alginato, L-lisina
905	C-C, C-O	Combinação, Alginato, L-lisina
860	C-C, C-O	L-lisina
805	C-C, C-O	L-lisina
737	N-H	L-lisina
708	N-H	L-lisina
670	C-H	L-lisina
622	C-H	Alginato
554	N-H	L-lisina
496	N-H	L-lisina
429	N-H	L-lisina

A Figura 26 e Figura 27 apresentam o espectro de transmitância para o sistema 2, sendo que a Figura 26 apresenta o espectro completo e, a Figura 27 apenas a região de *fingerprint* para os sistemas analisados os quais facilitam a visualização das contribuições específicas de cada substância ao sistema analisado.

Figura 26: Espectro de transmissão do sistema Arg, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-arginina e combinação com (P2B) e sem bromelina (P2SB).

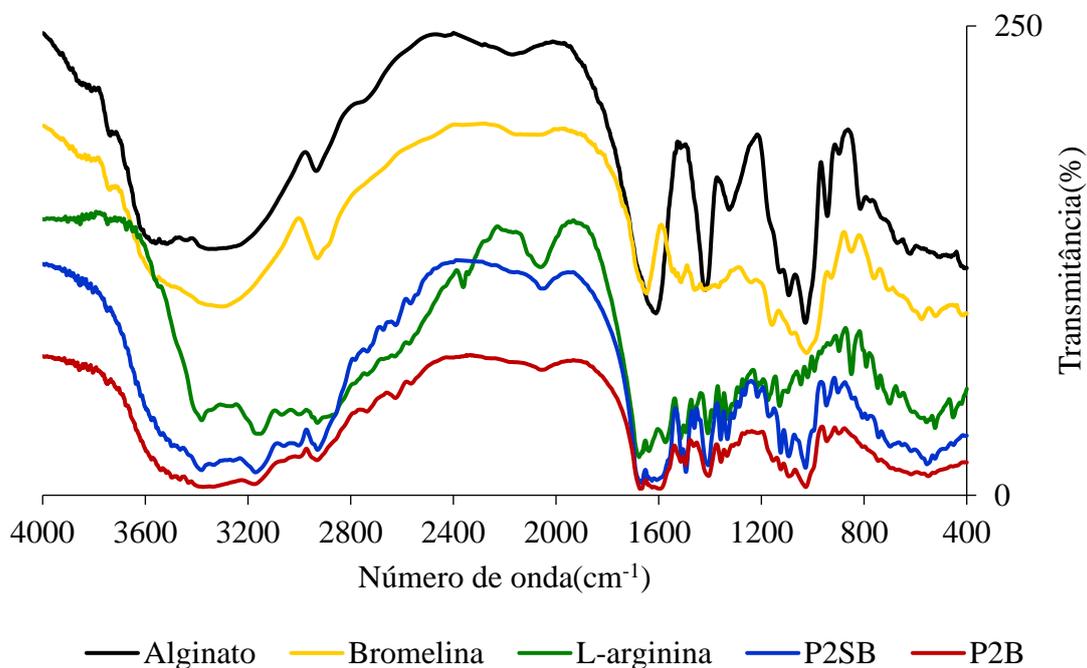
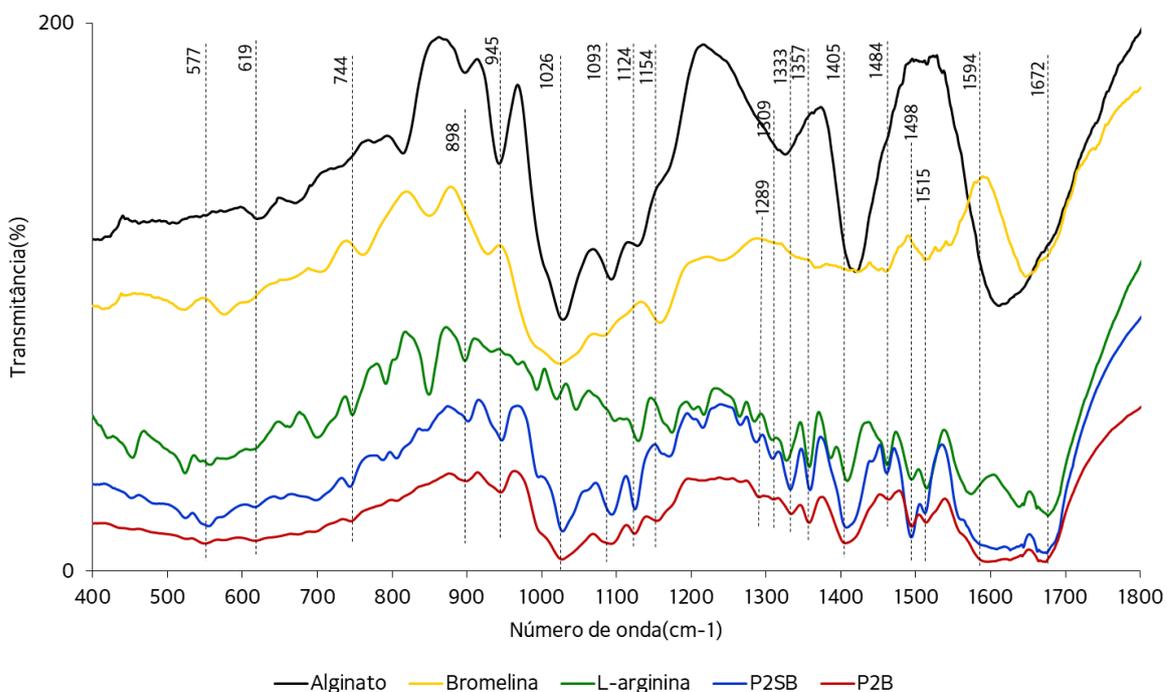


Figura 27: Região de *finger print* do sistema Arg, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina e combinação com e sem bromelina.



O Quadro 7 apresenta os números de onda de transmissão bem como do tipo de vibração e a contribuição correspondente (LOPES; FASCIO, 2004; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2005).

Quadro 7: Números de onda de transmissão e contribuição correspondente ao sistema Arg.

Número de onda (cm ⁻¹)	Vibração	Contribuição
3374	N-H	L-arginina
3178	N-H	L-arginina
2935	C-H, N-H	Combinação Alginato, Bromelina, L-arginina
2737	N-H	L-arginina
2627	N-H	L-arginina
2565	N-H	L-arginina
2061	N-H	L-arginina
1672	N-H	L-arginina
1594	C=O, N-H	Combinação Alginato e L-arginina
1515	N-H	L-arginina
1498	N-H	L-arginina
1484	N-H	L-arginina
1405	C-H, N-H	Combinação Alginato e L-arginina
1357	N-H	L-arginina
1333	N-H	L-arginina
1309	N-H	L-arginina
1289	N-H	L-arginina
1154	N-H	Combinação Bromelina e L-arginina
1124	C-O, C-C, N-H	Combinação Alginato e L-arginina
1093	C-O, C-C, N-H	Combinação Alginato e L-arginina
1026	C-O, C-C, N-H	Combinação Alginato e L-arginina
945	C-O, C-C, N-H	Combinação Alginato e L-arginina
898	C-O, C-C, N-H	Combinação Alginato e L-arginina
744	C-H, N-H	Combinação Alginato e L-arginina
619	C-H, N-H	Combinação Alginato e L-arginina
577	C-H, N-H	Combinação Alginato e L-arginina

Ao se avaliar os gráficos de transmitância dos padrões e do sistema sem bromelina, é possível verificar que o alginato tende a revestir a bromelina e o aminoácido, uma vez que embora o espectro resultante apresente diversos picos correspondentes a l-arginina, há também, picos de sobreposição entre alginato e l-arginina. Ainda, os picos se apresentam em baixa intensidade e suprimidos pelos sinais de base advindos da combinação com alginato.

A Figura 28 e Figura 29 apresentam o espectro de transmitância para o sistema His, sendo que a Figura 28 apresenta o espectro completo e, a Figura 29 apenas a região de *fingerprint* para os sistemas analisados.

Figura 28: Espectro de transmissão do sistema His, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-histidina e combinação com(P3B) e sem bromelina(P3SB).

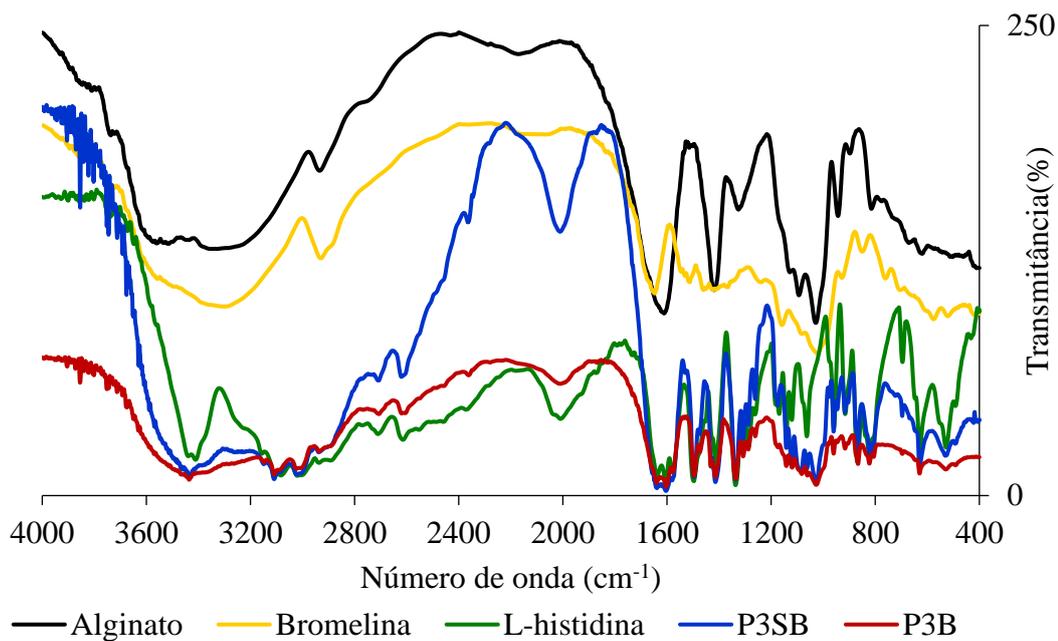
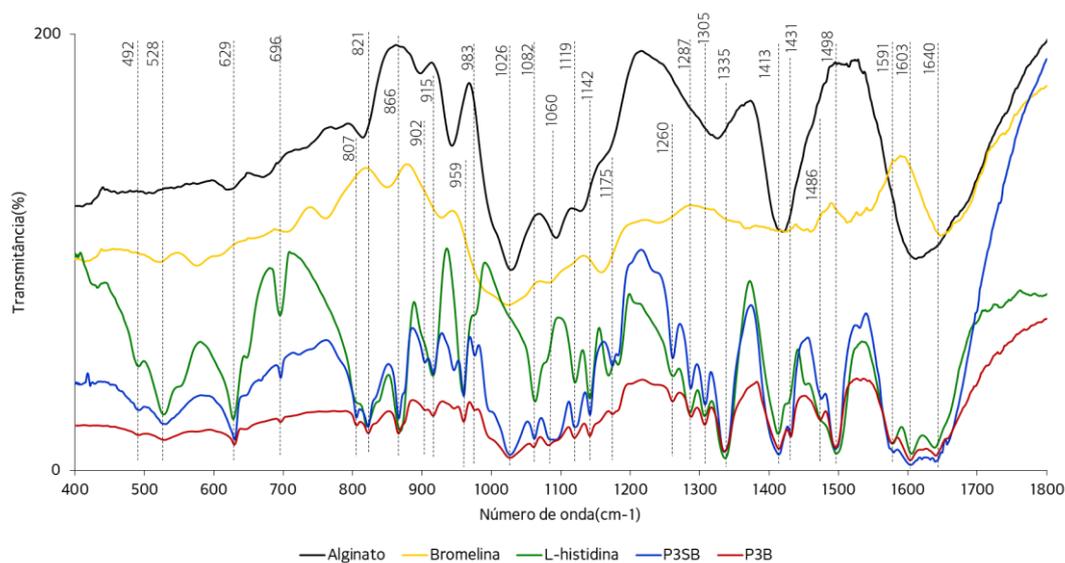


Figura 29: Região de *fingerprint* do sistema His, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-histidina e combinação com e sem bromelina.



O Quadro 8 apresenta os números de onda de transmissão bem como do tipo de vibração e a contribuição correspondente (LOPES; FASCIO, 2004; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2005).

Quadro 8: Números de onda de transmissão e contribuição correspondente ao sistema His.

Números de onda (cm ⁻¹)	Vibração	Contribuição
3436	N-H	L-histidina
3147	N-H	L-histidina
3110	N-H	L-histidina
3101	N-H	L-histidina
3022	N-H	L-histidina
2937	C-H, N-H	Combinação Alginato, Bromelina, L-histidina
2708	N-H	L-histidina
2617	N-H	L-histidina
2362	N-H	L-histidina
2011	N-H	L-histidina
1498	N-H	L-histidina
1486	N-H	L-histidina
1431	N-H	L-histidina
1413	N-H	L-histidina
1335	N-H, Alongamento de Anel	L-histidina
1287	N-H	L-histidina
1260	N-H	L-histidina
1175	C=O, C-N	Combinação Alginato e L-histidina
1142	C-N	L-histidina
1119	C-N	L-histidina
1082	C-N	Combinação Bromelina e L-histidina
1060	C-N	L-histidina
1026	C-O, C-C	Alginato
983	N-H	L-histidina
959	N-H	L-histidina
915	N-H	L-histidina
902	C-O, C-C	Alginato
866	N-H	L-histidina
821	N-H	L-histidina
807	N-H	L-histidina
696	N-H, Alongamento de Anel	L-histidina
629	N-H	L-histidina
528	N-H	L-histidina
492	N-H	L-histidina

Ao se avaliar os gráficos de transmitância dos padrões e do sistema sem bromelina, é possível verificar que o sistema tende a revestir a bromelina e o aminoácido, uma vez que embora o espectro resultante apresente diversos picos correspondentes a l-histidina, há também, picos de sobreposição entre alginato e l-histidina. Ainda, os picos se apresentam em baixa intensidade e suprimidos pelos sinais de base advindos da combinação com alginato.

A Figura 30 e Figura 31 apresentam o espectro de transmitância para o sistema LA, sendo que a Figura 30 apresenta o espectro completo e, a Figura 31 apenas a região de *fingerprint* para os sistemas analisados os quais facilitam a visualização das contribuições específicas de cada substância ao sistema analisado.

Figura 30: Espectro de transmissão do sistema LA, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina, l-arginina e combinação com (P4B) e sem bromelina (P4SB).

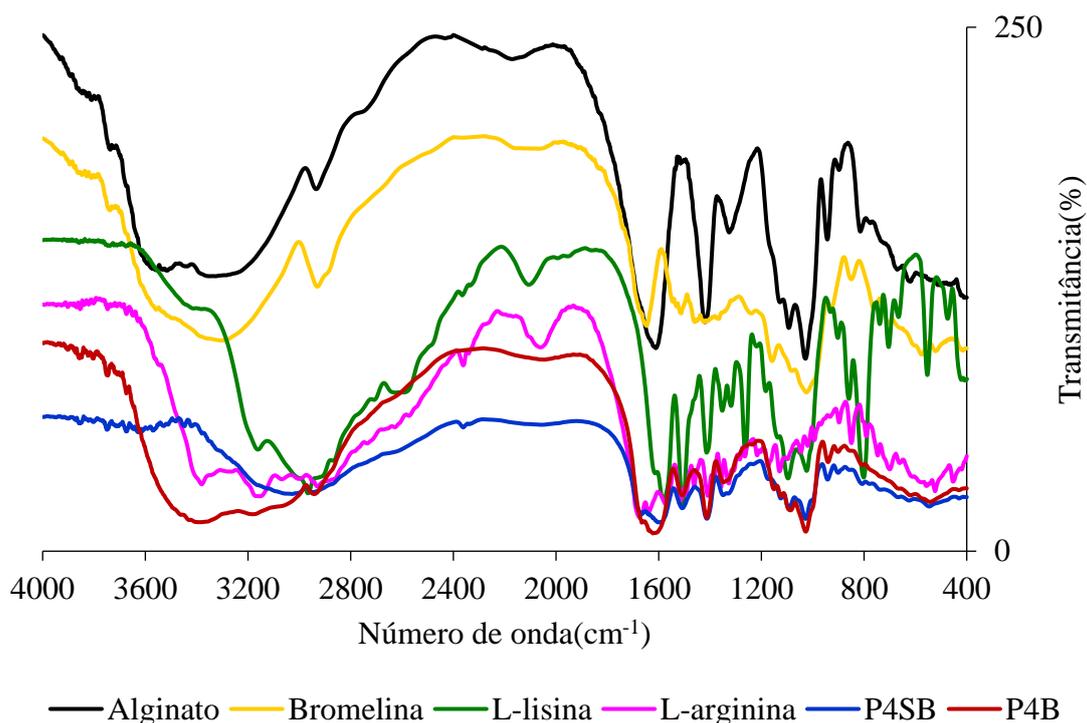
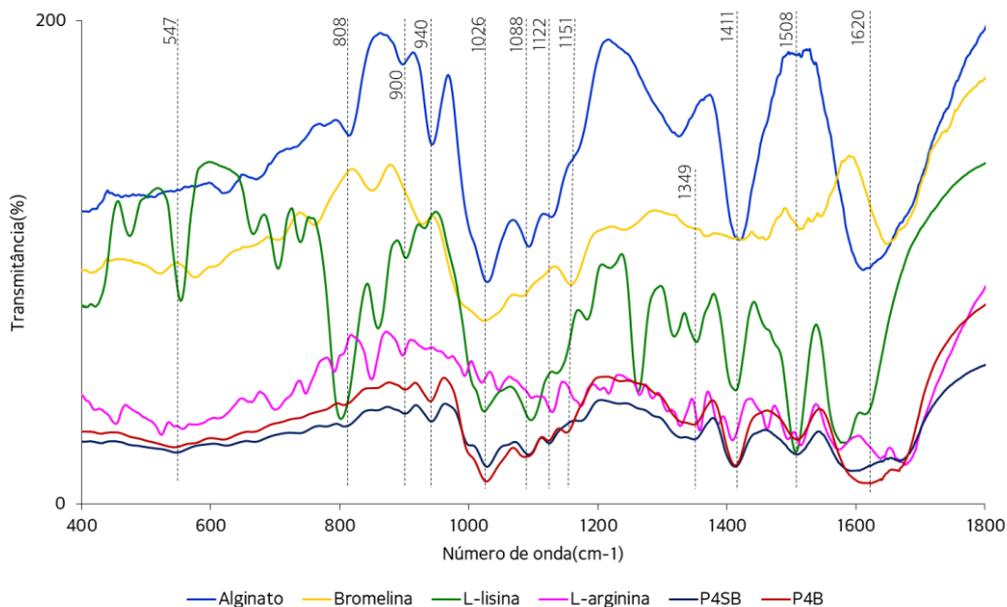


Figura 31: Região de *fingerprind* do sistema LA, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina, l-arginina e combinação com e sem bromelina.



O Quadro 9 apresenta os números de onda de transmissão bem como do tipo de vibração e a contribuição correspondente (LOPES; FASCIO, 2004; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2005).

Quadro 9: Comprimentos de onda de transmissão e contribuição correspondente ao sistema LA.

Número de Onda(cm^{-1})	Vibração	Contribuição
3401	N-H	L-lisina
3190	N-H	Combinação L-lisina e L-arginina
2945	C-H, N-H	Combinação Alginato, Bromelina e L-arginina
2058	N-H	L-arginina
1620	C=O, N-H	Combinação Alginato e L-lisina
1508	N-H	Combinação L-lisina e L-arginina
1411	N-H	Combinação Alginato, L-lisina e L-arginina
1349	N-H	Combinação L-lisina e L-arginina
1151	C-C, C-O, C-N	Combinação Bromelina, L-lisina e L-arginina
1122	C-N	L-arginina
1088	C-C, C-O, C-N	Combinação Alginato, Bromelina e L-lisina
1026	C-C, C-O	Combinação Alginato, Bromelina, L-lisina e L-arginina
940	C-C, C-O	Combinação Alginato, Bromelina e L-Lisina
900	C-C, C-O	Combinação Alginato, L-lisina e L-arginina
808	C-C, C-O	Alginato
547	N-H	L-lisina

Ao se avaliar os gráficos de transmitância dos padrões e do sistema sem bromelina, é possível verificar que o sistema tende a revestir a bromelina e os aminoácidos. Os picos do sistema LA se apresentam em baixa intensidade e são suprimidos pelos sinais de base advindos da combinação com alginato. Ainda, os picos da l-lisina se apresentam de maneira mais acentuada em relação aos picos de l-arginina.

A Figura 32 e Figura 33 apresentam o espectro de transmitância para o sistema LH, sendo que a Figura 32 apresenta o espectro completo e, a Figura 33 apenas a região de *fingerprint* para os sistemas analisados os quais facilitam a visualização das contribuições específicas de cada substância ao sistema analisado.

Figura 32: Espectro de transmissão do sistema LH, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina, l-histidina e combinação com (P5B) e sem bromelina (P5SB).

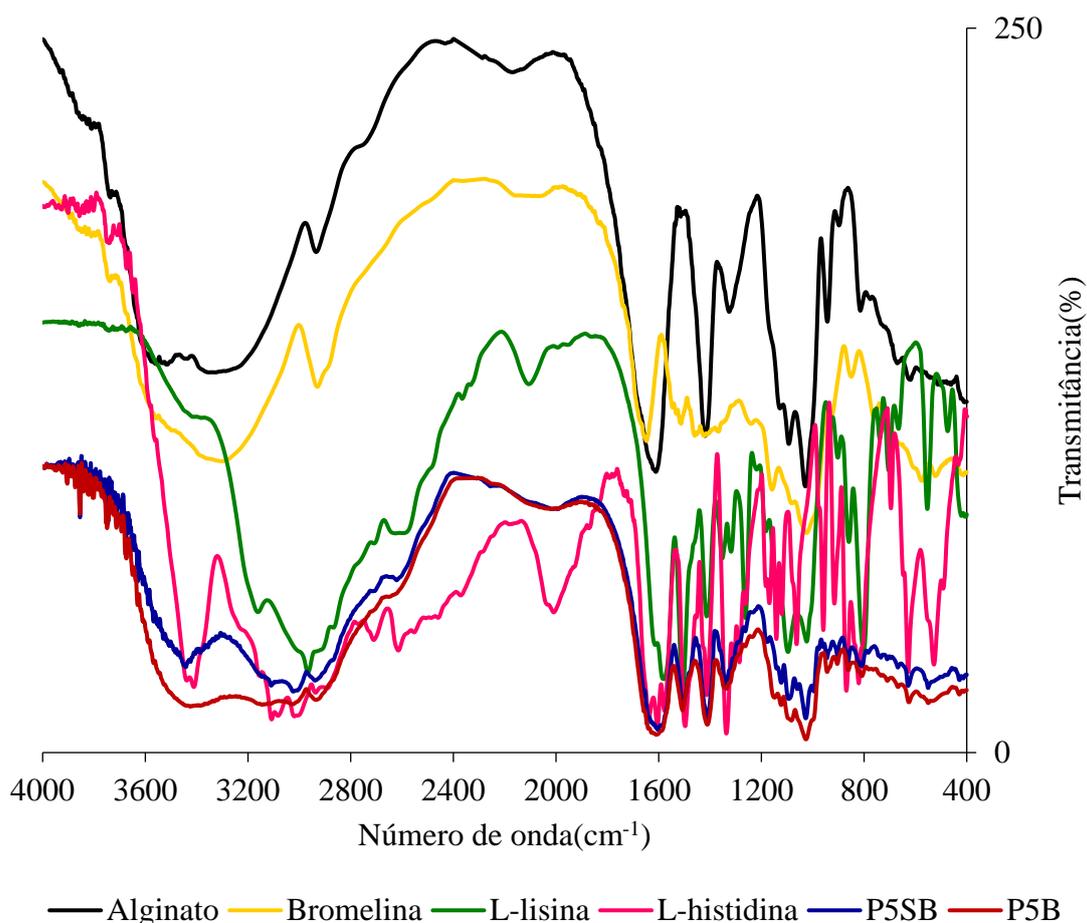
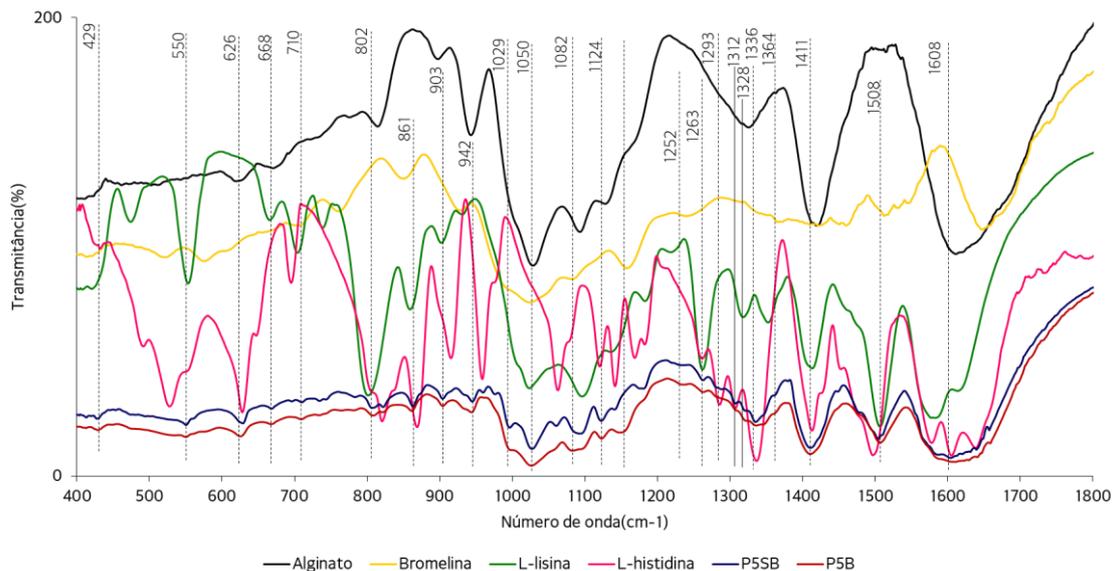


Figura 33: Região de *fingerprint* do sistema LH, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina, l-histidina e combinação com e sem bromelina.



Ao se avaliar os gráficos de transmissância dos padrões e do sistema sem bromelina, é possível verificar que o sistema tende a revestir a bromelina e os aminoácidos. Os picos do sistema LH se apresentam em baixa intensidade e são suprimidos pelos sinais de base advindos da combinação com alginato. Ainda, os picos da l-histidina se apresentam de maneira mais definida se comparado aos picos da l-lisina.

O Quadro 10 apresenta os números de onda de transmissão bem como do tipo de vibração e a contribuição correspondente (LOPES; FASCIO, 2004; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2005).

Quadro 10: Números de onda de transmissão e contribuição correspondente ao sistema LH.

Número de Onda(cm^{-1})	Vibração	Contribuição
3450	N-H, O-H	Combinação Alginato, Bromelina e L-histidina
3146	N-H, O-H	Combinação Alginato, Bromelina e L-histidina
3026	N-H, O-H	Combinação Alginato, Bromelina e L-histidina
2943	C-H	Combinação Alginato, Bromelina, L-lisina e L-histidina
2642	N-H	Combinação L-lisina e L-histidina
2024	N-H	Combinação L-lisina e L-histidina
1608	C=O, N-H	Combinação Alginato, Bromelina, L-lisina e L-histidina
1508	N-H	L-lisina
1411	C-H, N-H	Combinação Alginato, L-lisina e L-histidina
1364	N-H	L-lisina
1336	N-H, Alongamento de Anel	L-histidina
1328	N-H	L-lisina
1312	N-H	L-histidina
1293	N-H	L-histidina
1263	N-H	Combinação L-lisina e L-histidina
1252	N-H	Combinação Bromelina e L-lisina
1150	C-O, C-C, C-N	Combinação Bromelina e Alginato
1124	C-N	L-histidina
1082	C-O, C-C, C-N	Combinação Alginato, Bromelina e L-lisina
1029	C-O, C-C, C-N	Combinação Alginato, Bromelina e L-lisina
997	C-O, C-C, N-H	Combinação Alginato e L-lisina
942	C-O, C-C	Alginato
903	C-O, C-C, N-H	Combinação Alginato e L-lisina
861	N-H	Combinação Bromelina e L-lisina
802	N-H	Combinação L-lisina e L-histidina
710	N-H, Alongamento de Anel	Combinação Bromelina e L-lisina
668	N-H	Combinação Alginato e L-lisina
626	N-H	Combinação Alginato e L-histidina
550	N-H	Combinação L-lisina e L-histidina
429	N-H	Combinação L-lisina e L-histidina

A Figura 34 e Figura 35 apresentam o espectro de transmitância para o sistema AH, sendo que a Figura 34 apresenta o espectro completo e, a Figura 35 apenas a região de *fingerprint* para os sistemas analisados os quais facilitam a visualização das contribuições específicas de cada substância ao sistema analisado.

Figura 34: Espectro de transmissão do sistema AH, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-arginina, l-histidina e combinação com (P6B) e sem bromelina (P6SB).

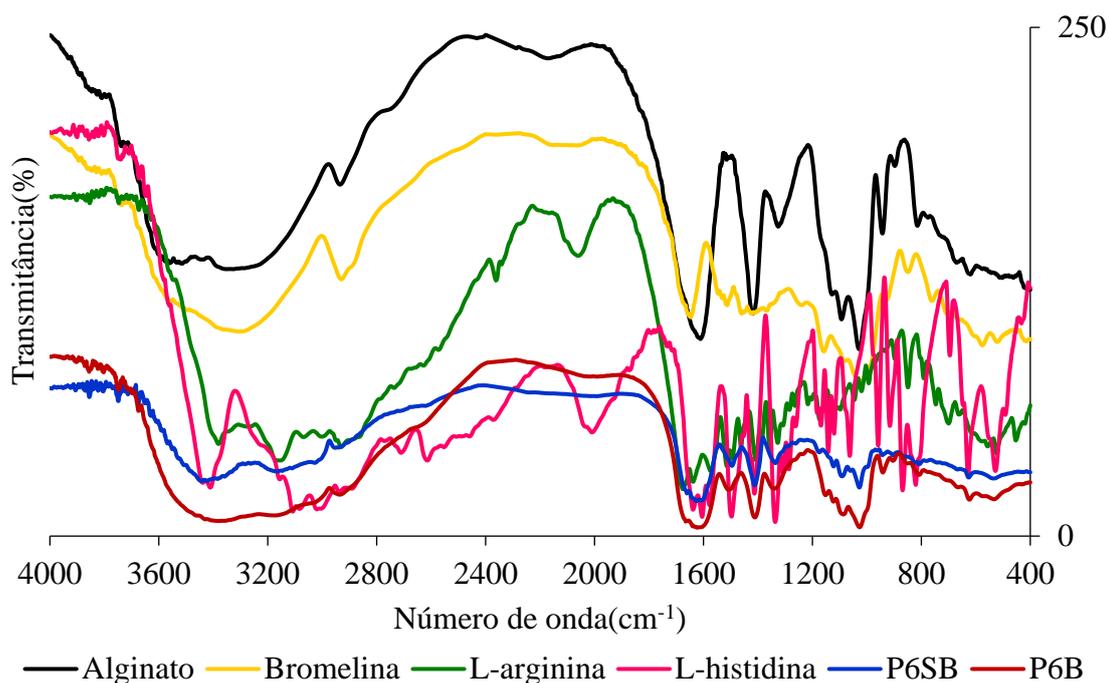
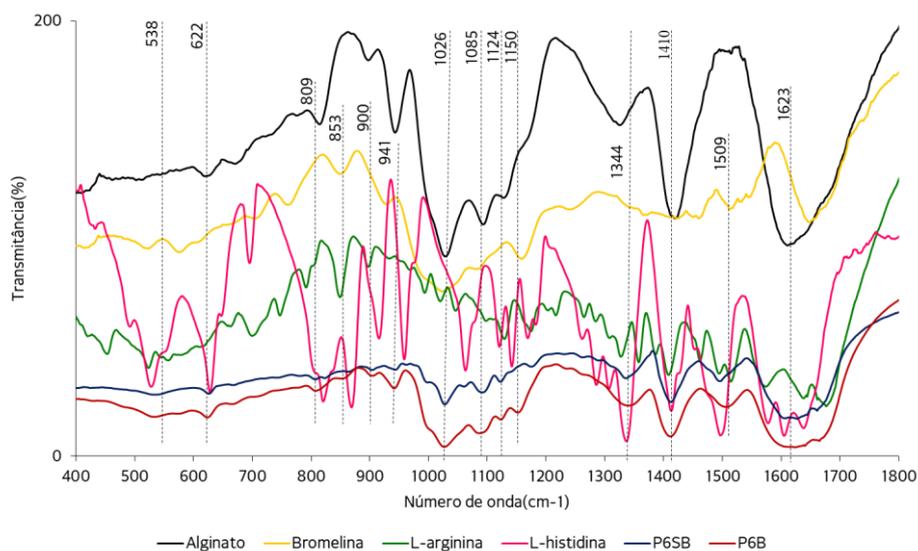


Figura 35: Região de *fingerprint* do sistema AH, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-arginina, l-histidina e combinação com e sem bromelina.



O Quadro 11 apresenta os números de onda de transmissão bem como do tipo de vibração e a contribuição correspondente (LOPES; FASCIO, 2004; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2005).

Quadro 11: Números de onda de transmissão e contribuição correspondente ao sistema AH.

Número de Onda(cm^{-1})	Vibração	Contribuição
3384	N-H, O-H	Combinação Alginato, Bromelina e L-arginina
3168	N-H, O-H	Combinação Alginato, Bromelina, L-arginina e L-histidina
2940	C-H, N-H	Combinação Alginato, Bromelina, L-arginina e L-histidina
1623	C=O, N-H	Combinação Alginato, Bromelina, L-arginina e L-histidina
1509	N-H, C-H	Combinação Bromelina, L-arginina e L-histidina
1410	N-H, C-H	Combinação Alginato, L-arginina e L-histidina
1344	N-H, C-H, Alongamento de Anel	Combinação Alginato, L-arginina e L-histidina
1150	C-O, C-C, C-N	Combinação Alginato e Bromelina
1124	C-O, C-C, C-N	Combinação Alginato e L-histidina
1085	C-O, C-C, C-N	Combinação Alginato, Bromelina e L-arginina
1026	C-O, C-C, C-N	Combinação Alginato, Bromelina e L-arginina
941	C-O, C-C	Alginato
900	C-O, C-C, N-H	Combinação Alginato e L-arginina
809	N-H, C-H	Combinação Alginato, L-arginina e L-histidina
622	N-H, C-H	Combinação Alginato, L-arginina e L-histidina
538	N-H, C-H	Combinação Bromelina, L-arginina e L-histidina

Ao se avaliar os gráficos de transmitância dos padrões e do sistema sem bromelina, é possível verificar que o sistema tende a revestir a bromelina e os aminoácidos. Os picos do sistema AH se apresentam em baixa intensidade e são suprimidos pelos sinais de base advindos da combinação com alginato. Ainda, os picos

da l-arginina e l-histidina se apresentam de maneira menos definida se comparado aos demais sistemas, além disso, os picos gerados são combinação desses aminoácidos.

A Figura 36 e Figura 37 apresentam o espectro de transmitância para o sistema LAH, sendo que a Figura 36 apresenta o espectro completo e, a Figura 37 apenas a região de *fingerprint* para os sistemas analisados os quais facilitam a visualização das contribuições específicas de cada substância ao sistema analisado.

Figura 36: Espectro de transmissão do sistema LAH, onde é possível observar os espectros padrão do alginato, bromelina, l-lisina, l-arginina, l-histidina e com (P7B) e sem bromelina (P7SB).

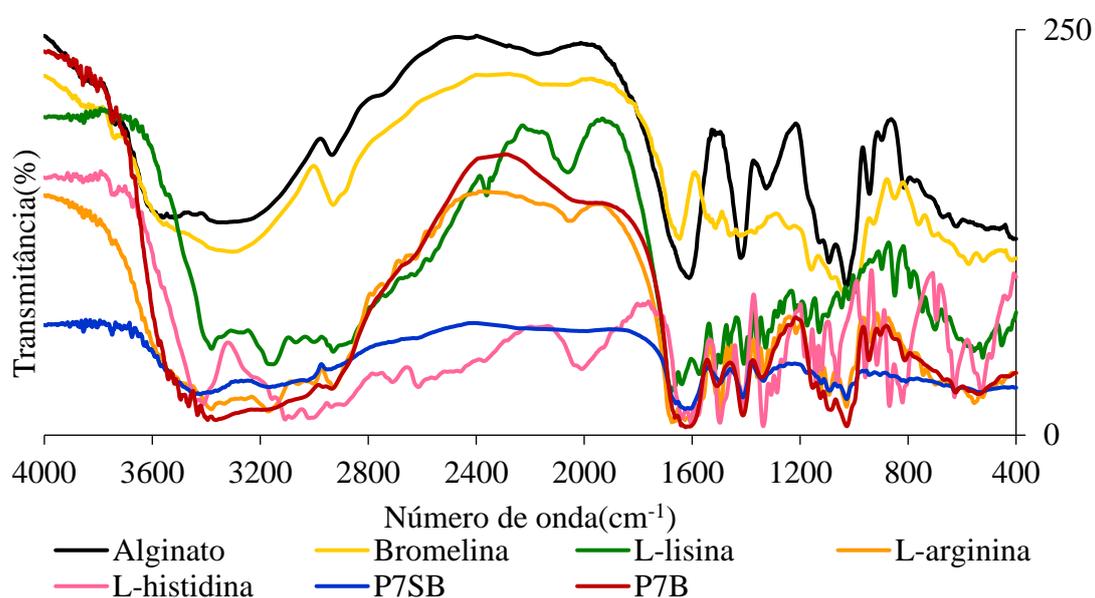
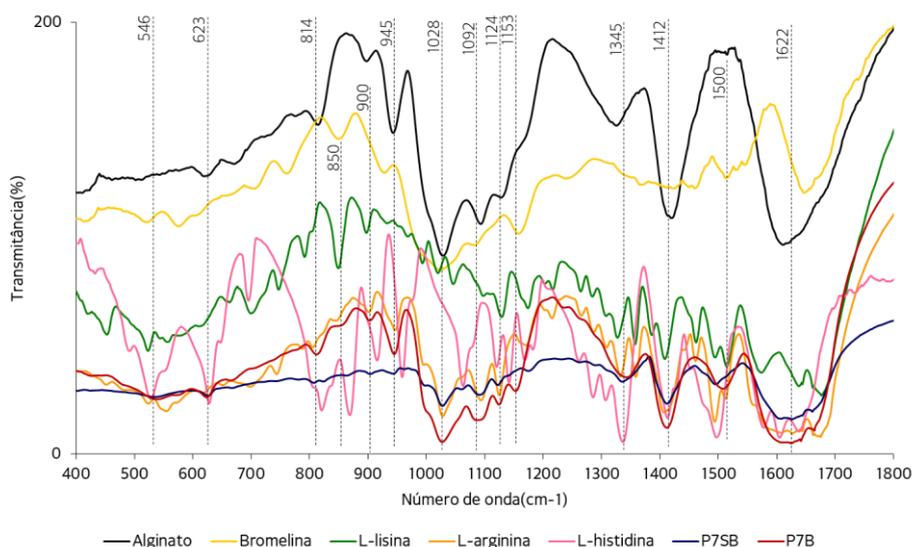


Figura 37: Região de *fingerprint* do sistema LAH.



O Quadro 12 apresenta os números de onda de transmissão bem como do tipo de vibração e a contribuição correspondente (LOPES; FASCIO, 2004; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2005).

Quadro 12: Números de onda de transmissão e contribuição correspondente ao sistema LAH.

Número de Onda(cm^{-1})	Vibração	Contribuição
3384	N-H, O-H	Combinação Alginato, Bromelina, L-lisina, L-arginina e L-histidina
3168	N-H, O-H	Combinação Alginato, Bromelina, L-lisina, L-arginina e L-histidina
2940	C-H, N-H	Combinação Alginato, Bromelina, L-arginina e L-histidina
1622	C=O, N-H	Combinação Alginato, Bromelina, L-lisina, L-arginina e L-histidina
1500	N-H, C-H	Combinação Bromelina, L-lisina, L-arginina e L-histidina
1412	N-H, C-H	Combinação Alginato, L-lisina, L-arginina e L-histidina
1345	N-H, C-H, Alongamento de Anel	Combinação Alginato, L-lisina L-arginina e L-histidina
1153	C-O, C-C, C-N	Combinação Alginato e Bromelina
1124	C-O, C-C, C-N	Combinação Alginato, L-lisina, L-arginina e L-histidina
1092	C-O, C-C, C-N	Combinação Alginato, Bromelina e L-arginina
1028	C-O, C-C, C-N	Combinação Alginato, Bromelina e L-arginina
945	C-O, C-C, N-H	Combinação Alginato e L-arginina
900	N-H	L-arginina
850	N-H, C-H	Combinação Bromelina e L-lisina
814	N-H, C-H	Combinação Alginato, L-lisina, L-arginina e L-histidina
623	N-H, C-H	Combinação Alginato e L-histidina
546	N-H, C-H	Combinação Bromelina e L-histidina

Ao se avaliar os gráficos de transmitância dos padrões e do sistema sem bromelina, é possível verificar que o sistema tende a revestir a bromelina e os aminoácidos. Os picos do sistema LAH se apresentam em baixa intensidade e são suprimidos pelos sinais de base advindos da combinação com alginato e dos aminoácidos.

Os picos gerados pelos aminoácidos são, em maioria, a combinação entre alginato e os aminoácidos l-arginina e l-histidina enquanto que os picos da l-lisina são

suprimidos ou combinados aos picos do sistema o que indica uma maior interação entre a l-lisina, as redes de alginato e a bromelina.

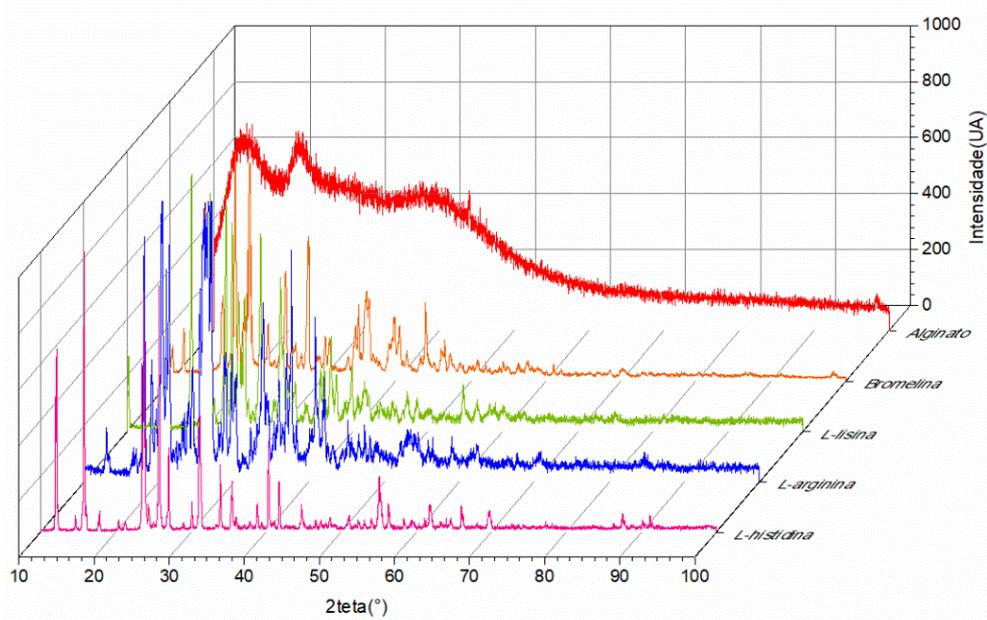
DI COCCO; BIANCHETTI; CHIELLINI, (2003) realizaram a avaliação das interações entre alginato de cálcio e os aminoácidos l-fenilalanina, l-alanina, l-lisina e l-histidina e verificaram que a interação formada é diferente para cada aminoácido empregado. A interação dos aminoácidos se dá essencialmente por equilíbrio hidrofóbico e características hidrofílicas das cadeias laterais dos aminoácidos, semelhante ao que acontece nas proteínas, que consiste na interação $-\text{NH} - \text{C}_2\text{HR} - \text{CO}-$, onde R é a cadeia do aminoácido.

Dessa forma, aplicando o modelo de interação $-\text{NH} - \text{C}_2\text{HR} - \text{CO}-$, DI COCCO; BIANCHETTI; CHIELLINI, (2003) e, utilizando valores coletados por análises de RMN, estabeleceram um valor de interação de K_{int} , onde K_{int} l-lisina = 11 e K_{int} l-histidina = 25, valores muito baixos quando comparados ao agente cross-link Ca^+ que apresenta K_{int} Ca^+ = 150. Portanto, é de se esperar interações fracas entre alginato de sódio e os aminoácidos, de forma a não gerarem mudança nas características ópticas e vibracionais das estruturas formadas quando são combinados.

5.2.2 Análises de DRX

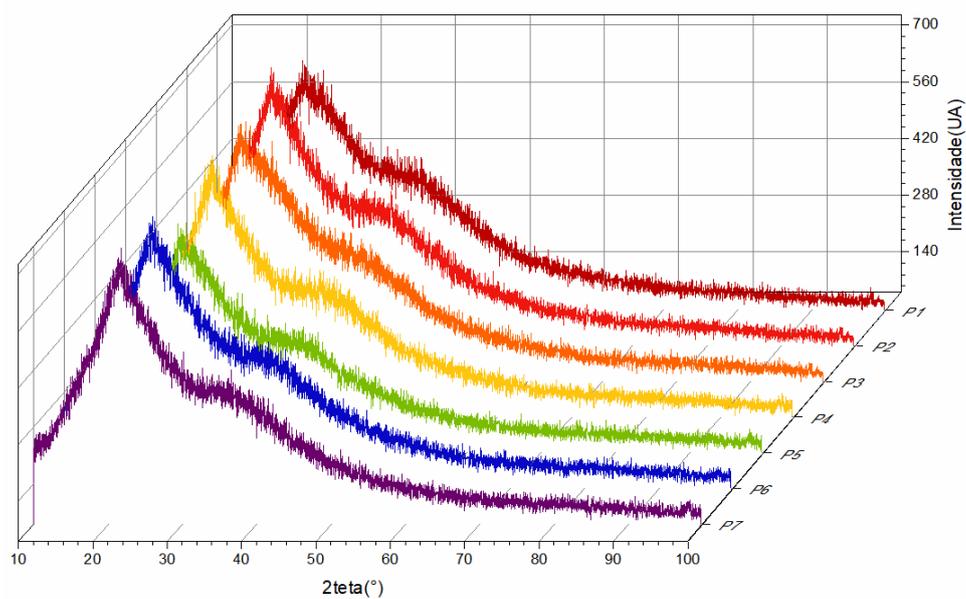
As Figura 38 apresenta o difratograma das substâncias utilizadas nas sínteses na qual é possível notar que, com exceção do alginato, as demais substâncias apresentam rede de difração cristalina apresentando picos bem definidos entre 10 e 70°.

Figura 38: Difratogramas dos padrões utilizados nas sínteses.



A Figura 39 apresenta o difratograma dos sistemas sintetizados os quais apresentam combinação entre alginato, bromelina e aminoácidos.

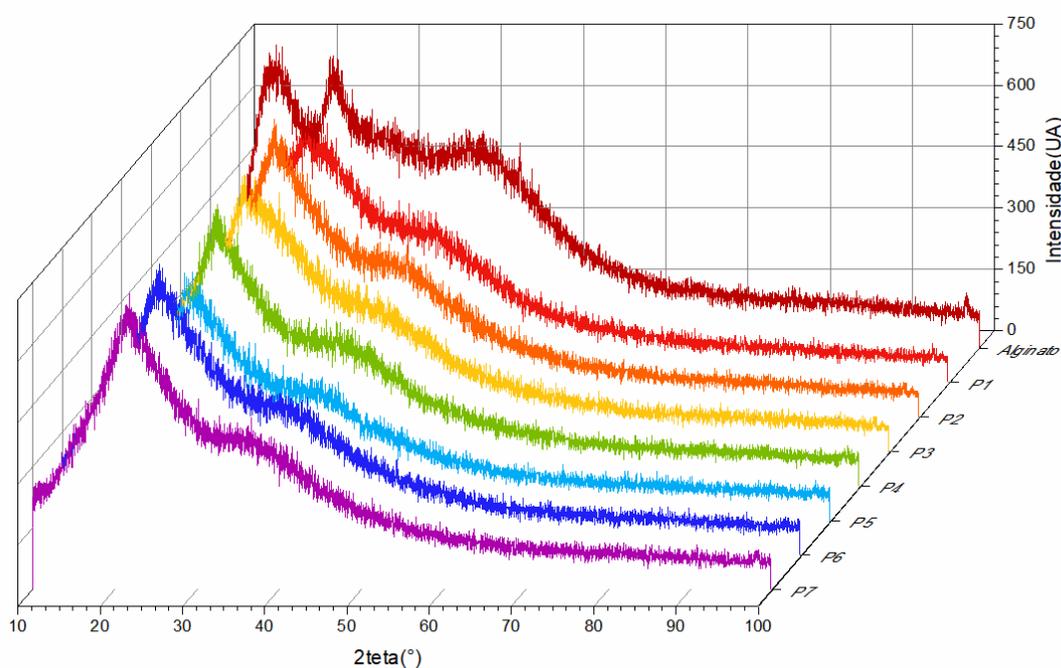
Figura 39: Difratogramas dos sistemas sintetizados.



Após as análises dos sistemas, é possível verificar que não apresentam picos de difração, mas sim bandas características de sistemas amorfos, como o alginato. Dessa forma, nos sistemas formados entende-se que tanto a bromelina quanto os aminoácidos interagiram de forma a formar estruturas amorfas e sem organização cristalina.

Ainda, é possível verificar que os sistemas interagiram com a rede de alginato, uma vez que as bandas existentes no alginato em 15 e 25° não se apresentam nos sistemas formados o que indica uma possível complexação das redes de alginato com as substâncias adicionadas, neste caso, bromelina e aminoácidos, conforme Figura 40.

Figura 40: Difractogramas dos sistemas e padrão de alginato.



O uso de carboidratos no microencapsulamento de proteínas é comum, assim como o uso de aminoácidos para aumento da estabilização das estruturas terciária e quaternária das proteínas (AJMERA; SCHERLISS, 2014; ZHANG et al., 2016; ZOU et al., 2016; KAHYA; ERIM, 2019; MAH et al., 2019; EMAMI et al., 2019; YU et al., 2019). Apesar disso, a combinação entre alginato e aminoácidos para a melhora das propriedades de encapsulamento e estabilidade de proteínas não é comum.

FAGHIHI et al., (2014) estudaram a incorporação de aminoácidos em IgG para aumento das propriedades de aerossol, das quais a fenilalanina e cisteína apresentaram as melhores combinações. No entanto, ao realizarem análises de DRX foi possível

identificar a cristalinidade das partículas formadas o que indica que apesar da estabilidade aerodinâmica atingida, as estruturas cristalinas podem gerar vacâncias de rede e aumentar processos degradativos quando administrados oralmente.

MAH et al., (2019) estudaram a aplicação dos aminoácidos l-isoleucina e l-leucina na estabilização da trealose (um carboidrato) e, verificaram que o aumento das propriedades aerodinâmicas dos sistemas está correlacionado com o grau de cristalinidade das cadeias formadas, no qual os melhores sistemas apresentaram baixas quantidades de cristalinidade. Além disso, constataram que somente o uso de aminoácidos em proporções superiores a 40% (m/m) evitam processos de umidificação e consequente recristalização e reorganização das redes de trealose.

SHARMA e SHARMA, 2018 desenvolveram sistemas de liberação controlada de bromelina no intestino aplicando Eudragit L100 e, verificaram que os sistemas formados apresentaram características amorfas quando analisadas por DRX, confirmando a importância da propriedade amorfa a qual gera sistemas com menor capacidade de absorção de água apresentando maior capacidade de aplicação ser em sistemas de liberação controlada.

AJMERA e SCHERLISS, (2014) avaliaram o uso de misturas de aminoácidos em processos de estabilização da enzima catalase e em modelo de antígeno de influenza, aplicado como modelo de vacina. Foi possível verificar que os aminoácidos geraram efeitos na viscosidade e atividade de superfícies dos excipientes na proteção das proteínas do estresse interfacial, especialmente durante a secagem em spray dryer, das quais a combinação com os aminoácidos foram capazes de gerar estruturas amorfas que impediram processos de absorção de umidade e recristalização, aumentando a estabilidade dos sistemas.

Portanto, os processos de interação alginato-bromelina-aminoácidos nos sistemas formados geraram sistemas com rede amorfa caracterizadas pela não formação de picos bem definidos, o que pode aumentar a estabilidade da bromelina, uma vez que a amorfização dos sistemas está correlacionada com processos de absorção de umidade e, como observado no subtópico 5.1.2, o teor de umidade dos sistemas varia entre 0,5 e 2,0% o que gera sistemas mais estáveis que evitam processos de aglomeração de pó, recristalização proteica e movimentação das redes de alginato.

5.2.3 Análises de MEV

As análises de MEV mostram que no sistema Lis há dois tipos de morfologias as partículas das quais as partículas superiores a $2\mu\text{m}$ não apresentam enrijecimento de suas estruturas as quais apresentam superfícies lisas e sem presença de rugas, conforme apresentado nas Figuras 41 e 42.

Figura 41: Morfologia do sistema Lis da combinação entre alginato, bromelina e l-lisina, micrografias a $2\mu\text{m}$.

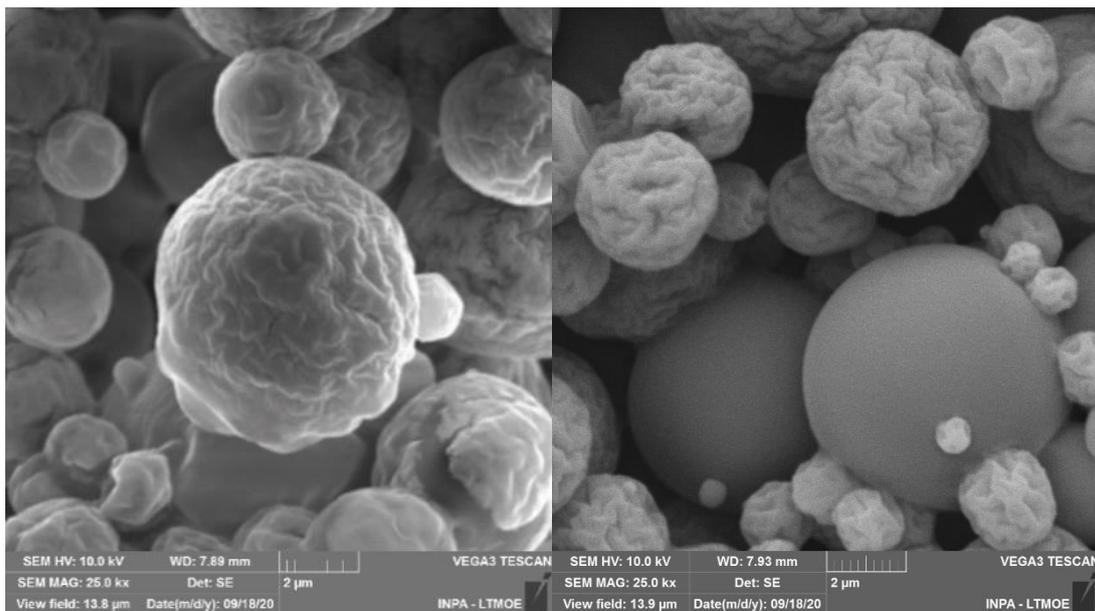
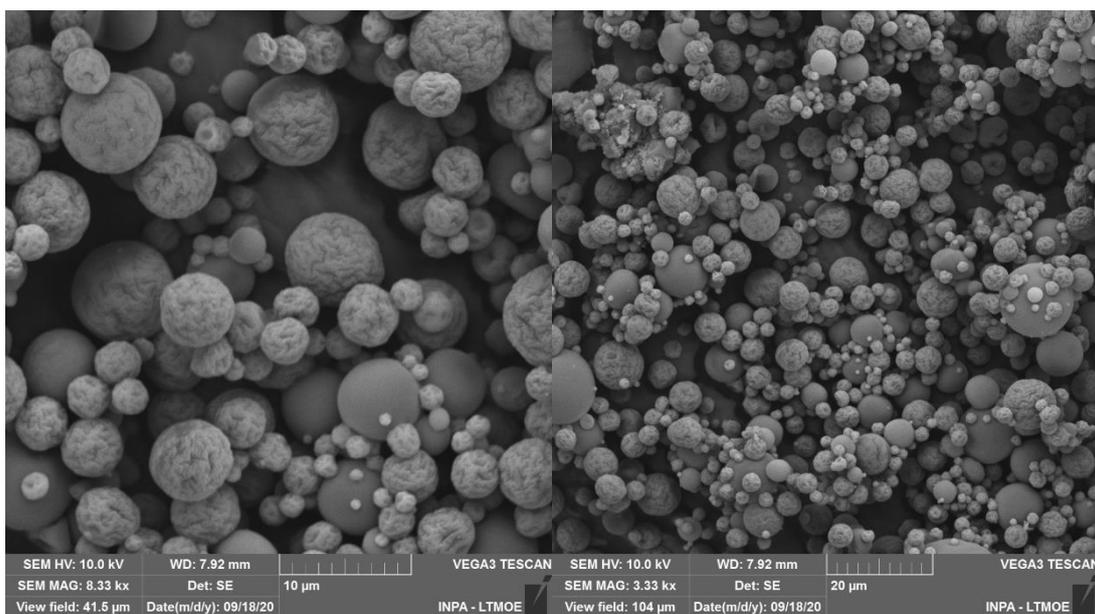


Figura 42: Morfologia do sistema Lis, à esquerda micrografia a $10\mu\text{m}$ e, a direita, micrografia a $20\mu\text{m}$.



No sistema Arg, há somente um tipo de morfologia que se caracteriza pela presença de estruturas menos definidas e com superfícies muito mais rugosas se comparadas ao sistema Lis, conforme apresentado nas Figuras 43 e 44.

Figura 43: Morfologia do sistema Arg da combinação entre alginato, bromelina e l-arginina, à esquerda micrografia a 2 μm e, a direita, micrografia a 5 μm .

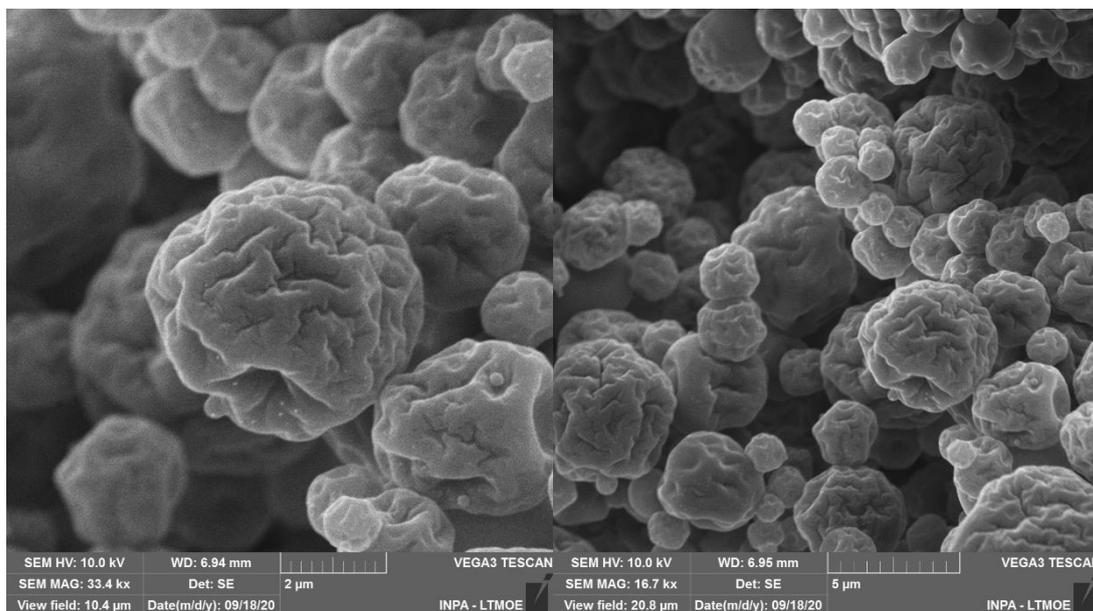
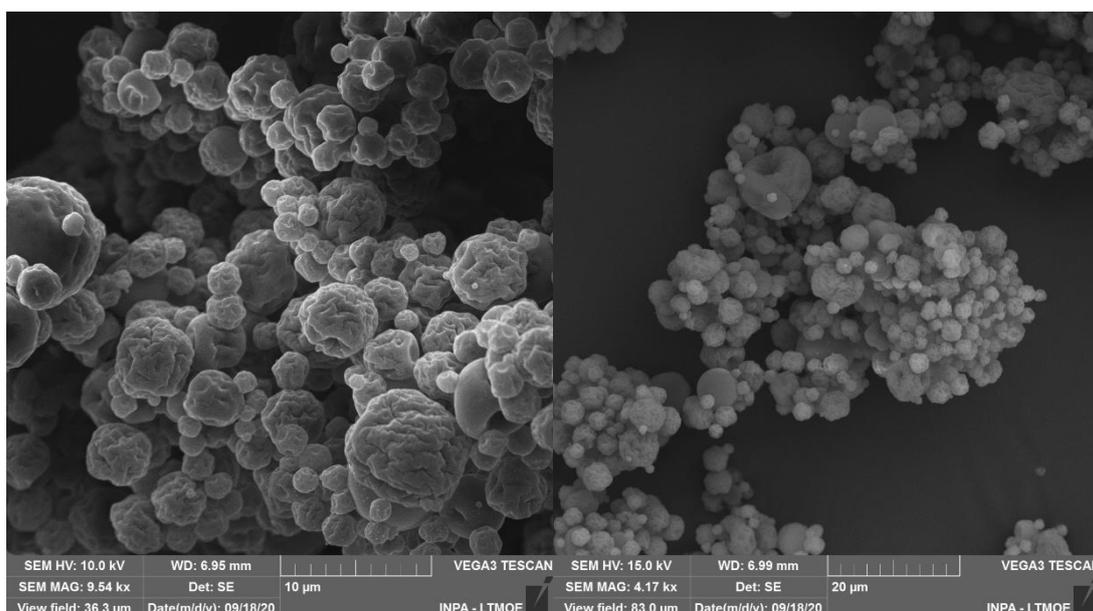


Figura 44: Morfologia do sistema Arg, à esquerda micrografia a 10 μm e, a direita, micrografia a 20 μm .



O sistema His apresenta dois tipos de morfologias sendo a maioria com superfícies rugosas e não muito bem definidas e, também, partículas de formato redondo e bem definidas. Ainda, observa-se que em ambos os tipos de partícula se apresentam pequenos pontos os quais podem indicar um encapsulamento não efetivo da l-histidina, conforme apresentado nas Figuras 45 e 46.

Figura 45: Morfologia do sistema His, combinação entre alginato, bromelina e l-histidina, à esquerda micrografia a 2 μm e, a direita, micrografia a 5 μm .

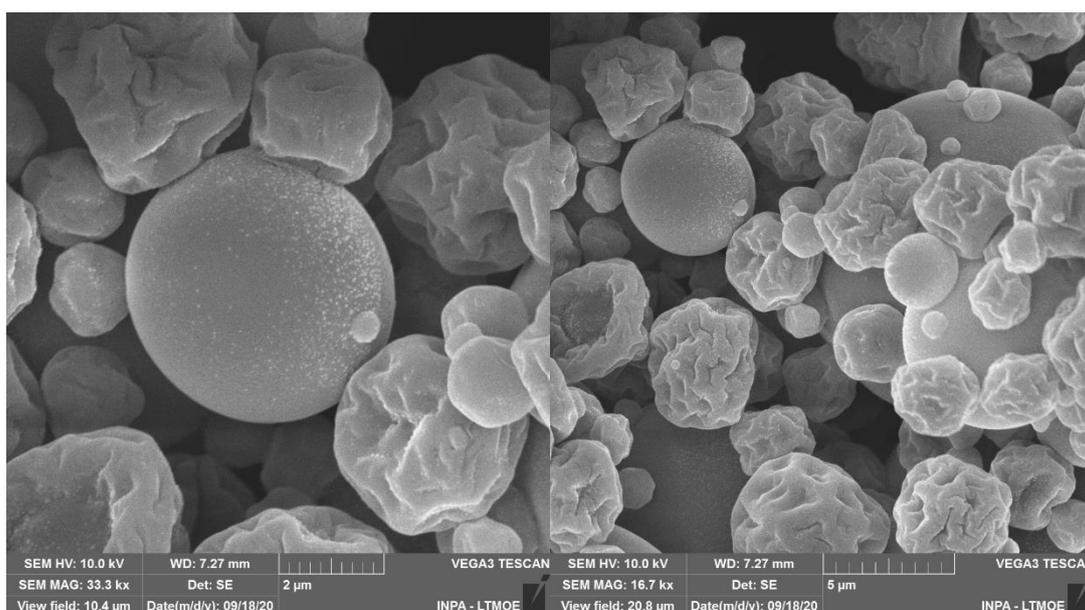
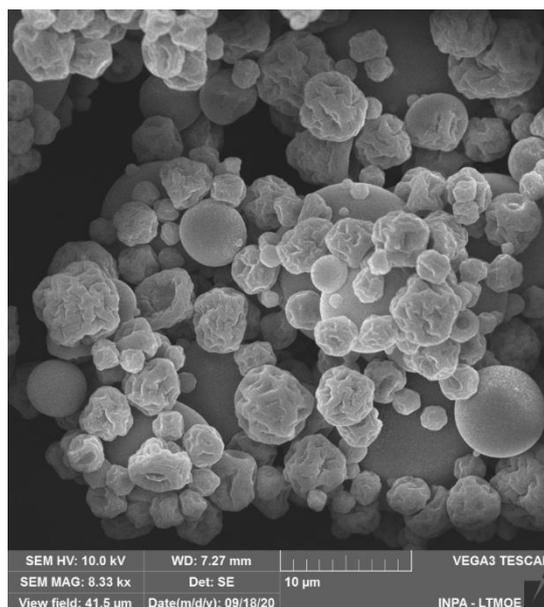


Figura 46: Morfologia do sistema His, micrografia a 10 μm .



O sistema LA apresenta dois tipos de morfologias sendo a maioria com superfícies rugosas e não muito bem definidas e, também, partículas de formato mais definido e arredondado, mas com superfície não tão lisas como visto no sistema 1, as micrografias do sistema LA são apresentas nas Figuras 47 e 48.

Figura 47: Morfologia do sistema LA da combinação entre alginato, bromelina, l-lisina e l-arginina, à esquerda micrografia a 2 μm e, à direita micrografia a 5 μm .

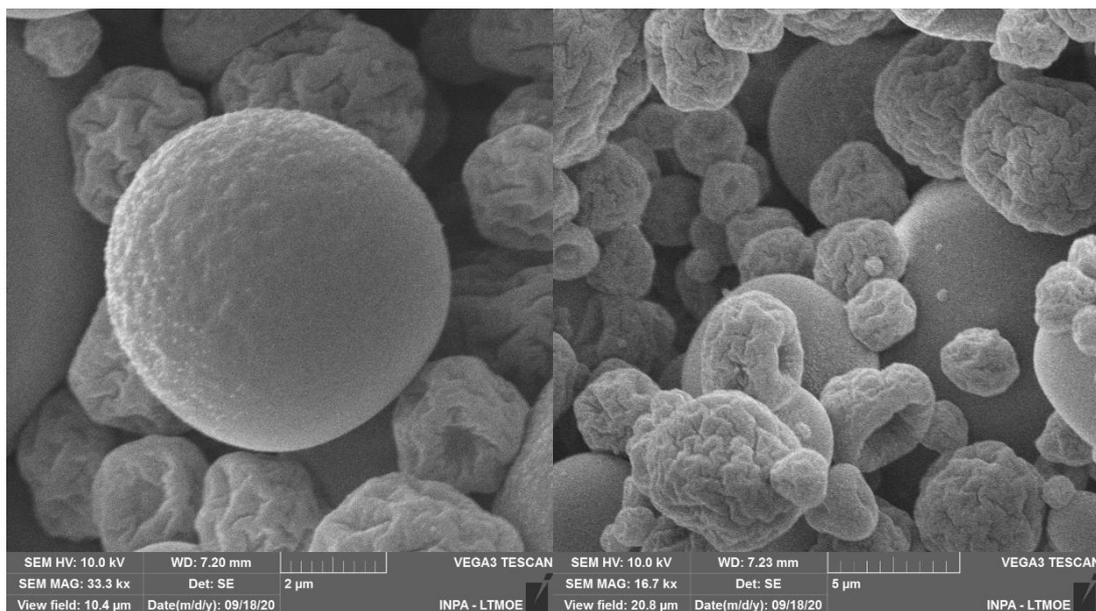
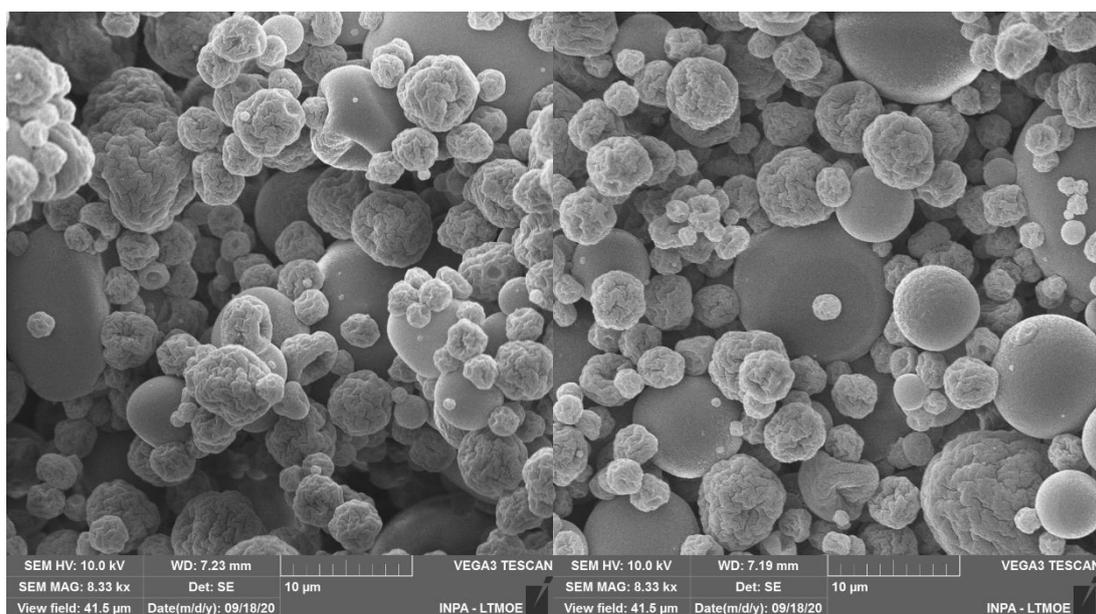


Figura 48: Morfologia do sistema LA, micrografias a 10 μm .



O sistema LH apresenta dois tipos de morfologias sendo a maioria com superfícies rugosas e não muito bem definidas e, também, partículas de formato mais definido e arredondado, mas com superfícies não tão lisas como visto no sistema 1, ainda observa-se que em ambos os tipos de partícula se apresentam pequenos pontos conforme visto no sistema 3 o que pode indicar um baixo encapsulamento da l-histidina, conforme apresentado nas Figuras 49 e 50.

Figura 49: Morfologia do sistema LH da combinação entre alginato, bromelina, l-lisina e l-histidina, micrografias a 2 μm .

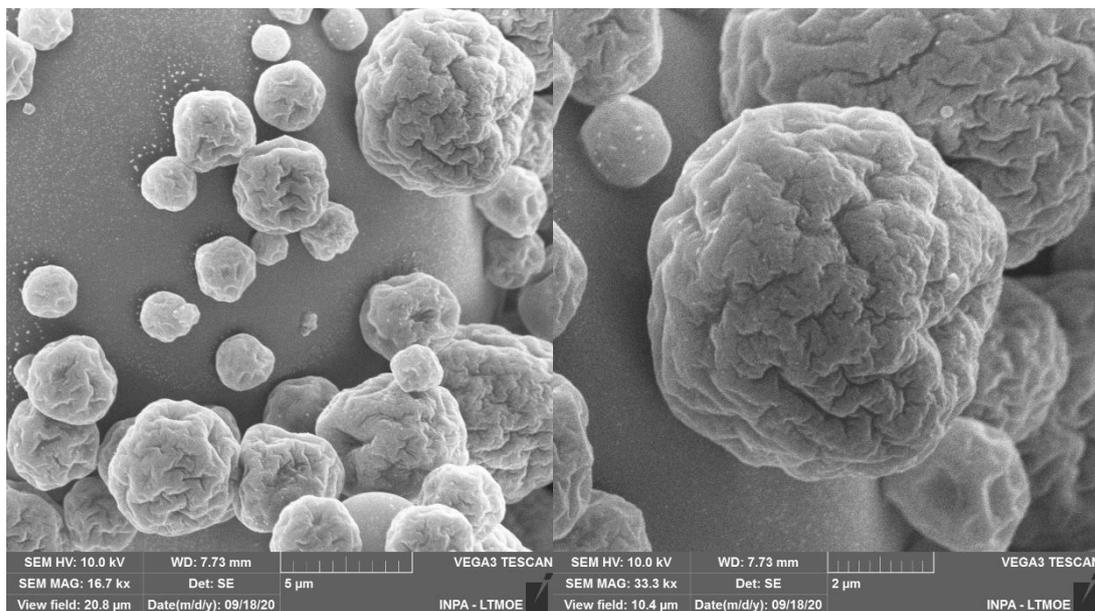
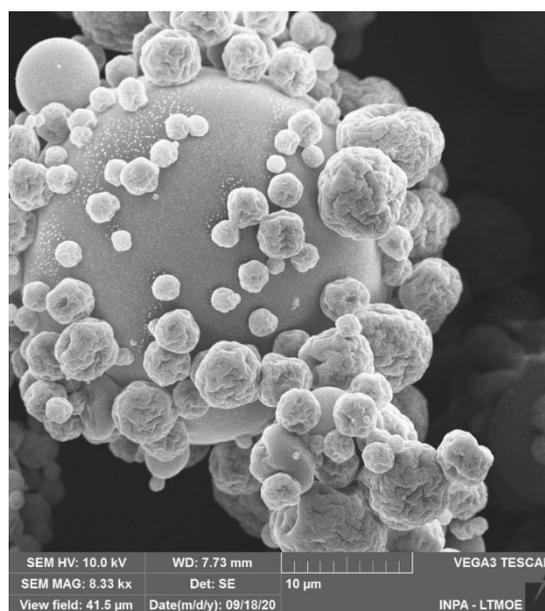


Figura 50: Morfologia do sistema LH, micrografia a 10 μm .



O sistema AH apresenta dois tipos de morfologias as partículas das quais são presentes partículas lisas e arredondadas e, também, partículas rugosas e não muito bem definidas, conforme Figura 51 e 52.

Figura 51: Morfologia do sistema AH da combinação entre alginato, bromelina, l-arginina e l-histidina, à esquerda micrografia a 2 μm e, a direita, micrografia a 5 μm .

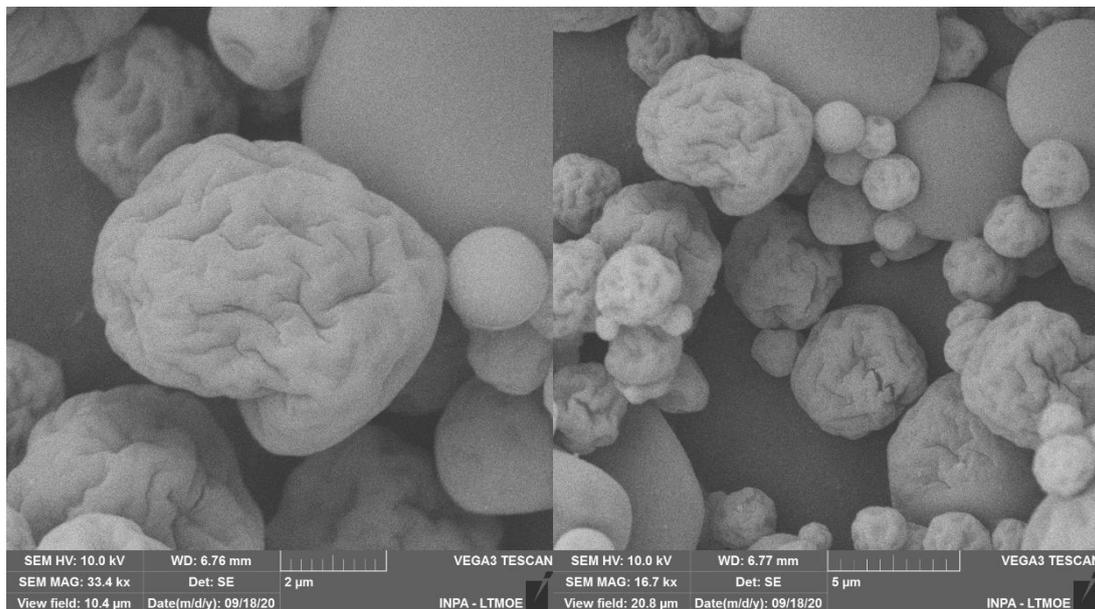
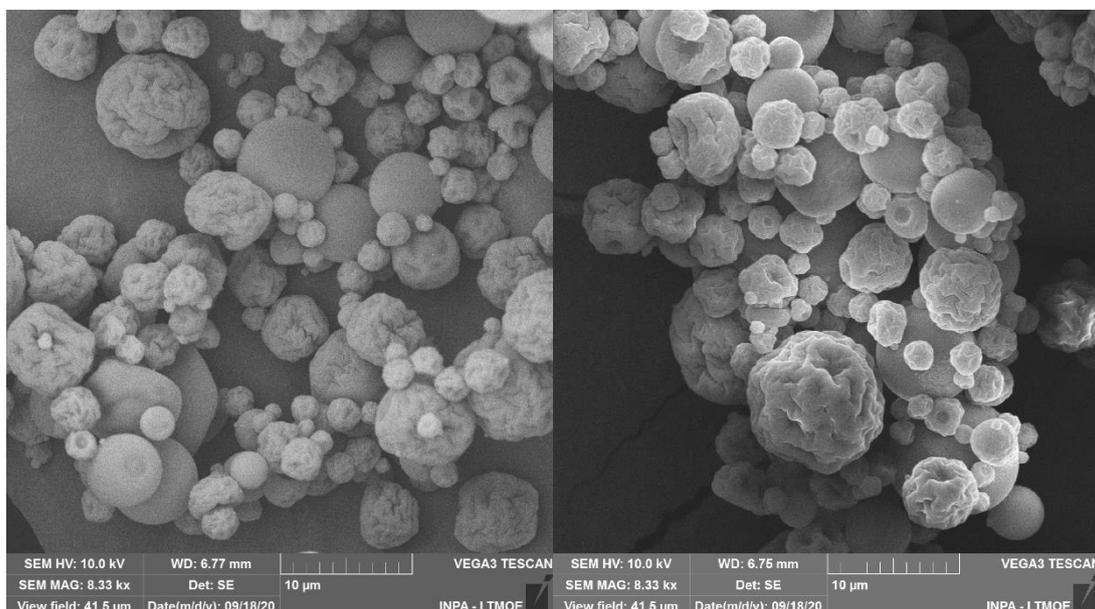


Figura 52: Morfologia do sistema AH, micrografias a 10 μm .



Apesar de apresentar l-histidina em sua composição, o sistema AH não apresentou os particulados presentes no sistema His e LH o que indica uma maior interação entre l-arginina, l-histidina e as redes de alginato.

O sistema LAH apresenta dois tipos de morfologias de partículas das quais são presentes partículas lisas e arredondadas e, também, partículas rugosas e não muito bem definidas, conforme Figura 53 e 54.

Figura 53: Morfologia do sistema LAH da combinação entre alginato, bromelina, l-lisina, l-arginina e l-histidina, à esquerda micrografia a 2 μm e, a direita, micrografia a 5 μm .

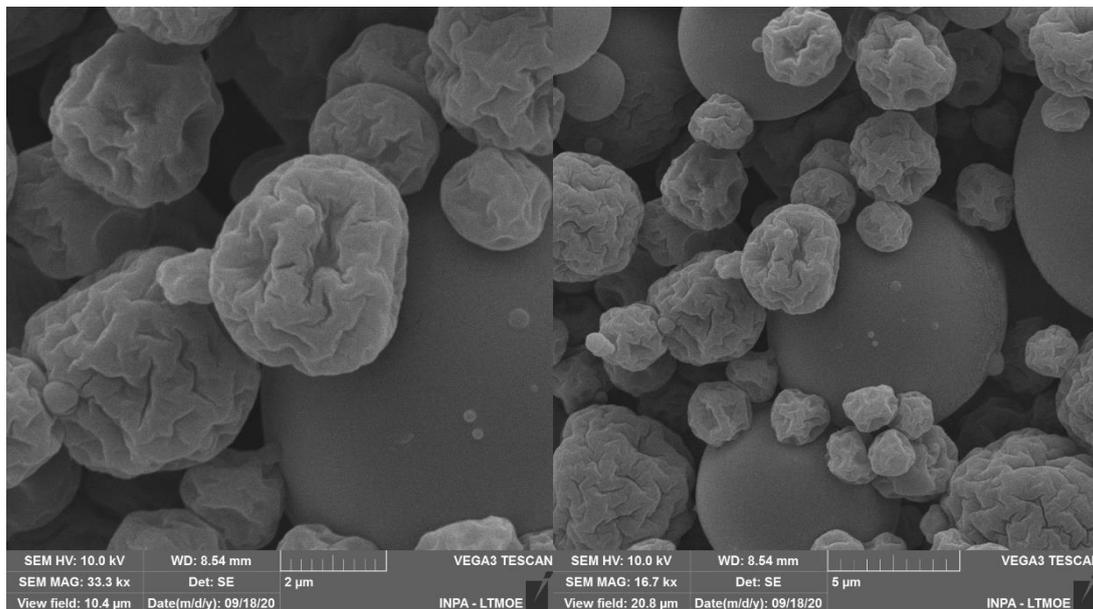
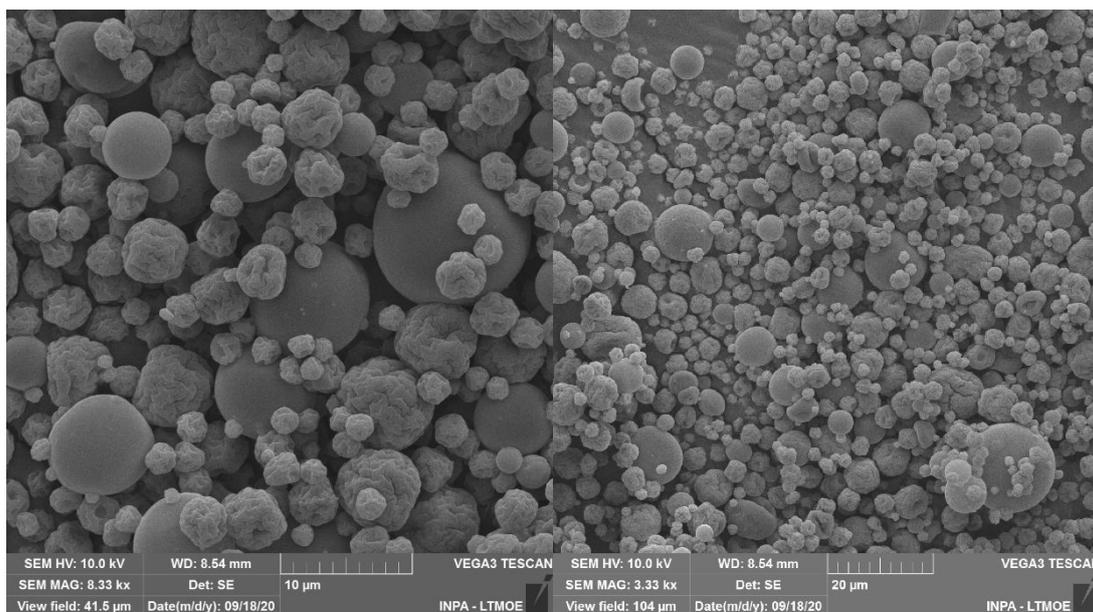


Figura 54: Morfologia do sistema LAH, à esquerda micrografia a 10 μm e, a direita, micrografia a 20 μm .



Apesar de apresentar l-histidina em sua composição, o sistema LAH não apresentou os particulados presentes no sistema His e LH o que indica uma maior

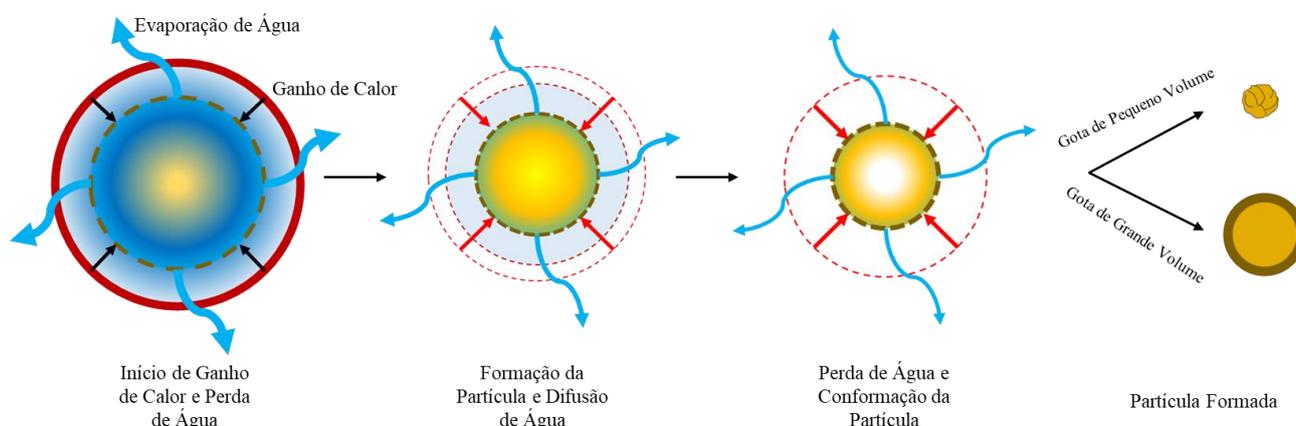
interação entre os aminoácidos e a rede de alginato o que possivelmente gera um melhor processo de encapsulamento de todas as substâncias pelo alginato, uma vez que ele possui proporcionalmente concentração mais alta.

Após a avaliação da morfologia de todos os sistemas, verifica-se que todos os sistemas apresentaram 2 morfologias de partícula indicando processos de secagem complexos, uma vez que as algumas partículas se apresentam em formato liso e outras em formato rugoso.

Estudos anteriores mostram que os processos de secagem por spray dryer são influenciados pela temperatura, viscosidade, concentração(m/v) e tamanho do bico do pulverizador os quais podem gerar diversos tipos de morfologia como também das substâncias utilizadas na microencapsulação, que podem gerar estruturas arredondadas, rugosas ou com furos e halos que indicam possível explosão ou erosão das partículas (BENCHABANE; SUBIRADE; VANDENBERG 2007; VICENTE et al., 2013; ABDULLAHI; BURCHAM; VETTER, 2020).

Nos sistemas formados, as partículas apresentam dois tipos de morfologia o que pode ser explicado pelo diâmetro do atomizador utilizado, uma vez que fora empregado um dispersor de 1,2 mm, o que induz a produção de gotículas de maior volume que ao secarem tender a formar estruturas mais rugosas. Figura 55 apresenta o esquema da secagem atingida nos sistemas.

Figura 55: Esquema representativo da secagem e formação das partículas dentro do spray dryer.



Fonte: Própria, baseado em BOWEY et al., (2013).

Além do volume, a temperatura também apresenta grande influência na morfologia das partículas. Estudos realizados por BENCHABANE; SUBIRADE; VANDENBERG (2007) avaliaram a influência dos parâmetros do spray dryer no encapsulamento de BSA em alginato de sódio e verificaram que o aumento da temperatura gera micropartículas com “rugas”, as quais em temperaturas até 150°C houve a formação de morfologias entre “laranja” e “framboesa” e, para temperaturas superiores da ordem de 175°C até 200°C houveram a formação de morfologias entre “framboesa” e “rugosas”.

Em estudos realizados por BOWEY et al., (2013) os quais utilizaram o alginato de sódio no encapsulamento de insulina por spray dryer, obtiveram assim como nos estudos deste trabalho, a formação de duas morfologias, onde as cápsulas apresentaram superfícies lisas e, também, superfícies rugosas ou com pequenas ondulações.

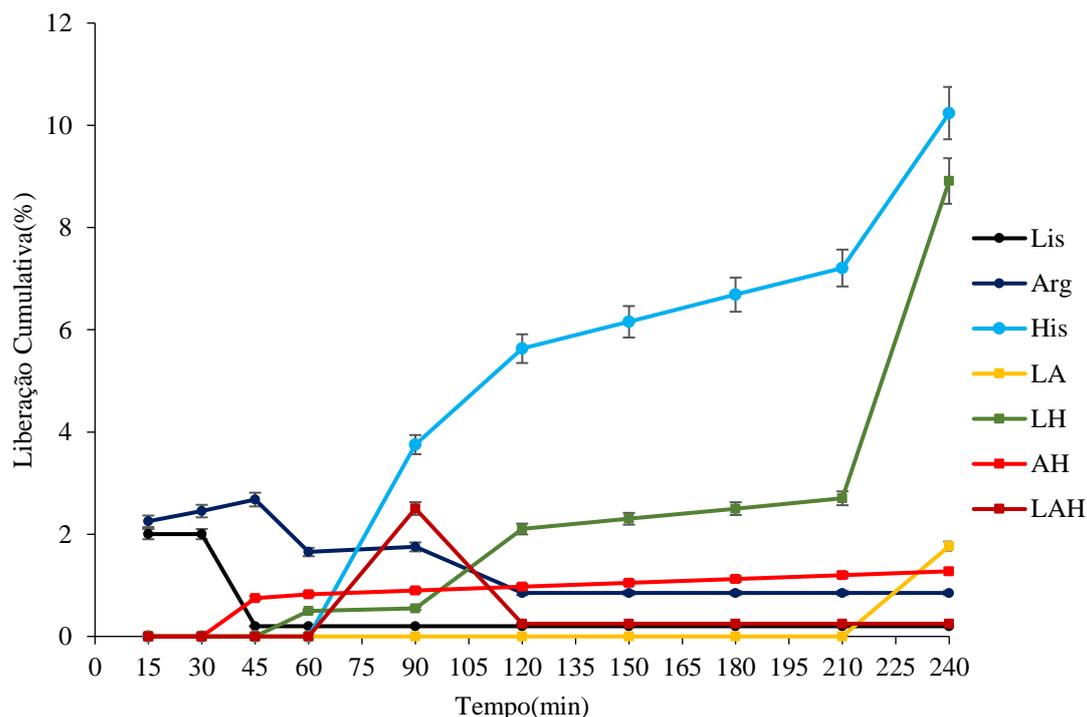
De acordo com BOWEY et al., (2013), ondulações, rugas ou crateras são comumente relatadas em partículas secas por pulverização. As ondulações ou rugas podem atuar no aumento da taxa de difusão do encapsulado, ao aumentar a área de superfície, em comparação com partículas uniformemente esféricas. No entanto, em alguns casos, extensas divisões podem fazer com que as partículas se achatem, o que poderia reduzir a área de superfície e diminuir taxas de liberação do encapsulado.

5.3 ANÁLISES DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

5.3.1 Liberação em pH 3,0

Os resultados demonstram que os sistemas não foram capazes de liberar bromelina em quantidades superiores a 20%, mesmo após 240 minutos o máximo de liberação se deu pelo sistema His com 10% de liberação, seguido pelo sistema LH e pelo sistema LAH, com 8,9% e 1,8% respectivamente, conforme apresentado na Figura 56.

Figura 56: Liberação controlada em pH 3,0.



Os resultados mostram o comportamento dos sistemas em solução tampão acetato de sódio e ácido cítrico em pH 3,0 os quais não são capazes de liberar a bromelina, mesmo após 240 minutos. O comportamento aqui observado se dá pela hidratação e inchaço de uma pequena quantidade das micropartículas, uma vez que somente a solução tampão não é suficiente para a completa hidratação dos sistemas e consequente liberação de proteínas (KAHYA; ERIM, 2019).

Estudos como o de MUMPER et al., 1994 e de LEE et al., 2008 avaliam o uso de soluções ácidas e solução tampão pH 3,0 em sistemas compostos por alginato de sódio e combinações os quais verificam o mesmo comportamento apresentado no presente estudo. Segundo MUMPER et al., 1994 o comportamento observado se dá pelo inchaço de uma pequena quantidade de partículas onde o alginato gera efeitos repulsivos fortes o suficiente para evitar grandes interações com o meio ácido.

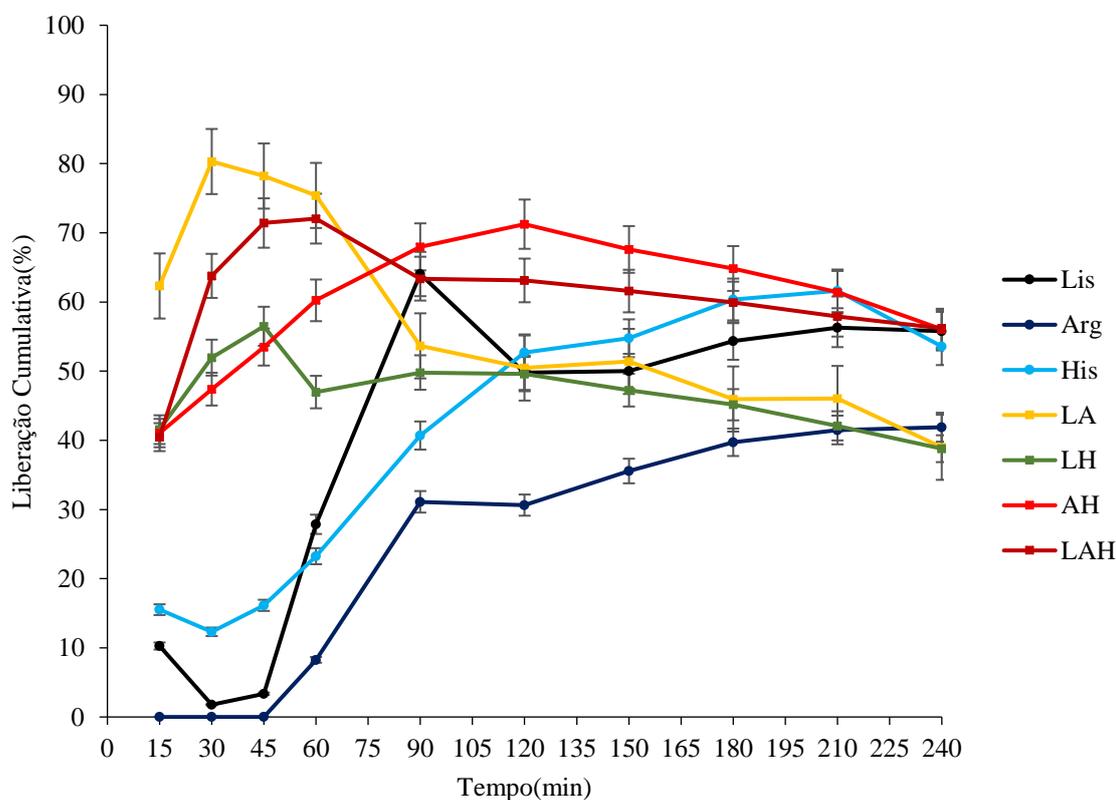
KAHYA e ERIM, 2019 combinaram alginato ao surfactante sódio dodecil sulfato de sódio(SDS) no encapsulamento por gelificação iônica e verificaram comportamento semelhante, no entanto, em seus estudos encontraram que parte das partículas sofreram inchaço e, portanto, em seus sistemas a taxa de hidratação fora maior e, conseqüentemente, a liberação de proteínas fora maior, atingindo 37% ao final de 120 minutos para os sistemas somente com alginato e 10% para o sistema avaliado no estudo.

Portanto, a aplicação dos sistemas em meios ácidos compostos somente por solução tamponante gera sistemas estáveis e não adsorptivos, uma vez que não absorvem água ou o meio ácido.

5.3.2 Liberação em pH 7,0

Os resultados demonstram que todos os sistemas foram capazes de liberar bromelina, no entanto, o comportamento fora variado de acordo com o aminoácido utilizado onde os sistemas apresentaram rápida liberação para as análises realizadas em até 240 minutos, como apresentado no sistema LA com máximo de 80% de liberação, já o sistema Arg apresenta o mínimo de liberação atingindo 41%, conforme apresentado na Figura 57.

Figura 57: Liberação controlada em pH 7,0.



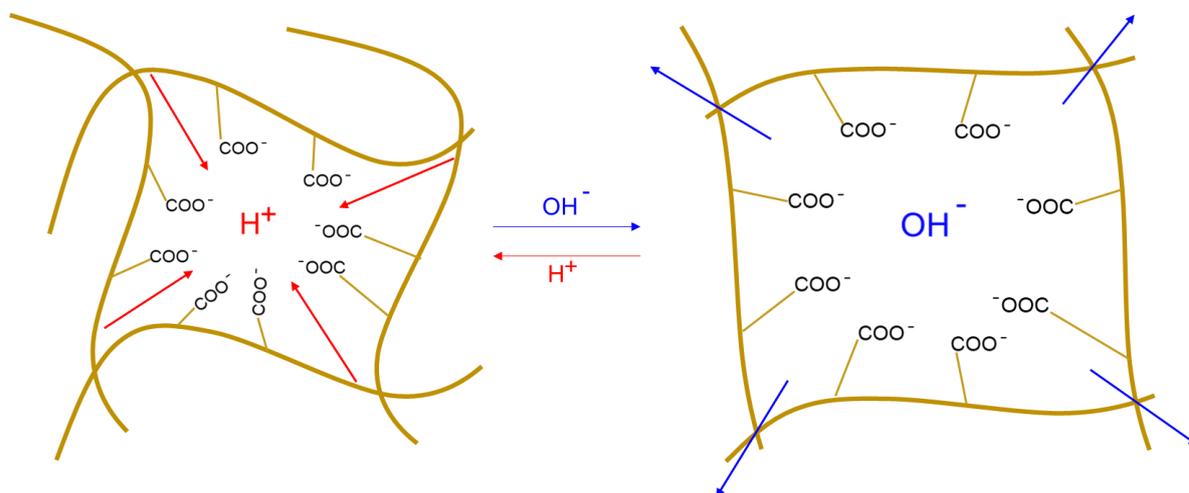
Os resultados mostram o comportamento dos sistemas em solução tampão fosfato de sódio em pH 7,0 os quais são capazes de liberar a bromelina e, manter certa estabilidade até 240 minutos após o início da liberação. O comportamento aqui observado é inverso ao observado no tópico 5.3.1 e se dá pela hidratação e inchaço das micropartículas, uma vez que a solução tampão pH 7,0 interage com as redes de alginato, as hidratando e, posteriormente, as degradando liberando as proteínas por inchaço e, também, por degradação das redes de alginato(KAHYA; ERIM, 2019).

Quando se observa o comportamento até 120 min, verifica-se uma maior liberação para os sistemas em que sem emprega a combinação dos aminoácidos no quais sistema LA apresenta 80% de liberação em 30 min, seguido por LAH com 72% em 60 min, AH com 67% em 90 min e LH com 49% em 90 min, enquanto os sistemas sem combinação de aminoácidos tendem a apresentar menor liberação e num maior tempo, onde a Lis apresenta 63% em 90 min, a His 52% em 120 min e a Arg 30% em 120 min.

De acordo com o subtópico 5.2.1 as bandas de interação na região de *fingerprint* são as que apresentam maior intensidade e alargamento o que sugere uma menor interação entre certos grupos na estrutura o que pode ocasionar uma maior capacidade de relaxamento das cadeias e consequente liberação proteica.

Segundo SRIAMORNSAK; THIRAWONG e KORKERD (2007) as matrizes de alginato geralmente possuem maior capacidade de inchamento em meio neutro (pH 6,8) do que em meio ácido(pH 1-3). O pKa do ácido algínico varia entre 3,4 e 4,4, dependendo do tipo de alginato e dos sais presentes na mistura anterior, as mudanças no pH influenciam a hidratação do polímero e reologia do gel de alginato, devido à interconversão de ânions carboxilato (alginato de sódio) em grupos carboxila livres (ácido algínico), conforme a concentração de íons hidrogênio aumenta. A Figura 58 mostra os processos de atração e repulsão das cadeias de ânion carboxilato frente a hidroxila (meio básico) e frente a hidrogênio (meio ácido).

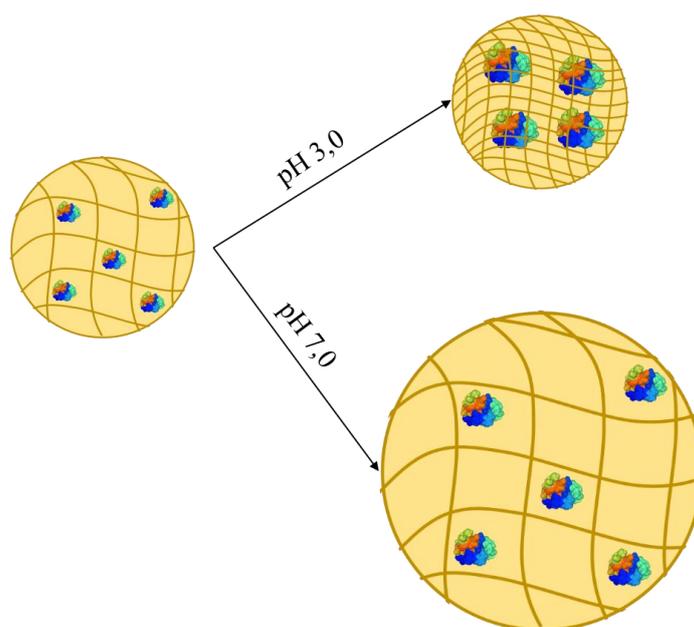
Figura 58: Mecanismo de atração e repulsão das redes de alginato nos quais as setas vermelhas indicam as forças de atração entre os ânions e o meio ácido nas redes de alginato, e as setas azuis as forças repulsivas entre os ânions e a hidroxila advinda do meio básico.



Fonte: Própria, baseado em JI et al., (2015).

Os estudos de liberação controlada são muito utilizados na avaliação primária de sistemas gastrorresistentes, a Figura 59 mostra os processos pelos quais os sistemas passaram nas liberações controladas em pH 3,0 e pH 7,0 nos quais o alginato encapsula a bromelina e forma redes suficientemente fortes para a retenção da proteína.

Figura 59: Simulação das micropartículas com bromelina em pH 3,0 e pH 7,0.

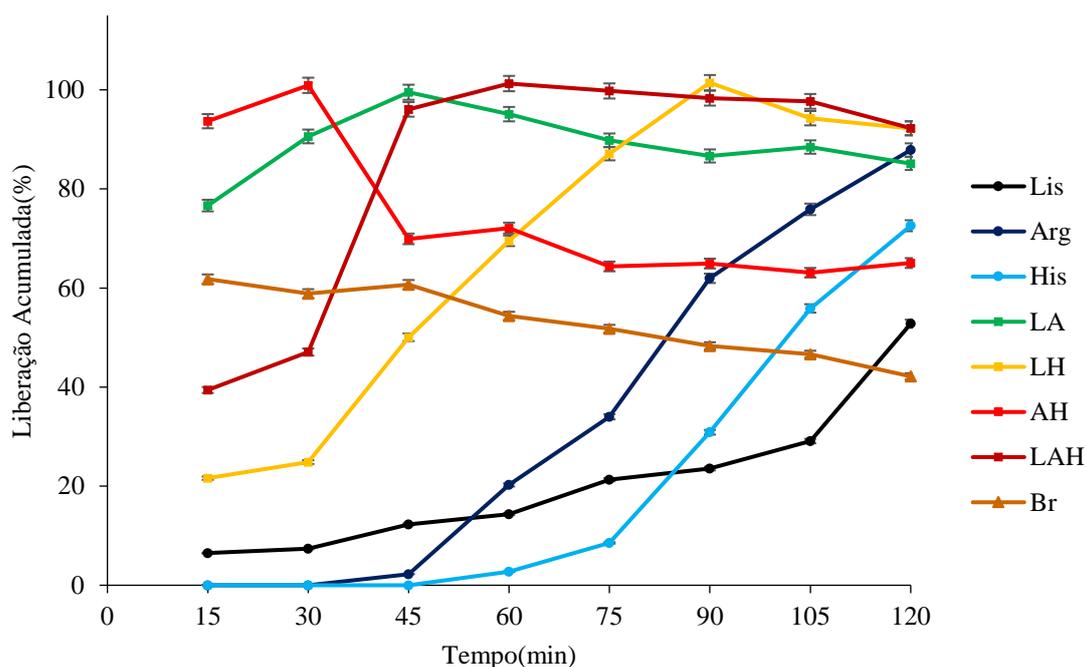


Fonte: Própria, baseado em LI; MOONEY, 2016.

5.3.3 Liberação em Solução de Fluido Gástrico - SFG

Os resultados demonstram que todos os sistemas foram capazes de liberar bromelina nos quais os sistemas AH, LA, LAH e LH liberaram 100% das proteínas em menos de 120 minutos, enquanto os sistemas Lis, Arg, His parecem interagir de forma mais efetiva com as redes de alginato diminuindo a quantidade de liberação atingindo 87,7% para o sistema Arg em 120 minutos, conforme apresentado na Figura 60.

Figura 60: Estudo de Liberação controlada em SFG.

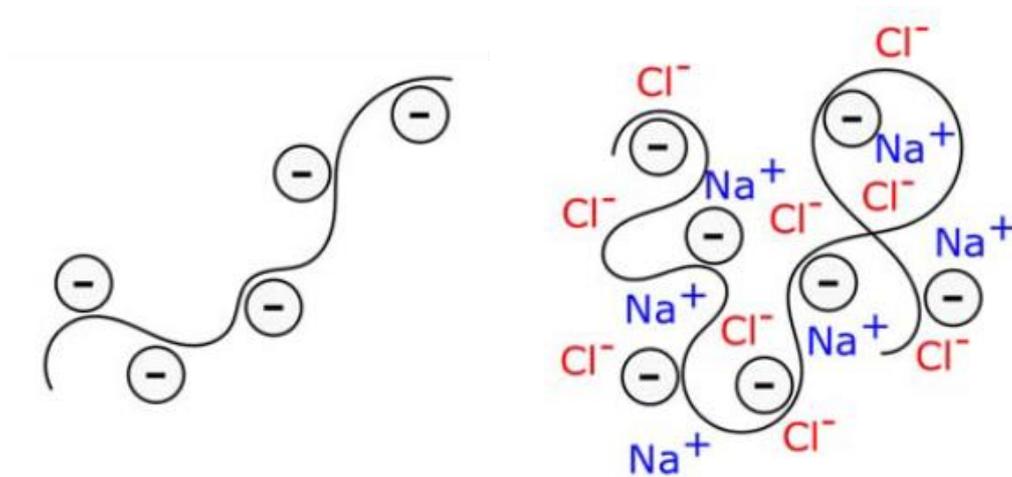


Ao se avaliar a liberação controlada dos sistemas em SFG comparado aos sistemas em pH 3,0 nota-se uma grande diferença, uma vez que a SFG contém sais como cloreto de sódio (NaCl) e bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e alguns outros, conforme subtópico 4.4.3, os quais interagem com as redes de alginato e a água gerando a hidratação das micropartículas que por sua vez incham e absorvem grandes quantidade de água (DODERO et al., 2020). Além disso, a combinação entre os aminoácidos parece contribuir para a hidratação das micropartículas.

Ainda na Figura 61, verifica-se que a bromelina continua estável por certo tempo nos sistemas formados mesmo após completa hidratação, como visto nos sistemas AH, LA e LAH, já o sistema Br, composto somente por bromelina, atinge 42,1% após 120 minutos o que corrobora o aumento da biodisponibilidade em fluido intestinal, já que os sistemas são capazes de estabilizar e transportar bromelina até o fluido intestinal.

Ao se analisar os resultados obtidos no subtópico 5.3.1 fica claro o comportamento das partículas não é resultado somente da interação por pH o que é corroborado por DODERO et al.(2020) os quais estudaram o comportamento reológico das matrizes de alginato frente a diferentes concentrações de cloreto de sódio e, encontraram que as redes de alginato interagem como polímeros semiflexíveis assumindo uma conformação de bobina aleatória estendida conforme a concentração salina ou força iônica do meio. A Figura 61 mostra o formato das redes de alginato quando em meio salino.

Figura 61: Forma das cadeias de alginato, à esquerda cadeias em solução tampão e, à direita as cadeias em solução salina.



Fonte: DODERO et al., (2020).

Portanto, somente o estudo em sistemas de digestão que consideram os níveis de sais são confiáveis para a avaliação da estabilidade de micropartículas que utilizam alginato de sódio como biomaterial para sistemas de liberação controlada.

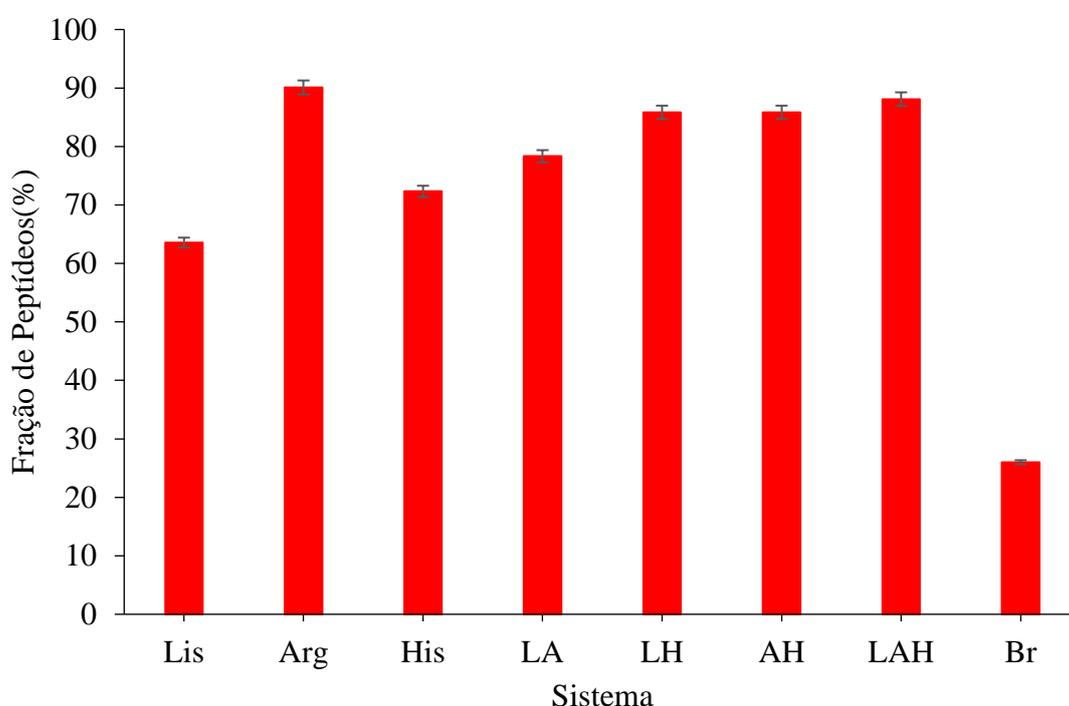
5.4 ANÁLISES DE DIGESTIBILIDADE

5.4.1 Análises de Digestibilidade Solução de Fluido Gástrico - SFG

5.4.1.1 Análises de Proteínas Após Digestão em Fluido Gástrico

Os resultados obtidos indicam que todos os sistemas apresentaram uma maior quantidade de peptídeos de bromelina quando comparados à bromelina livre. A quantidade de proteína livre no sistema Arg apresentou liberação de 90,1%, enquanto o sistema Lis apresentou a menor fração de proteínas livres em torno de 63,5%, conforme apresentado na Figura 62.

Figura 62: Fração de peptídeos ao final da digestão em solução de fluido gástrico.



Através da Figura 62 é possível identificar o comportamento dos sistemas em relação a bromelina livre dos quais a ordem de fração de peptídeos livre é Arg > LAH > LH = AH > LA > His > Lis >> Br. Ao se avaliar a liberação controlada no subtópico 5.3.3 e a Figura 64, fica fácil identificar que o perfil observado na Figura 63 representa a quantidade de proteínas disponíveis ao final do SFG para serem admitidas ao fluido intestinal (SFI) e, que a combinação de alginato e aminoácidos leva a a maior estabilidade da bromelina, uma vez que ela é estabilizada pelos sistemas.

As Tabelas 8 e 9 apresentam os valores dos efeitos, erros e significância estatística para os modelos empregados.

Tabela 8: Valores dos efeitos e erros da Soma Quadrática, Graus de Liberdade e Média Quadrática para os modelos avaliados.

Modelo	Efeito Soma Quadrática	Efeito Graus de Liberdade	Efeito Média Quadrática	Erro Soma Quadrática	Erro Graus de Liberdade	Erro Média Quadrática
Linear	281,7632	2	140,8816	375,4255	6	62,57091
Quadrático	366,2750	3	122,0917	9,1505	3	3,05017
Cúbico Especial	4,5162	1	4,5162	4,6343	2	2,31713
Total Ajustado	657,1887	8	82,1486			

Tabela 9: Valores de significância estatística p e regressão para os modelos calculados.

Modelo	F	p	R ²	R ² Ajustado
Linear	2,25155	0,186424	0,428740	0,238320
Quadrático	40,02785	0,006413	0,986076	0,962870
Cúbico Especial	1,94906	0,297468	0,992948	0,971793

Através das Tabela 8 é possível verificar que o modelo Cúbico Especial é o modelo que apresenta os menores valores de erro para a Soma Quadrática e Média Quadrática.

A Tabela 9, no entanto, apresenta os valores de p e coeficiente de regressão linear para os modelos estudados. Verifica-se que tanto o modelo Quadrático quanto o modelo Cúbico Especial apresentam valores de coeficiente de regressão superior a 0,9, entretanto, apenas o modelo Quadrático apresenta valor de p estatisticamente significativo.

A Tabela 10 apresenta as estimativas dos efeitos significativos ($p < 0,05$) para a quantidade de peptídeos de bromelina através da aplicação do modelo cúbico especial.

Tabela 10: Sumários dos efeitos para a quantidade de proteínas no fim do tempo em SFG.

Fator	Coefficientes Estimados	t-valor	p-valor	Intervalo de Confiança -95%	Intervalo de Confiança +95%
(A)L-lisina(%)	63,32294	36,49229	0,000045	57,8006	68,8453
(B)L-arginina(%)	89,84946	51,77923	0,000016	84,3272	95,3718
(C)L-histidina(%)	72,08170	41,53986	0,000031	66,5594	77,6040
AB	10,81851	1,42593	0,249135	-13,3266	34,9636
AC	76,38408	10,06779	0,002087	52,2389	100,5292
BC	23,33102	3,07514	0,054343	-0,8141	47,4762

A partir da Tabela 10 é possível obter a equação que descreve a quantidade de peptídeos após digestão em solução de fluido gástrico, conforme Equação 10.

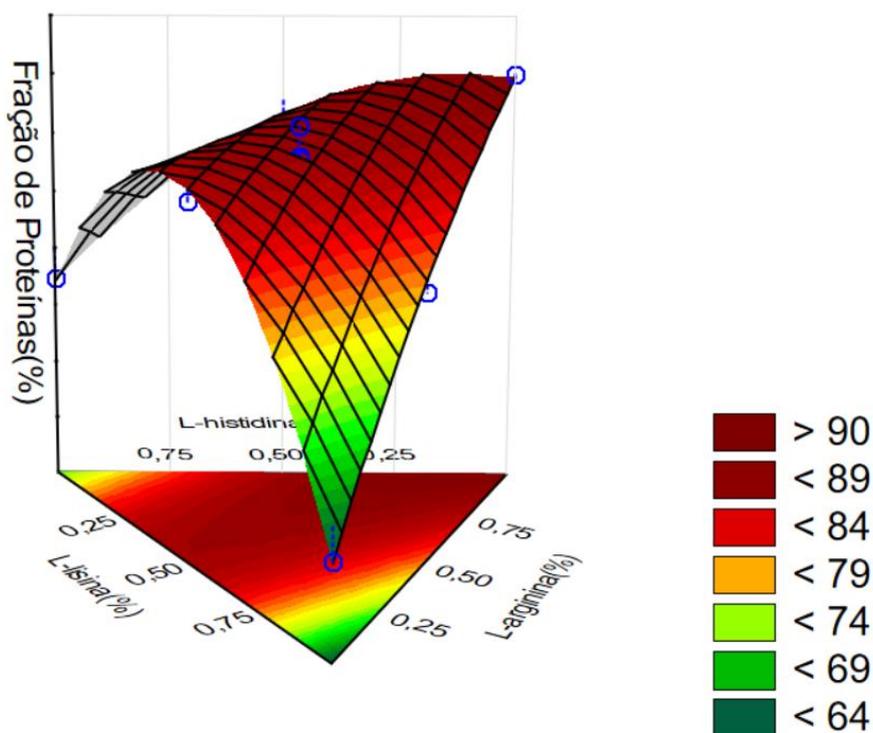
Equação 10:

$$\text{Fração de peptídeos (\%)} = 63,323*(A) + 89,8495*(B) + 72,0817*(C) + 10,8185*(A)*(B) + 76,3841*(A)*(C) + 23,331*(B)*(C)$$

O sumário dos efeitos evidencia que todos os aminoácidos empregados influenciam de maneira positiva na quantidade de peptídeos de bromelina. No entanto, ao se avaliar as combinações entre os aminoácidos é possível observar que apenas a interação entre l-lisina e l-histidina é significativa ($p < 0,005$).

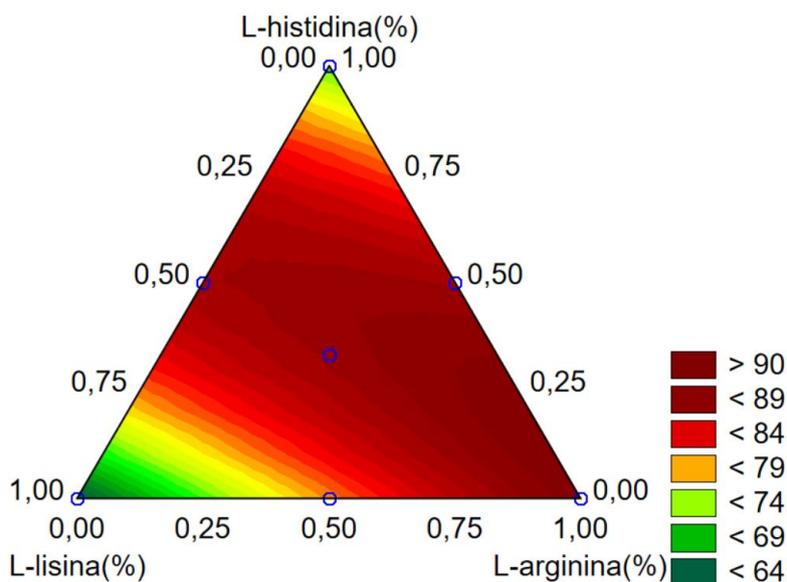
A Figura 63 apresenta a superfície de resposta para os sistemas estudados, é possível verificar se apresenta regiões de otimização de resposta, onde tanto a l-arginina quanto a combinação entre os aminoácidos gera uma maior quantidade de liberação de proteínas o que indica que os aminoácidos e a l-arginina diminuem o equilíbrio entre as redes de alginato e bromelina.

Figura 63: Superfície de nível para os sistemas estudados.



A curva de nível na Figura 64 apresenta o comportamento das respostas onde é possível verificar que a l-arginina apresenta região de máximo com liberação superior a 90% para a quantidade de peptídeos seguido pela combinação dos três aminoácidos estudados com liberação superior a 84%.

Figura 64: Curva de nível para os sistemas estudados.



Ao se observar as Figuras 63 e 64, é possível compreender que os aminoácidos sem combinação apresentam valores substancialmente significativos na fração de peptídeos de bromelina livre, como também, que a combinação entre l-lisina e l-histidina também possui certa quantidade de significância, já a combinação dos demais aminoácidos apresenta efeitos não significativos.

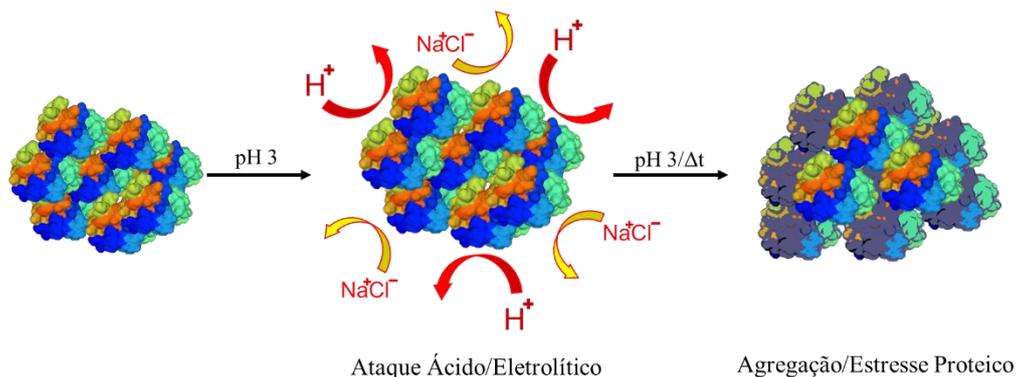
Os efeitos de combinação podem ser associados à estereocomplexação da rede de alginato à bromelina, no entanto, apenas a estereocomplexação não é suficiente para explicar os efeitos quando combinados, uma vez que os processos de digestão são dinâmicos o suficiente e levam a interações que dificultam processos de reação de sais e grupos H^+ para no interior das microcápsulas, já que o alginato apresenta uma rede complexa e altamente amorfa.

Ao se avaliar as quantidades de proteínas dos sistemas em relação à bromelina livre, observa-se que a bromelina livre apresenta apenas 26% da quantidade inicial de proteínas o que demonstra que os sistemas são capazes de estabilizar as estruturas da bromelina, tornando-a menos susceptível a desnaturação e degradação em solução de

fluido gástrico. Dessa forma, a capacidade do alginato de em estabilizar cargas no meio reativo em que está acondicionado, faz dele um bom material para o aumento da estabilidade e equilíbrio de cargas o que gera efeito tamponante para os bioativos em sua presença (NESAMONY, et al, 2012; KAHYA; ERIM, 2019).

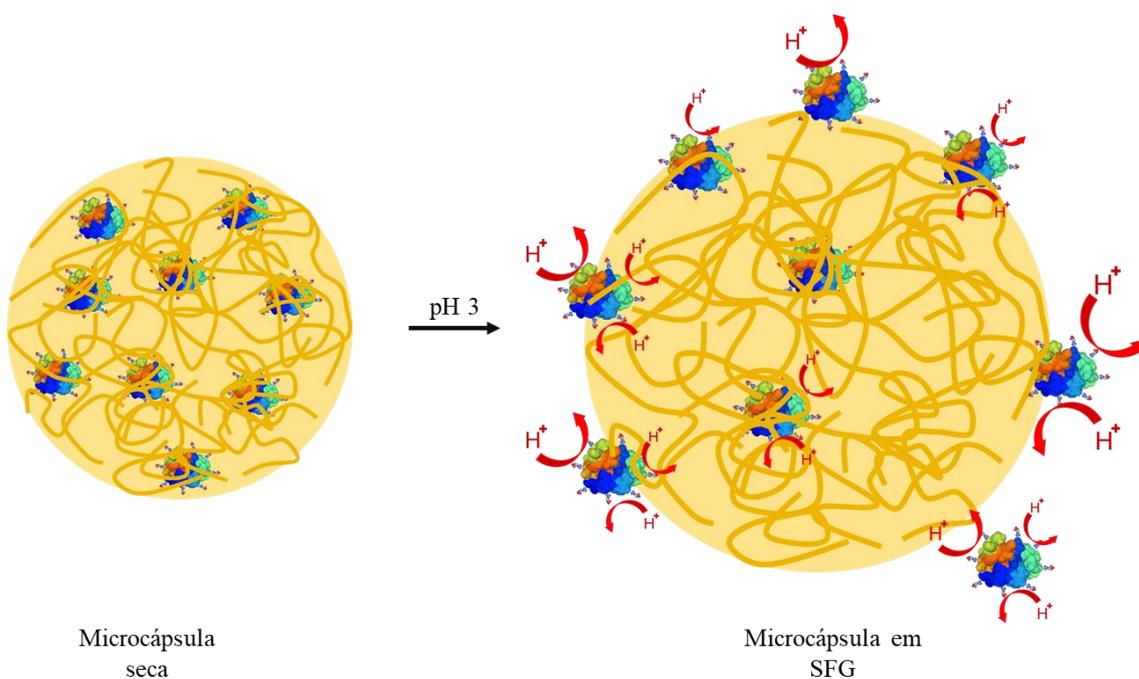
A Figura 65 apresenta ilustra a degradação da bromelina ao decorrer do tempo ao ser exposta à SFG e na Figura 66 o sistema 2 o qual é combina alginato e l-arginina.

Figura 65: Processo de desnaturação e agregação da bromelina ao ser exposta a SFG.



Fonte: Própria, baseado em VAN DER SMAN et al., (2020).

Figura 66: Processo de hidratação e difusão de SFG nas microcápsulas, neste caso, para o sistema com l-arginina o qual é capaz de interagir fortemente com a bromelina e evitar processos de agregação.



Fonte: Própria, baseado em LIN et al., (2009) e MIYATAKE et al., (2016).

Devido a capacidade de alguns aminoácidos como a l-arginina em interagir com as proteínas e evitar a formação de agregados, os sistemas com l-arginina e combinações apresentam as maiores quantidade de bromelina(%), uma vez que as proteínas estão mais dispersas em rede o que facilita no processo de difusão e quantificação das mesmas (LANGE; RUDOLPH, 2009; MIYATAKE et al., 2016; KIM et al., 2016).

Quando se avaliam os processos de liberação controlada no subtópico 5.3.3, aos resultados obtidos neste tópico, é possível compreender que houve a hidratação de todos os sistemas, no entanto, processos de degradação proteica foram mais eficientes em sistemas com combinação de dois ou mais aminoácidos e, principalmente, no sistema Arg composto somente por l-arginina. Esses resultados podem ser associados a uma menor capacidade de retenção e equilíbrio das redes de alginato, uma vez que os aminoácidos podem atuar como sais e interagir de forma a aumentar a difusão entre as redes, além disso, a l-arginina possui papel fundamental na desagregação proteica com consequente maior exposição das proteínas ao meio SFG (ZHAO, 2005; MIYATAKE et al., 2016).

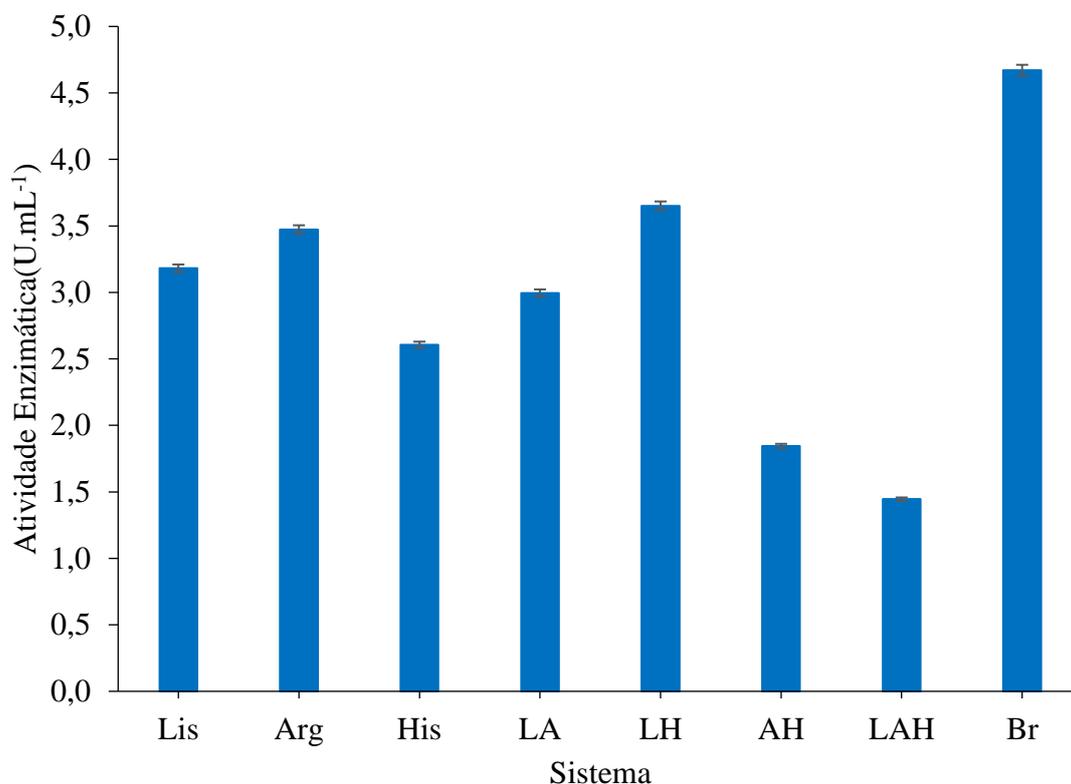
Dessa forma, a interação entre os aminoácidos de forma individual e combinada se apresenta de forma diferente para cada sistema estudado, sendo suas correlações apresentadas no modelo quadrático que demonstram as fortes correlações entre as quantidades de proteínas e a aplicação individual dos aminoácidos.

O uso de alginato de sódio combinado a aminoácidos é incomum, principalmente quando se fala em processos de microencapsulamento, já que os aminoácidos não geram interações suficientemente fortes para a geração de um novo tipo de material. No entanto, os resultados demonstram que as interações entre as cadeias de alginato, aminoácido e bromelina são suficientes para o aumento da quantidade proteica ao final da SFG, quando comparado a bromelina livre.

5.4.1.2 Análises de Atividade Enzimática após Digestão em Fluido Gástrico

Os resultados obtidos mostram que todos os sistemas apresentaram uma menor atividade enzimática (U.mL^{-1}) quando comparados à bromelina livre. A maior atividade fora do sistema LH o qual apresentou atividade de $3,7 \text{ U.mL}^{-1}$ enquanto que o sistema AH apresentou $1,8 \text{ U.mL}^{-1}$, conforme apresentado na Figura 67.

Figura 67: Atividade enzimática ao final da digestão em SFG para os sistemas em estudo.



Ao se comparar os resultados dos sistemas à bromelina livre, verifica-se uma possível imobilização da bromelina nas redes de alginato, isto é, microencapsulada nos sistemas sintetizados, já que, como apresentado no subtópico 5.3.1.1, a bromelina se apresenta disponível nos sistemas Arg e LAH e, não parece exercer sua total atividade quando comparada a bromelina livre, havendo degradação nos sistemas Arg e LAH ou não disponíveis o suficiente para processos de proteolíticos.

As Tabelas 11 e 12 apresentam os valores dos efeitos, erros e significância estatística para os modelos empregados.

Tabela 11: Valores dos efeitos e erros da Soma Quadrática, Graus de Liberdade e Média Quadrática para os modelos avaliados.

Modelo	Efeito Soma Quadrática	Efeito Graus de Liberdade	Efeito Média Quadrática	Erro Soma Quadrática	Erro Graus de Liberdade	Erro Média Quadrática
Linear	0,530539	2	0,26527	5,725054	6	0,954176
Quadrático	4,158354	3	1,386118	1,5667	3	0,522233
Cúbico Especial	1,514648	1	1,514648	0,052052	2	0,026026
Total Ajustado	6,255593	8	0,781949			

Tabela 12: Valores de significância estatística p e regressão para os modelos calculados.

Modelo	F	p	R ²	R ² Ajustado
Linear	0,27801	0,766537	0,08481	0,0000
Quadrático	2,65421	0,221981	0,749552	0,332139
Cúbico Especial	58,19761	0,016752	0,991679	0,966717

Através das Tabelas 11 e 12 é possível verificar que o modelo Cúbico Especial apresenta os menores valores de erro para a Soma Quadrática e Média Quadrática, como também, é o único modelo que apresenta significância estatística com valor de $p = 0,016$.

O modelo cúbico especial apresenta valor de regressão (R^2) superior a 0,99 o que indica que para as variáveis estudadas os fatores possuem intercorrelação e seu comportamento é melhor descrito por este modelo. A Tabela 13 apresenta as estimativas dos efeitos significativos ($p < 0,05$) dentro do modelo cúbico especial para a recuperação de sólidos totais (%).

Tabela 13: Sumário dos efeitos para a atividade enzimática (U/mL), após digestão em solução de fluido gástrico.

Fator	Coefficientes Estimados	t-valor	p-valor	Intervalo de Confiança -95%	Intervalo de Confiança +95%
(A)L-lisina(%)	3,1817	19,72217	0,002561	2,4876	3,8758
(B)L-arginina(%)	3,4737	21,53194	0,00215	2,7795	4,1678
(C)L-histidina(%)	2,6062	16,15509	0,00381	1,9121	3,3004
AB	-1,3286	-1,68112	0,234761	-4,7292	2,0719
AC	3,0296	3,83338	0,061809	-0,3709	6,4302
BC	-4,7814	-6,04988	0,026251	-8,1819	-1,3809
ABC	-32,608	-7,62874	0,016752	-50,9991	-14,2169

A partir do Quadro 25 é possível obter a equação que descreve a atividade enzimática ($U \cdot mL^{-1}$) após digestão em solução de fluido gástrico, conforme Equação 11.

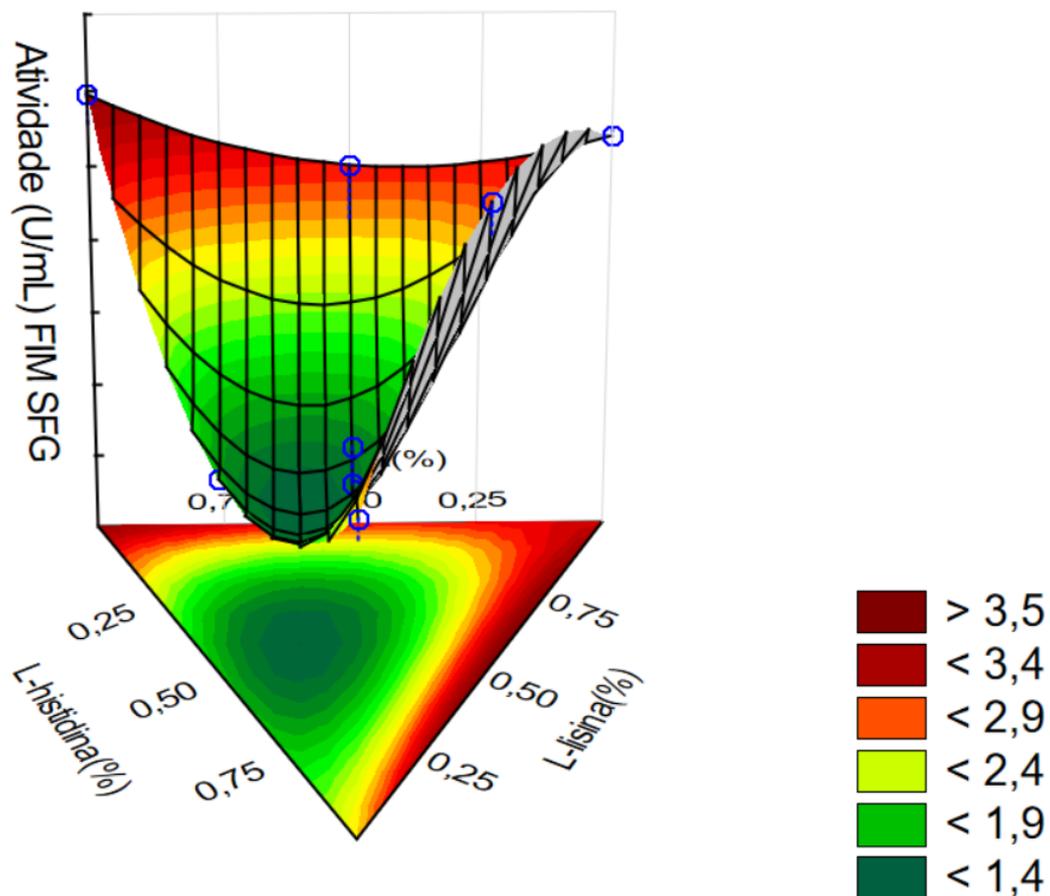
Equação 11:

$$\text{Atividade Enzimática}(U \cdot mL^{-1}) = 3,1817*(A) + 3,7437*(B) + 2,6062*(C) - 1,3286*(A)*(B) + 3,0296*(A)*(C) - 4,7814*(B)*(C) - 32,608*(A)*(B)*(C)$$

O sumário dos efeitos evidencia que todos os aminoácidos empregados influenciam de maneira positiva na atividade enzimática (U.mL^{-1}). No entanto, ao se avaliar as combinações entre os aminoácidos é possível observar efeitos de interação menos significativos ($p < 0,005$) se comparado aos efeitos dos aminoácidos individuais, além disso, quando combinados, os aminoácidos apresentam efeito substancialmente negativo.

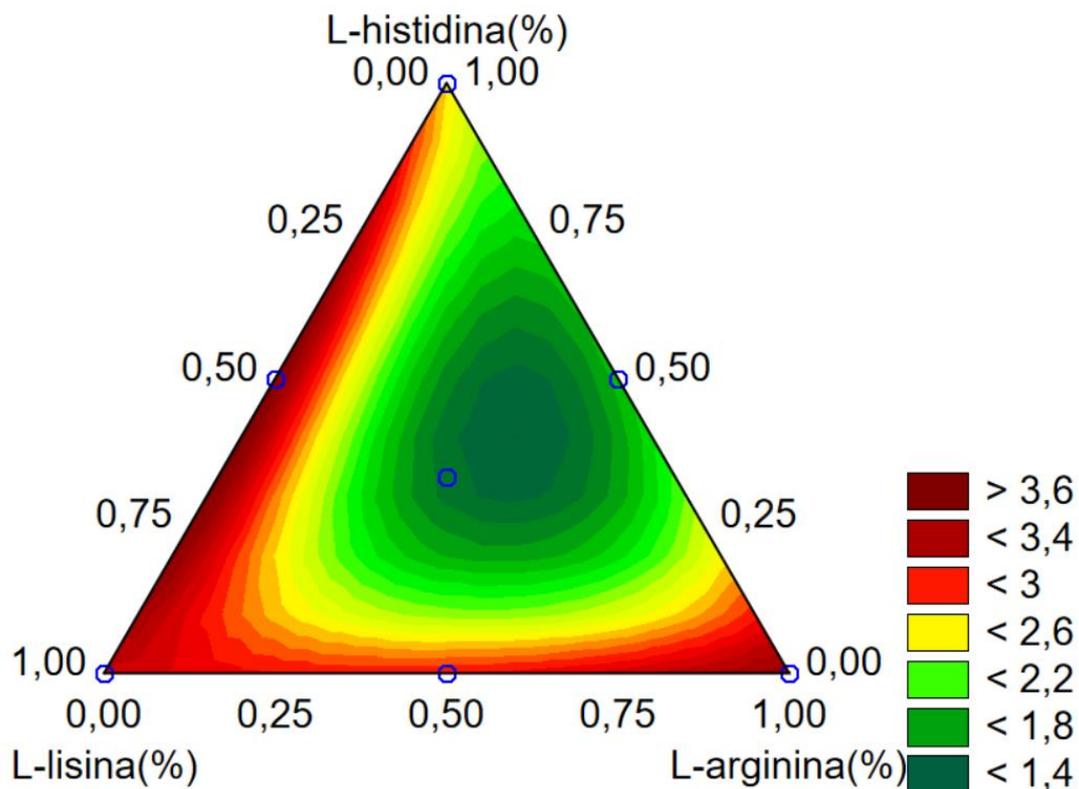
A Figura 68 apresenta a superfície de resposta para os sistemas estudados, é possível verificar que se apresenta região de mínimo de resposta, onde há a redução da atividade enzimática, uma vez que para a bromelina livre a atividade se apresenta em $4,7 \text{ U.mL}^{-1}$.

Figura 68: Superfície de nível para os sistemas estudados.



A curva de nível na Figura 69 apresenta o comportamento das respostas onde é possível verificar de maneira mais clara a composição do sistema de menor atividade, neste caso, da combinação entre os três aminoácidos, principalmente L-histidina e L-arginina.

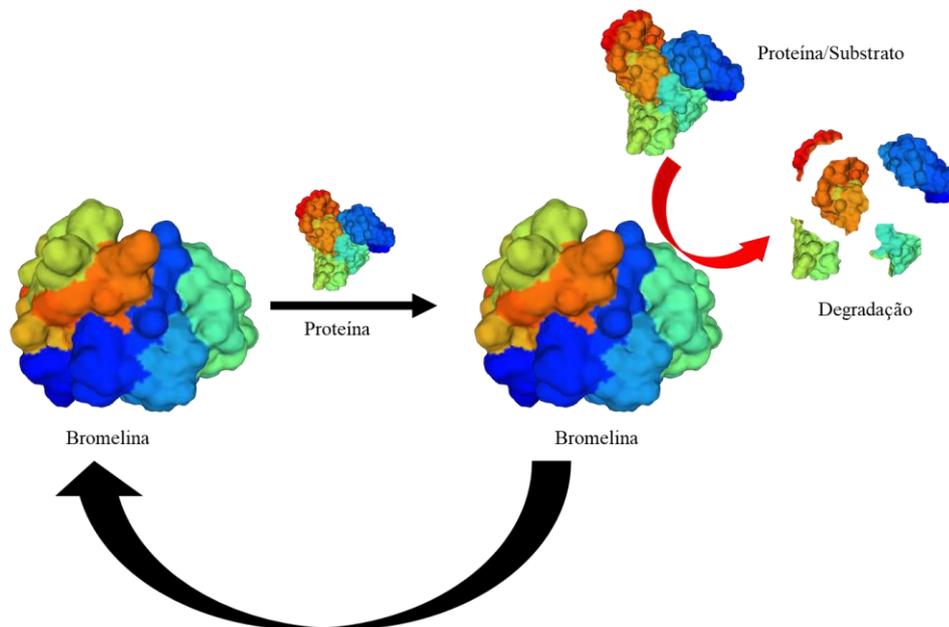
Figura 69: Curva de nível para os sistemas estudados.



A combinação entre os aminoácidos afeta de maneira negativa a quantidade de atividade resultante, com exceção da combinação entre L-lisina e L-histidina as quais embora não apresentem valores significativos estatisticamente geram valor positivo na atividade enzimática resultante.

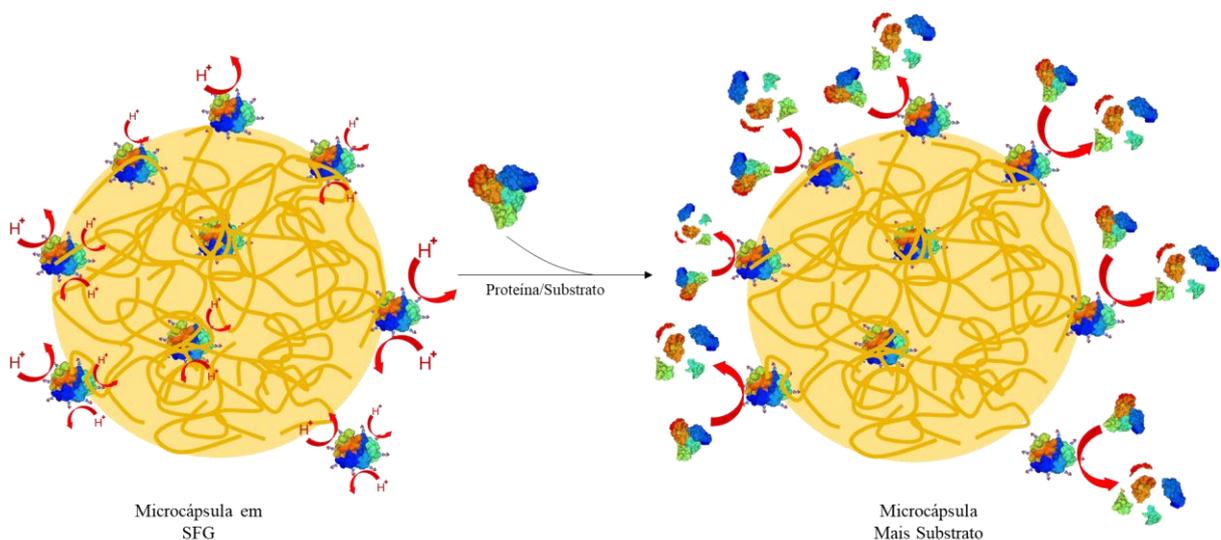
Os efeitos de combinação podem ser associados à estereocomplexação da rede de alginato à bromelina, as quais parecem imobilizar a bromelina nos sistemas sintetizados e quando utilizados sem combinação apresentam uma melhor estabilização da bromelina nas redes. A Figura 70 ilustra o processo proteolítico da bromelina livre e, a Figura 71, apresenta o processo quando a bromelina se apresenta nas microcápsulas dos sistemas estudados.

Figura 70: Processo proteolítico em SFG para a bromelina livre.



Fonte: Própria, baseado em ARSHAD et al., (2014).

Figura 71: Processo proteolítico em SFG para a bromelina immobilizada nas redes de alginato.



Fonte: Própria, baseado em LIN et al., (2009) e LIU et al., (2016).

Uma das vantagens em se aplicar sistemas de liberação controlada por alginato de sódio é sua capacidade de inibição da pepsina, uma forte enzima proteolítica presente no fluido gástrico. Estudos *in vitro* realizados por STRUGALA et al., (2005) demonstraram que a inibição da atividade enzimática da pepsina pode chegar a até 53,9%

os quais são corroborados por estudos *in vivo* realizados por CHATER et al., (2015) que demonstraram a redução de atividade da pepsina.

Segundo os estudos de STRUGALA et al., (2005), um possível mecanismo de interação se dá pela inativação de sítios ativos ou pela inibição de substratos nos sítios ativos pelos blocos M da estrutura do alginato o mesmo pode ocorrer com a bromelina, já que possui atividade proteolítica e, assim como a pepsina, apresenta-se como proteína com carga positiva sendo seu pI em pH 9,5.

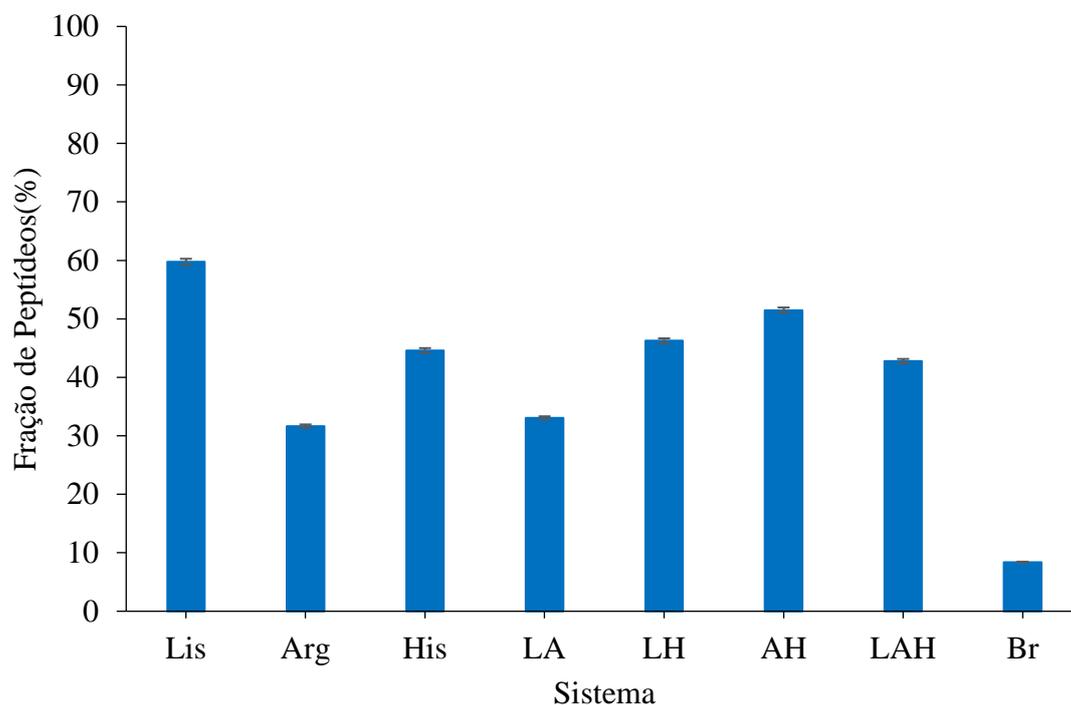
Portanto, como visto no gráfico da Figura 68 e ilustrado pela Figura 72, embora as redes de alginato combinado aos aminoácidos não sejam suficientes para a retenção das proteínas nos microcápsulas, há uma pequena inibição da atividade enzimática ao final do SFG nos sistemas estudados quando comparados a bromelina livre, a qual varia de 2 a 3,7 U.mL⁻¹ enquanto a bromelina livre apresenta 4,7 U.mL⁻¹. Quando livre, a bromelina consegue reagir de forma mais eficiente com o substrato, enquanto que nas redes de alginato, na presença de pH 3,0, a atividade é diminuída em função da presença e do enrijecimento das redes de alginato, além de processos difusivos do substrato às bromelinas disponíveis.

5.4.2 Análises de Digestibilidade Solução de Fluido Intestinal – SFG + SFI

5.4.2.1 Análises de Proteínas após Digestão em SFG seguido por SFI

Os resultados obtidos mostram que todos os sistemas apresentaram maior quantidade de fração de bromelina (%) quando comparados à bromelina livre. A maior quantidade se deu pelo sistema Lis, alcançando 59,7% de peptídeos de bromelina enquanto que a menor se deu pelo sistema Arg com 31,7% dos mesmos peptídeos, ao passo que a bromelina livre (Br) apresentou 8,4%, conforme apresentado na figura 72.

Figura 72: Fração proteica livre ao final da digestão em SFG seguida por SFI.



Ao se comparar os resultados dos sistemas à bromelina livre, verifica-se uma maior fração de peptídeos livres, isto é, os processos de microencapsulamento e formação dos sistemas são capazes de estabilizar os peptídeos de bromelina mesmo após liberação em fluido gástrico seguido por fluido intestinal nos quais a quantidade de peptídeos se dá na ordem Lis > AH > LH > His > LAH > LA > Arg >> Br.

As Tabelas 14 e 15 apresentam os valores dos efeitos, erros e significância estatística para os modelos empregados.

Tabela 14: Valores dos efeitos e erros da Soma Quadrática, Graus de Liberdade e Média Quadrática para os modelos avaliados.

Modelo	Efeito Soma Quadrática	Efeito Graus de Liberdade	Efeito Média Quadrática	Erro Soma Quadrática	Erro Graus de Liberdade	Erro Média Quadrática
Linear	284,1012	2	142,0506	304,5473	6	50,75789
Quadrático	301,8583	3	100,6194	2,6891	3	0,89636
Cúbico Especial	0,0622	1	0,0622	2,6269	2	1,31346
Total Ajustado	588,6485	8	73,5811			

Tabela 15: Valores de significância estatística p e regressão para os modelos calculados.

Modelo	F	p	R ²	R ² Ajustado
Linear	2,7986	0,138483	0,482633	0,310177
Quadrático	112,2528	0,001405	0,995432	0,987818
Cúbico Especial	0,0473	0,847943	0,995537	0,982149

Através das Tabelas 14 e 15 é possível verificar que o modelo Cúbico Especial apresenta os menores valores de erro para a Soma Quadrática e Média Quadrática, no entanto, quando se verifica o valor de p é possível verificar que o modelo Quadrático é o único que apresenta significância estatística, com valor de p = 0,001405.

A Tabela 16 apresenta as estimativas dos efeitos significativos (p<0,05) para o modelo quadrático.

Tabela 16: Sumário dos efeitos para a quantidade de peptídeos de bromelina livre, após digestão em solução de fluido gástrico seguido por fluido intestinal.

Fator	Coefficientes Estimados	t-valor	p-valor	Intervalo de Confiança -95%	Intervalo de Confiança +95%
(A)L-lisina(%)	59,7630	63,5319	0,000009	56,7693	62,7566
(B)L-arginina(%)	31,6849	33,6831	0,000058	28,6912	34,6785
(C)L-histidina(%)	44,6228	47,4369	0,000021	41,6292	47,6165
AB	-51,2153	- 12,4523	0,001116	-64,3044	-38,1262
AC	-24,2383	-5,8932	0,009753	-37,3274	-11,1492
BC	52,8387	12,8471	0,001018	39,7496	65,9278

A partir da Tabela 16 é possível obter a equação que descreve a fração de peptídeos (%) após os processos de digestão, conforme Equação 12.

Equação 12:

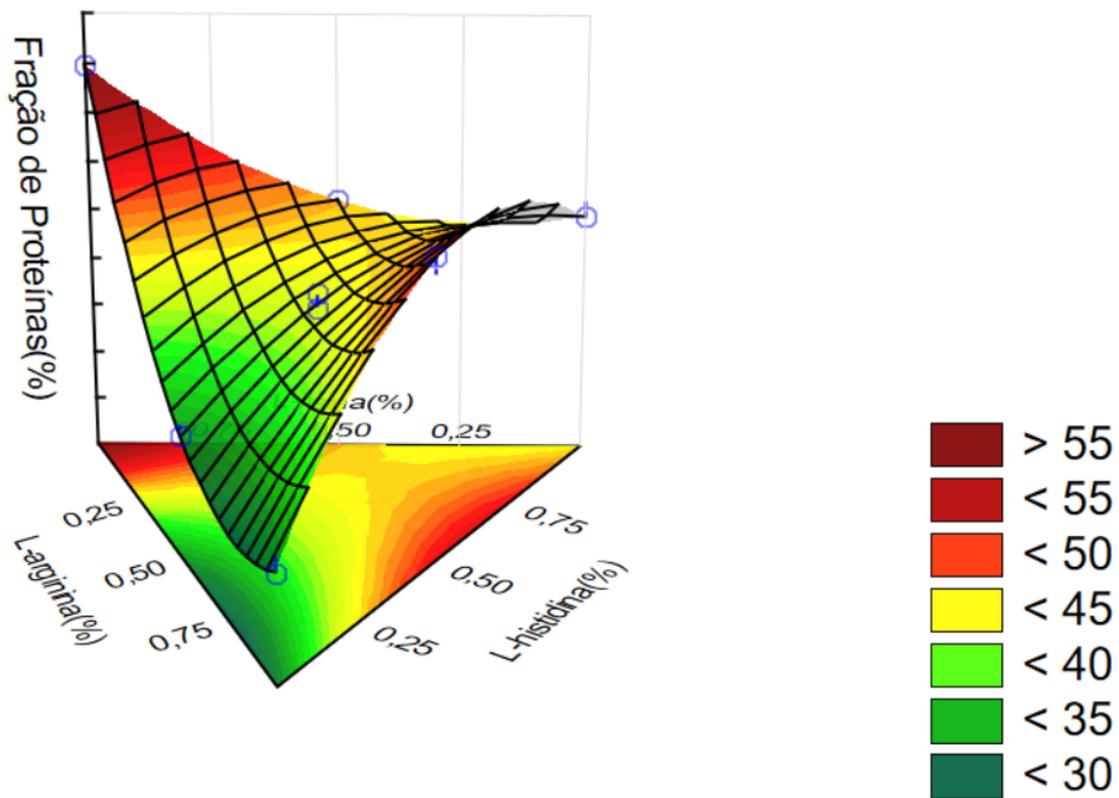
$$\text{Fração de peptídeos (\%)} = 59,763*(A) + 31,6849*(B) + 44,6228*(C) - 51,215*(A)*(B) - 24,2383*(A)*(C) + 52,839*(B)*(C)$$

O sumário dos efeitos evidencia que todos os aminoácidos empregados influenciam de maneira positiva na quantidade peptídeos (%), entretanto, a combinação

entre aminoácidos apresenta efeitos negativos com exceção da combinação entre l-arginina e l-histidina.

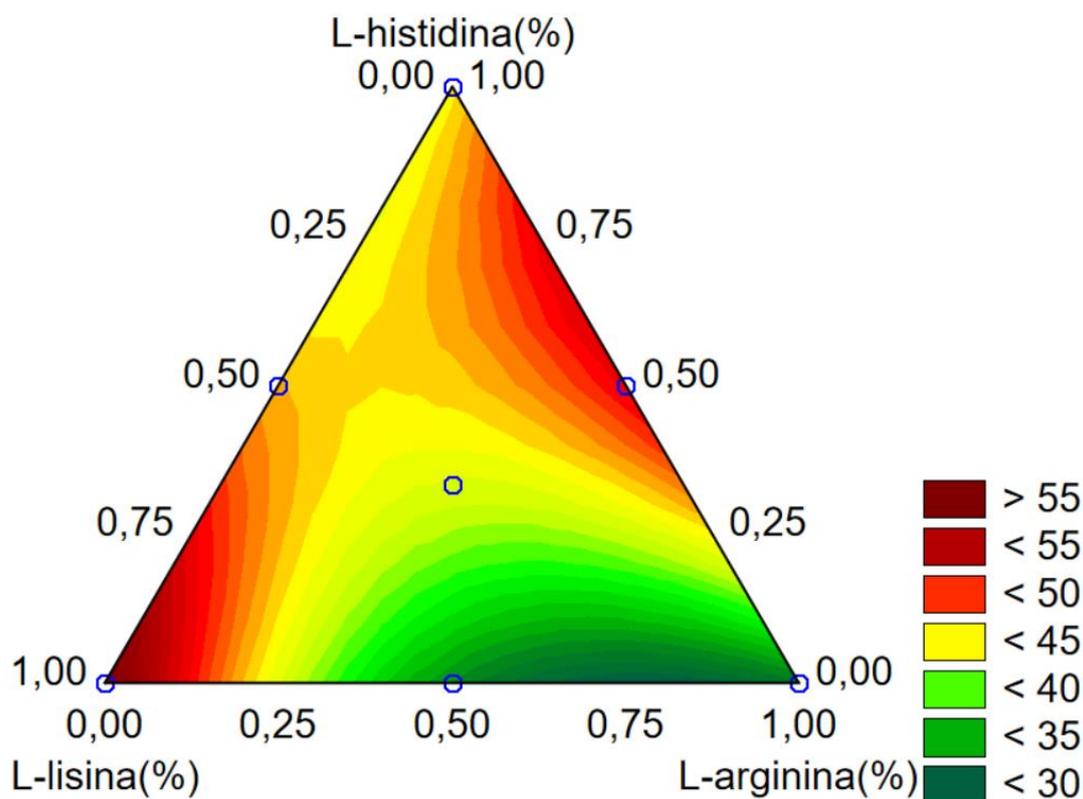
A Figura 73 apresenta a superfície de resposta para os sistemas estudados, é possível verificar que se apresentam duas regiões de máximo de resposta, a primeira onde se concentra a l-lisina e, a segunda onde se combinam l-histidina e l-arginina onde a l-histidina influencia de maneira positiva na fração de proteínas.

Figura 73: Superfície de nível para os sistemas analisados.



A Figura 74 apresenta a curva de nível para os sistemas estudados, na qual é possível observar com maior clareza regiões de máximo e mínimo. A região com maior composição de l-lisina apresenta a maior taxa de peptídeos atingindo mais de 55%, enquanto que a região de combinação entre l-lisina e l-arginina na proporção de 0,75:0,25 apresenta valores inferiores a 30% de peptídeos livres.

Figura 74: Curva de nível para os sistemas analisados.



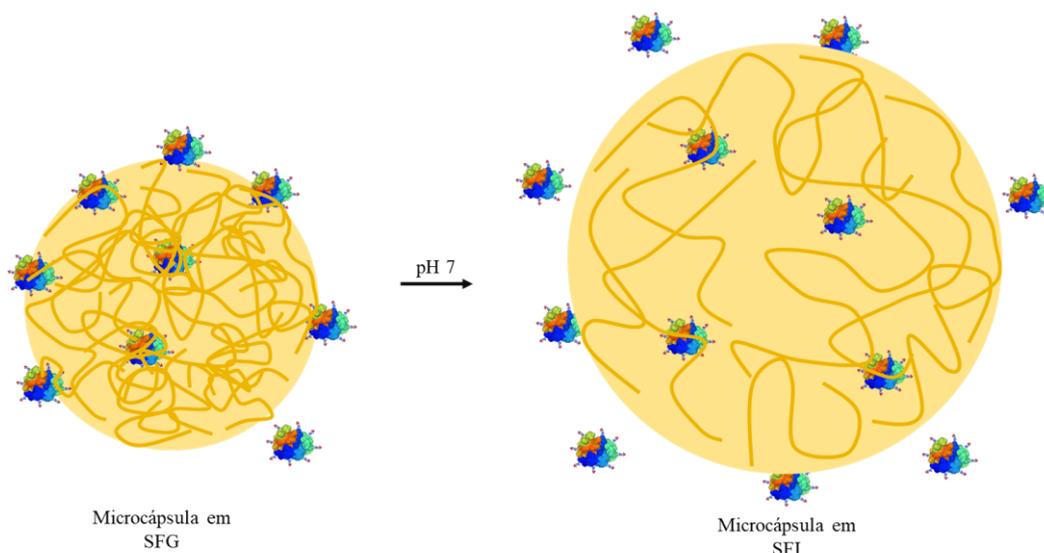
Quando se avalia o gráfico da Figura 72 e se comparada a Figura 74, observa-se que a l-lisina apresenta uma forte interação com a bromelina e que o equilíbrio formado se altera quando são adicionados os demais aminoácidos. Alguns estudos, demonstram o efeito da l-lisina na estabilização de proteínas e em sistemas carregados com proteínas e bioativos dos quais são novamente confirmados no presente estudo (AJMERA; SCHERLISS, 2014; WATKINS; CHEN, 2015).

Ainda, observa-se que o sistema com l-arginina e combinações apresentaram os menores valores de proteínas o que se deve a alta capacidade da l-arginina em reduzir os agregados proteicos, no entanto, em pHs mais altos como no intestino, esta característica se inverte e induz a degradação de forma mais rápida se comparado aos demais sistemas, ainda assim, o sistema de l-arginina e combinações torna a bromelina mais estável ao processo de digestão (MIYATAKE et al., 2016; KIM et al., 2016).

Os aminoácidos apresentam mudança de carga quando adicionados a diferentes pHs, assim como o alginato, que em pHs mais elevados apresenta degradação e desequilíbrio das redes o que expõe os princípios ativos por ele carregados (AGÜERO et al., 2017). Portanto, em SFI os sistemas tendem a liberar ou aumentar a disponibilidade

das bromelinas carregadas pelas microcápsulas. A Figura 75 apresenta a mudança nas redes de alginato com posterior liberação da bromelina.

Figura 75: Alteração da forma e rompimento do equilíbrio das estruturas de alginato, com liberação das bromelinas imobilizadas em rede.



Fonte: Própria, baseado em LIU et al., (2016) e LI; MOONEY, (2016).

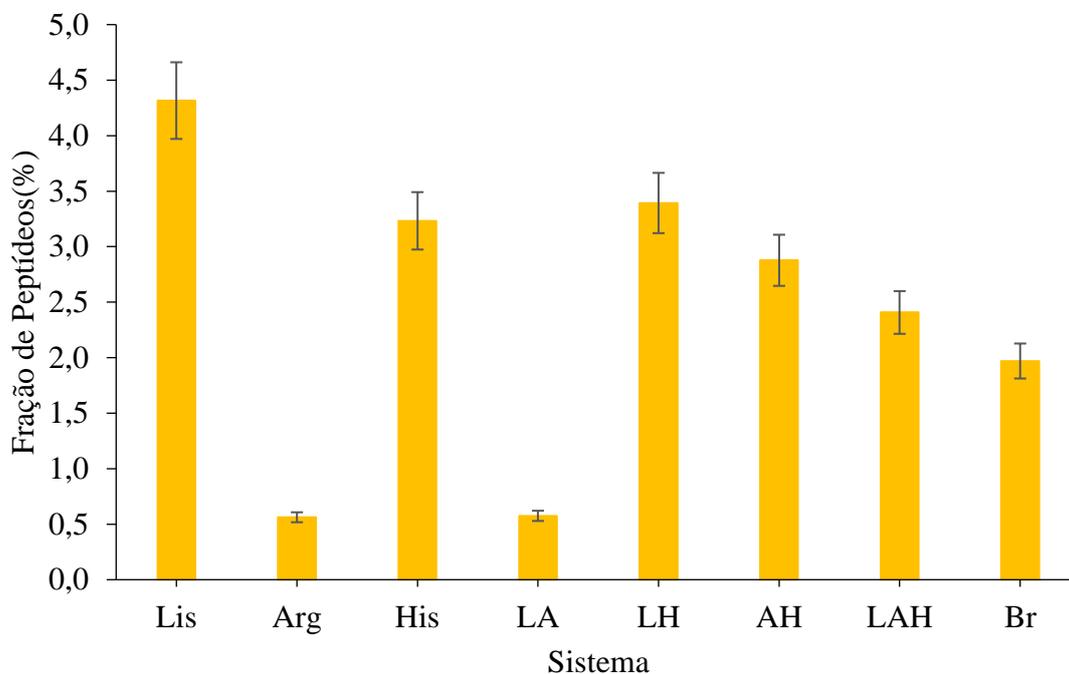
Portanto, apesar da liberação em fluido gástrico a bromelina se mantém estável até o final do processo digestivo estomacal, o mesmo não acontece após a inserção dos sistemas em fluido intestinal. Esse efeito, dá-se pela desestabilização das redes de alginato as quais são dissolvidas em pH 7,0, reduzindo a estabilidade proteica advinda do efeito tamponante das matrizes de alginato, em contrapartida, a bromelina se torna livre para reagir com substratos e formar novos equilíbrios com os aminoácidos que compunham os sistemas (JI et al., 2015; DODERO et al., 2020).

5.4.2.2 Análises de Atividade Enzimática após Digestão em SFG por SFI

Os resultados obtidos mostram que todos os sistemas Arg e LA não geraram sistemas estáveis e, quando comparados à bromelina livre, exerceram efeitos negativos na estabilização da atividade enzimática da bromelina. Contudo, os demais apresentaram estabilização da atividade enzimática da bromelina, apresentando atividade superior à encontrada no fim da digestão em fluido gástrico o que indica a liberação das proteínas e peptídeos de bromelina da rede de alginato, com consequente aumento da disponibilidade de atividade proteolítica, dos quais o sistema Lis apresenta a maior

atividade, isto é, $4,3 \text{ U.mL}^{-1}$ enquanto a bromelina livre apresenta $2,0 \text{ U.mL}^{-1}$, conforme apresentado na Figura 76.

Figura 76: Atividade enzimática ao final da digestão em SFI.



Ao se comparar os resultados dos sistemas à bromelina livre, em exceção aos sistemas Arg e LA, verifica-se um aumento da atividade proteolítica se comparado aos sistemas no final da solução de fluido gástrico, isto é, os sistemas são capazes de evitar processos de degradação da bromelina mesmo após contato com solução de fluido gástrico.

As Tabelas 17 e 18 apresentam os valores dos efeitos, erros e significância estatística para os modelos empregados.

Tabela 17: Valores dos efeitos e erros da Soma Quadrática, Graus de Liberdade e Média Quadrática para os modelos avaliados.

Modelo	Efeito Soma Quadrática	Efeito Graus de Liberdade	Efeito Média Quadrática	Erro Soma Quadrática	Erro Graus de Liberdade	Erro Média Quadrática
Linear	8,72891	2	4,364457	3,688356	6	0,614726
Quadrático	3,44391	3	1,147969	0,244448	3	0,081483
Cúbico Especial	0,07353	1	0,073535	0,170913	2	0,085457
Total Ajustado	12,41727	8	1,552159			

Tabela 18: Valores de significância estatística p e regressão para os modelos calculados.

Modelo	F	p	R ²	R ² Ajustado
Linear	7,09984	0,026207	0,702966	0,603954
Quadrático	14,0885	0,028382	0,980314	0,947504
Cúbico Especial	0,86049	0,45153	0,986236	0,944943

Através das Tabela 17 e 18 é possível verificar que o modelo Cúbico Especial apresenta os menores valores de erro para a Soma Quadrática e Média Quadrática, no entanto, ao se avaliar os valores de p para os três modelos, apenas o modelo Cúbico Especial não possui valor significativo estatisticamente.

Apesar do cúbico especial apresentar valores de regressão(R²) e regressão ajustado superiores a 0,90, tanto o valor de p quanto o valor de F são muito mais significativos no modelo Quadrático. Portanto, depreende-se que o modelo Quadrático é o modelo que mais se adequa à descrição do comportamento dos sistemas.

A Tabela 19 apresenta as estimativas dos efeitos significativos (p<0,05) para o modelo quadrático.

Tabela 19: Sumário dos efeitos para a quantidade de peptídeos de bromelina livre, após digestão em solução de fluido gástrico.

Fator	Coefficientes Estimados	t-valor	p-valor	Intervalo de Confiança -95%	Intervalo de Confiança +95%
(A)L-lisina(%)	4,28498	15,10840	0,000630	3,3824	5,18758
(B)L-arginina(%)	0,53179	1,87504	0,157466	-0,3708	1,43438
(C)L-histidina(%)	3,20176	11,28908	0,001491	2,2992	4,10436
AB	-6,84152	-5,51713	0,011728	-10,7879	-2,89513
AC	-0,90919	-0,73319	0,516539	-4,8556	3,03720
BC	4,53230	3,65493	0,035370	0,5859	8,47869

A partir da Tabela 19 é possível obter a equação que descreve a atividade enzimática (U.mL⁻¹) após digestão, conforme Equação 13.

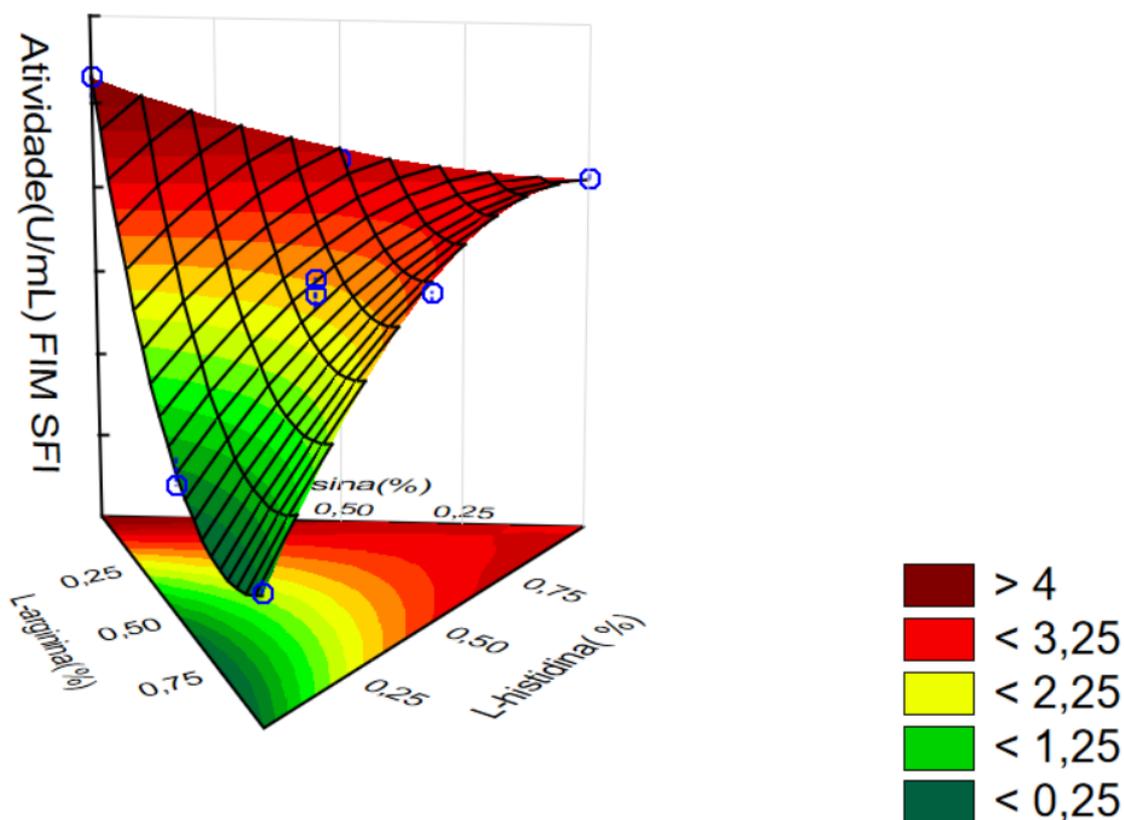
Equação 13:

$$\text{Atividade Enzimática (U.mL}^{-1}\text{)} = 4,28498*(A) + 0,53179*(B) + 3,20176*(C) - 6,84152*(A)*(B) - 0,90919*(A)*(C) + 4,53230*(B)*(C)$$

O sumário dos efeitos evidencia que todos os aminoácidos empregados influenciam de maneira positiva na quantidade peptídeo livre (%), no entanto, apenas a l-lisina e a l-histidina apresentam efeitos significativos na estabilidade da atividade enzimática. A combinação entre l-arginina e os demais aminoácidos trás efeitos significativos sendo a combinação com l-lisina apresentando efeito positivo e a combinação com l-histidina efeito negativo, porém, a combinação de l-lisina e l-histidina não gera efeitos significativos.

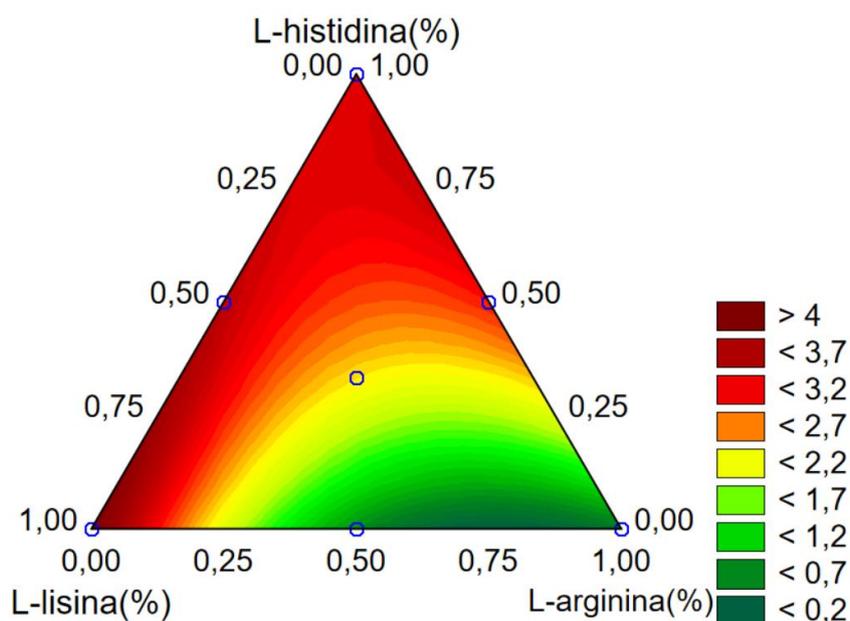
A Figura 77 apresenta a superfície de resposta para os sistemas estudados, é possível verificar que se apresenta região de máximo de resposta na região onde se concentra a l-lisina e das combinações com l-histidina e, uma região de mínimo para a composição com maior quantidade de l-arginina.

Figura 77: Superfície de nível para os sistemas estudados.



A Figura 78 apresenta a curva de nível para os sistemas estudados, é possível verificar que a l-lisina apresenta os maiores valores de atividade seguida pela l-histidina e combinações entre l-lisina e l-histidina. A l-arginina parece influenciar de forma negativa na atividade enzimática e sua combinação a l-lisina torna o sistema ainda mais instável.

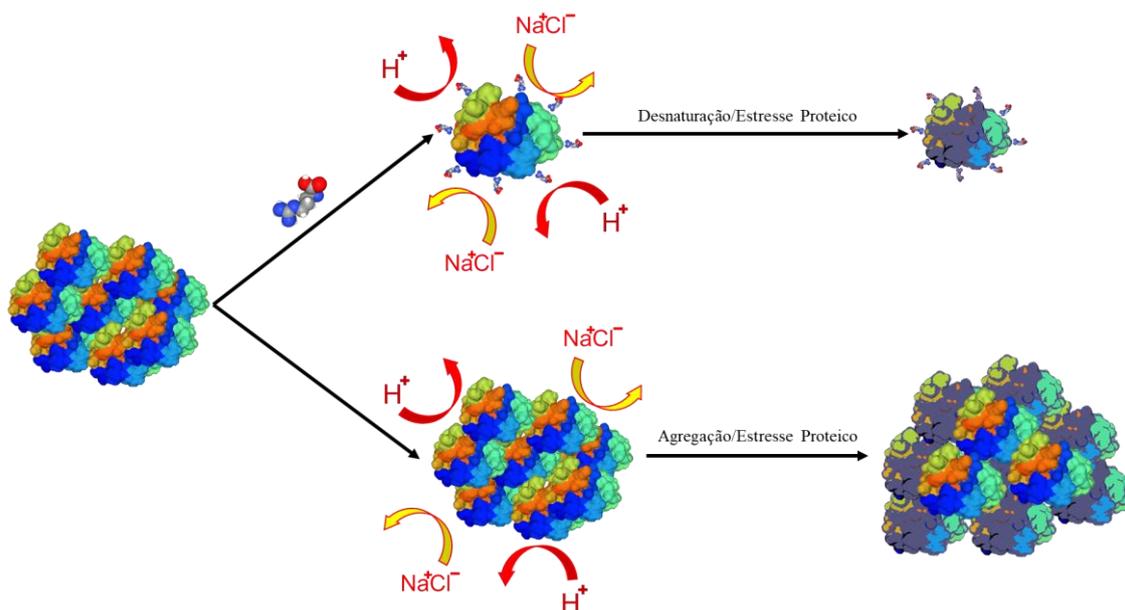
Figura 78: Curva de nível para os sistemas estudados.



De acordo com estudos anteriores, a l-arginina é empregada na redução de processos de agregação de proteínas, contudo ainda não são conhecidos os processos de interação que a l-arginina pode causar em proteínas com atividade biológica (MIYATAKE et al., 2016; KIM et al., 2016).

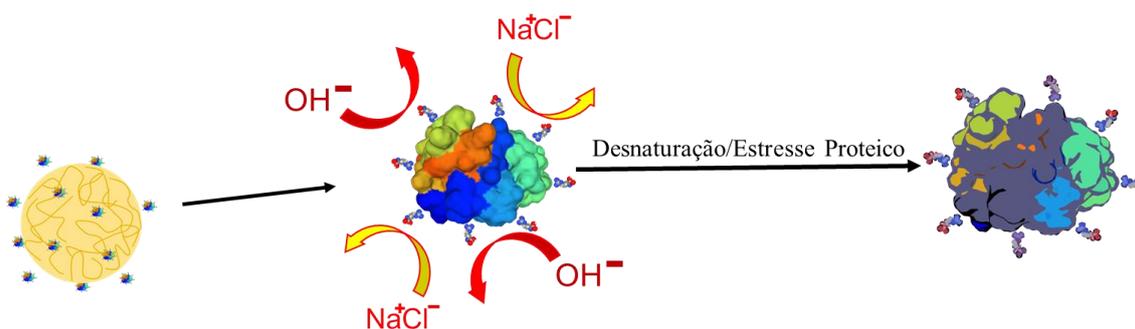
A literatura discute sobre as interações que este aminoácidos gera nas proteínas e, apesar dos efeitos, não estão claros se os processos de agregação ou não agregação são os únicos responsáveis pela perda de atividade, já que em sistemas de digestão, por exemplo, a dinâmica altera de forma bem rápida gerando diferenças de carga e protonação tanto da l-arginina como dos constituintes das proteínas o que leva a deformação das estruturas quaternárias das proteínas e consequente perda de atividade (AJMERA; SCHERLISS, 2014; MIYATAKE et al., 2016; KIM et al., 2016). A Figura 79 ilustra o processo de desnaturação na presença e ausência da l-arginina, enquanto na Figura 80 os mesmos processos após a liberação das proteínas dos sistemas Arg e LA.

Figura 79: Ilustração da degradação e desnaturação da bromelina na presença e ausência da l-arginina.



Fonte: Própria, baseado em MIYATAKE et al., (2016) e VAN DER SMAN et al., (2020).

Figura 80: Ilustração da degradação e desnaturação da bromelina em SFI.



Fonte: Própria, baseado em LIN et al., (2009) e CHYZY; TOMCZYKOWA; PLONSKA-BRZEZINSKA, (2020).

Portanto, após a avaliação do gráfico da Figura 79 e da Figura 80, observa-se que a l-lisina quando combinada ao alginato apresenta uma potencial opção na confecção de sistemas de liberação controlada por pH para aumento da biodisponibilidade de bromelina em sistemas intestinais, já vez que o sistema com l-lisina apresentou níveis superiores de proteção, seja na quantidade de proteínas ao final da digestão ou mesmo na atividade enzimática que mesmo após a inserção em SFG apresentou atividade superior tanto a bromelina livre quanto aos sistemas testados.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo é o primeiro a realizar a combinação de aminoácidos a alginato de sódio para aumento de estabilidade física e química de proteínas, neste caso, a bromelina. Além disso, o trabalho apresentou resultados para 3 aminoácidos classificados como aminoácidos carregados positivamente, cujas propriedades da l-lisina e l-histidina auxiliaram numa maior entrega de quantidade de proteínas e atividade enzimática após digestão gástrica e intestinal realizadas *in vitro*.

As análises de caracterização demonstraram que os sistemas não possuem cristalinidade, nos difratogramas das análises de DRX foi possível verificar bandas de difração as quais indicam que os sistemas são essencialmente amorfos.

As análises de FTIR demonstraram que a bromelina fora encapsulada em todos os sistemas, uma vez que as bandas específicas da proteína não foram observadas em nenhum dos espectros de transmissão avaliados.

As análises de MEV demonstraram dois tipos de morfologia as quais se apresentaram devido a utilização de dispersor com grande diâmetro de pulverização o que contribuiu para formação de gotas de grande volume e, conseqüentemente, a formação de sistemas com superfícies lisas e sistemas com superfície enrugada.

Os ensaios de digestão demonstraram que a quantidade de proteínas no final da digestão em SFG e no final da digestão em SFI fora superior em todos os sistemas estudados se comparados a bromelina livre, indicando sucesso no encapsulamento e, principalmente, na estabilidade da bromelina o que indica que os sistemas produzidos apresentam maior quantidade e biodisponibilidade se comparada a bromelina livre.

Por fim, ao se avaliar os modelos empregados e os valores obtidos na utilização dos aminoácidos, verifica-se que a l-lisina apresenta maior capacidade de estabilização de proteínas e atividade enzimática para a bromelina, seja por sua capacidade em manter uma alta quantidade de proteínas totais ao final da digestão seja por estabilizar a atividade enzimática nas fases gástrica e intestinal. Dessa forma, a l-lisina apresenta alto potencial na utilização de sistemas de liberação controlada por pH para o aumento da biodisponibilidade de bromelina na fase intestinal.

7. PERSPECTIVAS

A utilização de matriz de alginato combinado a aminoácidos para melhoria de características físicas e químicas de proteínas, ainda não é empregada. No trabalho apresentado, a inclusão de l-lisina e l-histidina apresentaram bons resultados na estabilidade proteica e de atividade enzimática nos sistemas estudados. Dessa forma, a aplicação de diferentes aminoácidos carregados ou não, tem potencial na interação entre as matrizes de alginato e, principalmente, das proteínas e pode ser um passo importante no desenvolvimento de sistemas com maior estabilidade para entrega controlada de proteínas ao sistema intestinal.

Por avaliar somente a digestão *in vitro*, é interessante que em trabalhos futuros se aplique o uso destes sistemas em condições mais especializadas, isto é, na presença de pepsina, pancreatina, tripsina e sais biliares, como também no estudo em modelos animais, como camundongos, para avaliação do potencial anti-inflamatório e anti-carcinogênico.

Ainda, a aplicação de aminoácidos pode trazer grandes benefícios ao aumento não somente da biodisponibilidade como bioacessibilidade, uma vez que o corpo humano é especializado na absorção de aminoácidos, o que pode gerar sistemas com maior capacidade de entrega de proteínas através da transposição de barreiras de defesa, como anticorpos específicos a proteínas os quais não seriam capazes de identificar proteínas presas nas matrizes encapsulantes compostas por carboidrato e aminoácidos. Assim, estudos envolvendo testes de biodisponibilidade e bioacessibilidade *in vivo*, podem confirmar ou descartar tais hipóteses e, caso confirmada, o potencial uso desses sistemas se torna ainda maior.

8. REFERÊNCIAS

ABDULLAHI, H.; BURCHAM, C. L.; VETTER, T. A mechanistic model to predict droplet drying history and particle shell formation in multicomponent systems. **Chemical Engineering Science**, v. 224, p. 115713, 2020.

AGÜERO, L. et al. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 32–43, 2017.

AGUIRRE, T. A. S. et al. Current status of selected oral peptide technologies in advanced preclinical development and in clinical trials. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 106, p. 223–241, 2016.

AJMERA, A.; SCHERLIESS, R. Stabilisation of proteins via mixtures of amino acids during spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, n. 1, p. 98–107, 2014.

AMERI, M.; MAA, Y. F. Spray drying of biopharmaceuticals: Stability and process considerations. **Drying Technology**, v. 24, n. 6, p. 763–768, 2006.

ARAB, M. G. et al. Resilient behavior of sodium alginate-treated cohesive soils for pavement applications. **Journal of Materials in Civil Engineering**, v. 31, n. 1, p. 1–11, 2019.

ARPAGAUS, C. et al. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 546, n. 1–2, p. 194–214, 2018.

ARSHAD, Z. I. M. et al. Bromelain: An overview of industrial application and purification strategies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 17, p. 7283–7297, 2014.

ARSLAN, S. et al. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var: *Boulardii* with different wall materials by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 685–690, 2015.

BAJAJ, J. S. et al. New concepts on intestinal microbiota and the role of the non-absorbable antibiotics with special reference to rifaximin in digestive diseases. **Digestive and Liver Disease**, v. 50, n. 8, p. 741–749, 2018.

BANKS, S. R. et al. Chemical Modification of Alginate for Controlled Oral Drug Delivery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 37, p. 10481–10488,

2019.

BARBARA, G. et al. The intestinal microenvironment and functional gastrointestinal disorders. **Gastroenterology**, v. 150, n. 6, p. 1305- 1318.e8, 2016.

BENCHABANE, S.; SUBIRADE, M.; VANDENBERG, G. W. Production of BSA-loaded alginate microcapsules: Influence of spray dryer parameters on the microcapsule characteristics and BSA release. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n. 6, p. 565–576, 2007.

BHATTACHARYYA, B. K. Bromelain: An overview. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 7, n. 4, p. 359–363, 2008.

BORTOLATTO, J.; LORA, J. Avaliação da composição centesimal do abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) liofilizado e in natura. **Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde**, v. 4, n. 1, 2008.

BOTREL, D. A. et al. Optimization of Fish Oil Spray Drying Using a Protein:Inulin System. **Drying Technology**, v. 32, n. 3, p. 279–290, 2014.

BOWEY, K. et al. Characterization of biologically active insulin-loaded alginate microparticles prepared by spray drying. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 3, p. 457–465, 2013.

BROWNLEE, I. The impact of dietary fibre intake on the physiology and health of the stomach and upper gastrointestinal tract. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 4, n. 2, p. 155–169, 2014.

BRUNEAU, M. et al. Systems for stimuli-controlled release: Materials and applications. **Journal of Controlled Release**, v. 294, p. 355–371, 2019.

CALVO, P. et al. Influence of the microencapsulation on the quality parameters and shelf-life of extra-virgin olive oil encapsulated in the presence of BHT and different capsule wall components. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 256–261, 2012.

CARLSON, B. M. **The Digestive System. The human body**. [s.l.: s.n.].

CHATER, P. I. et al. Alginate as a protease inhibitor in vitro and in a model gut system; Selective inhibition of pepsin but not trypsin. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 142–151, 2015.

CHENG, C. et al. Improvement on stability, loading capacity and sustained release of rhamnolipids modified curcumin liposomes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 183, n. August, p. 110460, 2019.

CHOBOTOVA, K.; VERNALLIS, A. B.; MAJID, F. A. A. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. **Cancer Letters**, v. 290, n. 2, p. 148–156, 2010.

CHYZY, A.; TOMCZYKOWA, M.; PLONSKA-BRZEZINSKA, M. E. Hydrogels as potential nano-, micro- and macro-scale systems for controlled drug delivery. **Materials**, v. 13, n. 1, p. 188, 2020.

CÔLHO, D. F. et al. Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

CORRÊA, J. L. G. et al. Influence of ultrasound application on both the osmotic pretreatment and subsequent convective drying of pineapple (*Ananas comosus*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 41, p. 284–291, 2017.

DA COSTA NETO, J. J. G. et al. Microencapsulation of tiger nut milk by lyophilization: Morphological characteristics, shelf life and microbiological stability. **Food Chemistry**, v. 284, p. 133–139, 2019.

DE VOS, P. et al. Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 67–68, p. 15–34, 2014.

DEBNATH, R. et al. Bromelain with peroxidase from pineapple are more potent to target leukemia growth inhibition - A comparison with only bromelain. **Toxicology in Vitro**, v. 55, p. 24–32, 2019.

DI BATTISTA, C. A. et al. Process analysis and global optimization for the microencapsulation of phytosterols by spray drying. **Powder Technology**, v. 321, p. 55–65, 2017.

DI COCCO, M. E.; BIANCHETTI, C.; CHIELLINI, F. ¹HNMR studies of alginate interactions with amino acids. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 18, n. 4, p. 283–296, 2003.

DODERO, A. et al. Rheological properties of sodium alginate solutions in the presence

of added salt: an application of Kulicke equation. **Rheologica Acta**, v. 59, n. 6, p. 365–374, 2020.

DONG, Z.; WANG, Q.; DU, Y. Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. **Journal of Membrane Science**, v. 280, n. 1–2, p. 37–44, 2006.

EMAMI, F. et al. Amino acid-based stable adalimumab formulation in spray freeze-dried microparticles for pulmonary delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, n. August, p. 101249, 2019.

ENSIGN, L. M.; CONE, R.; HANES, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 6, p. 557–570, 2012.

FAGHIHI, H. et al. The use of amino acids to prepare physically and conformationally stable spray-dried IgG with enhanced aerosol performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 466, n. 1–2, p. 163–171, 2014.

FAO. 2019. **Major tropical fruits - Statistical compendium 2018**. Rome

FERNANDO, I. P. S. et al. Advances in functionalizing fucoidans and alginates (bio)polymers by structural modifications: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 355, n. August 2018, p. 33–48, 2019.

GONÇALVES, R. F. S. et al. Advances in nutraceutical delivery systems: From formulation design for bioavailability enhancement to efficacy and safety evaluation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 78, p. 270–291, 2018.

GOUBA, N. et al. Digestive tract mycobiota and microbiota and the effects on the immune system. **Human Microbiome Journal**, v. 12, n. May, p. 100056, 2019.

GUPTA, R.; MOHANTY, S. Nanoparticle formulation having ability to control the release of protein for drug delivery application. **Materials Science and Engineering C**, v. 70, p. 327–333, 2017.

HALE, L. P. Proteolytic activity and immunogenicity of oral bromelain within the gastrointestinal tract of mice. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 2, p. 255–264, 2004.

HASSAN, A.; OTHMAN, Z.; SIRIPHANICH, J. **Pineapple (*Ananas comosus* L.**

Merr.) [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2011. v. 4

HOARE, T. R.; KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer**, v. 49, n. 8, p. 1993–2007, 2008.

INOUE, N. et al. Arginine and lysine reduce the high viscosity of serum albumin solutions for pharmaceutical injection. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 5, p. 539–543, 2014.

JI, X. et al. Fabrication of lanthanum-based phosphate binder using cross-linked alginate as a carrier. **RSC Advances**, v. 5, n. 68, p. 55191–55200, 2015.

KAHYA, N.; ERIM, F. B. Surfactant modified alginate composite gels for controlled release of protein drug. **Carbohydrate Polymers**, v. 224, n. August, p. 115165, 2019.

KANG, J. H. et al. Small intestine- and colon-specific smart oral drug delivery system with controlled release characteristic. **Materials Science and Engineering C**, v. 91, n. May, p. 247–254, 2018.

KASTL, A. J. et al. The Structure and Function of the Human Small Intestinal Microbiota: Current Understanding and Future Directions. **Cmgh**, v. 9, n. 1, p. 33–45, 2020.

KAUR, K.; JINDAL, R.; JINDAL, D. Controlled release of vitamin B1 and evaluation of biodegradation studies of chitosan and gelatin based hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 987–999, 2020.

KIM, N. A. et al. Arginine as a protein stabilizer and destabilizer in liquid formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1–2, p. 26–37, 2016.

KRAUS, C. et al. Development of a new self-flaring rivet geometry using finite element method and design of experiments. **Procedia Manufacturing**, v. 47, n. 2019, p. 383–388, 2020.

KWATRA, B. a Review on Potential Properties and Therapeutic Applications of Lycopene. **International Journal of Medical and Biomedical Studies**, v. 4, n. 4, 2020.

LABUSCHAGNE, P. Impact of wall material physicochemical characteristics on the stability of encapsulated phytochemicals: A review. **Food Research International**, v. 107, n. November 2017, p. 227–247, 2018.

LANGE, C.; RUDOLPH, R. Suppression of Protein Aggregation by L-Arginine.

Current Pharmaceutical Biotechnology, v. 10, n. 4, p. 408–414, 2009.

LAU, C. M. L. et al. Controlled release technology for anti-angiogenesis treatment of posterior eye diseases: Current status and challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 126, p. 145–161, 2018.

LEADER, B.; BACA, Q. J.; GOLAN, D. E. Protein therapeutics: A summary and pharmacological classification. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 21–39, 2008.

LEE, C. M. et al. Alginate/carboxymethyl scleroglucan hydrogels for controlled release of protein drugs. **Macromolecular Research**, v. 16, n. 5, p. 429–433, 2008.

LEE, J. H.; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical Engineering Science**, v. 125, p. 75–84, 2015.

LI, J.; MOONEY, D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. **Nature Reviews Materials**, v. 1, n. 12, 2016.

LIN, Y. H. et al. Development of pH-responsive chitosan/heparin nanoparticles for stomach-specific anti-*Helicobacter pylori* therapy. **Biomaterials**, v. 30, n. 19, p. 3332–3342, 2009.

LIU, G. et al. Preparation of alginate hydrogels through solution extrusion and the release behavior of different drugs. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 27, n. 18, p. 1808–1823, 2016.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670–673, 2004.

MÄDER, K. et al. Controlled drug release to the inner ear: Concepts, materials, mechanisms, and performance. **Hearing Research**, v. 368, p. 49–66, 2018.

MAH, P. T. et al. The use of hydrophobic amino acids in protecting spray dried trehalose formulations against moisture-induced changes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 144, n. August, p. 139–153, 2019.

MALHAIRE, H. et al. How to design the surface of peptide-loaded nanoparticles for efficient oral bioavailability? **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 106, p. 320–336, 2016.

MANZOOR, Z. et al. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Bromelain: Methods of Extraction, Purification and Therapeutic Applications Human and Animal Health. **Brazilian archives of Biology and Technolgych. Biol. Technol.** v, v. 59, n. December, p. 1–16, 2016.

MAO, X. et al. Development of Microspheres Based on Thiol-Modified Sodium Alginate for Intestinal-Targeted Drug Delivery. **ACS Applied Bio Materials**, v. 2, n. 12, p. 5810–5818, 2019.

MASINA, N. et al. A review of the chemical modification techniques of starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1226–1236, 2017.

MCCLEMENTS, D. J. Designing biopolymer microgels to encapsulate, protect and deliver bioactive components: Physicochemical aspects. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 240, p. 31–59, 2017.

MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 253, n. 2017, p. 1–22, 2018.

MCCLEMENTS, D. J. Advances in nanoparticle and microparticle delivery systems for increasing the dispersibility, stability, and bioactivity of phytochemicals. **Biotechnology Advances**, v. 38, p. #pagerange#, 2020.

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MIYATAKE, T. et al. Charge state of arginine as an additive on heat-induced protein aggregation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 563–569, 2016.

MOHY ELDIN, M. S. et al. L-Arginine grafted alginate hydrogel beads: A novel pH-sensitive system for specific protein delivery. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 355–365, 2015.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis Ninth Edition**. [s.l.: s.n.].

MUMPER, R. J. et al. Calcium-alginate beads for the oral delivery of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1): stabilization of TGF- β 1 by the addition of polyacrylic acid within acid-treated beads. **Journal of Controlled Release**, v. 30, n. 3, p. 241–251, 1994.

NANDIYANTO, A. B. D.; OKUYAMA, K. Influences of size and amount of colloidal template and droplet diameter on the formation of porous-structured hyaluronic acid particles. **Indonesian Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 152–165, 2017.

ORLANDI-MATTOS, P. E. et al. Enkephalin related peptides are released from jejunum wall by orally ingested bromelain. **Peptides**, v. 115, n. December 2018, p. 32–42, 2019.

PAVAN, R. et al. Properties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review. **Biotechnology Research International**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

PAWAR, V. K. et al. Targeting of gastrointestinal tract for amended delivery of protein/peptide therapeutics: Strategies and industrial perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 196, p. 168–183, 2014.

RAHMANI, V.; SHEARDOWN, H. Protein-alginate complexes as pH-/ion-sensitive carriers of proteins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 452–461, 2018.

RAMLI, A. N. M.; AZNAN, T. N. T.; ILLIAS, R. M. Bromelain: from production to commercialisation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 5, p. 1386–1395, 2017.

RATHNAVELU, V. et al. Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications (Review). **Biomedical Reports**, v. 5, n. 3, p. 283–288, 2016.

RENUKUNTLA, J. et al. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1–2, p. 75–93, 2013.

SANEWSKI, G. M. et al. Review of genetic improvement of pineapple. **Acta Horticulturae**, v. 902, p. 95–108, 2011.

SAUNA, Z. E. et al. Recent advances in (therapeutic protein) drug development. **F1000Research**, v. 6, 2017.

SCHERER, R. F. et al. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). **Scientia Horticulturae**, v. 151, p. 38–45, 2013.

SCHERER, R. F. et al. Gigante de Tarauacá: A triploid pineapple from Brazilian Amazonia. **Scientia Horticulturae**, v. 181, p. 1–3, 2015.

SEVILLE, P. C. et al. Amino acid-modified spray-dried powders with enhanced aerosolisation properties for pulmonary drug delivery. **Powder Technology**, v. 178, n. 1, p. 40–50, 2007.

SHARMA, M.; SHARMA, R. Implications of designing a bromelain loaded enteric nanoformulation on its stability and anti-inflammatory potential upon oral administration. **RSC Advances**, v. 8, n. 5, p. 2541–2551, 2018.

SHISHIR, M. R. I. et al. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. **Trends in Food Science and Technology**, v. 78, p. 34–60, 2018.

SRIAMORNSAK, P.; THIRAWONG, N.; KORKERD, K. Swelling, erosion and release behavior of alginate-based matrix tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 3, p. 435–450, 2007.

STRUGALA, V. et al. Inhibition of pepsin activity by alginates in vitro and the effect of epimerization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 304, n. 1–2, p. 40–50, 2005.

THANKI, P. N.; DELLACHERIE, E.; SIX, J. L. Prevailing mechanisms of the hydrolytic degradation of oligo(d,l-lactide)- grafted dextrans. **European Polymer Journal**, v. 41, n. 7, p. 1546–1553, 2005.

TODKAR, S. S.; PATIL, S. A. Review on mechanical properties evaluation of pineapple leaf fibre (PALF) reinforced polymer composites. **Composites Part B: Engineering**, v. 174, n. May, p. 106927, 2019.

TUPUNA, D. S. et al. Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. October 2017, p. 846–855, 2018.

TYAGI, P.; PECHENOV, S.; ANAND SUBRAMONY, J. Oral peptide delivery: Translational challenges due to physiological effects. **Journal of Controlled Release**, v. 287, p. 167–176, 2018.

VAN DER SMAN, R. G. M. et al. Physical chemistry of gastric digestion of proteins gels. **Current Research in Food Science**, v. 2, p. 45–60, 2020.

VICENTE, J. et al. Fundamental analysis of particle formation in spray drying. **Powder Technology**, v. 247, p. 1–7, 2013.

VISENTINI, F. F. et al. In vitro gastrointestinal digestion and cytotoxic effect of ovalbumin-conjugated linoleic acid nanocomplexes. **Food Research International**, v. 137, p. 109381, 2020.

WAGNER, A. M.; GRAN, M. P.; PEPPAS, N. A. Designing the new generation of intelligent biocompatible carriers for protein and peptide delivery. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 2, p. 147–164, 2018.

WANG, X. et al. Bromelain-immobilized and lactobionic acid-modified chitosan nanoparticles for enhanced drug penetration in tumor tissues. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 129–142, 2018.

WANG, Y.; SELOMULYA, C. Spray drying strategy for encapsulation of bioactive peptide powders for food applications. **Advanced Powder Technology**, v. 31, n. 1, p. 409–415, 2020.

WATKINS, K. A.; CHEN, R. pH-responsive, lysine-based hydrogels for the oral delivery of a wide size range of molecules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 496–503, 2015.

YANG, J. S.; XIE, Y. J.; HE, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 33–39, 2011.

YU, J. et al. Protection of hydrophobic amino acids against moisture-induced deterioration in the aerosolization performance of highly hygroscopic spray-dried powders. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 119, p. 224–234, 2017.

YU, L. et al. Microfluidic formation of core-shell alginate microparticles for protein encapsulation and controlled release. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 539, p. 497–503, 2019.

ZHANG, A. et al. Recent advances in stimuli-responsive polymer systems for remotely controlled drug release. **Progress in Polymer Science**, v. 99, p. 101164, 2019.

ZHANG, Z. et al. Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: Effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 308–315, 2016.

ZHAO, H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its

implication for biocatalysis using ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, n. 1–6, p. 16–25, 2005.

ZOU, L. et al. Encapsulation of protein nanoparticles within alginate microparticles : Impact of pH and ionic strength on functional performance. **Journal of Food Engineering**, v. 178, p. 81–89, 2016.

ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, E. Overview of microencapsulates for use in food products and processes. **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**, p. 3–29, 2010.

9. APÊNDICE

Figura 81: Sistema Lis do planejamento de misturas.

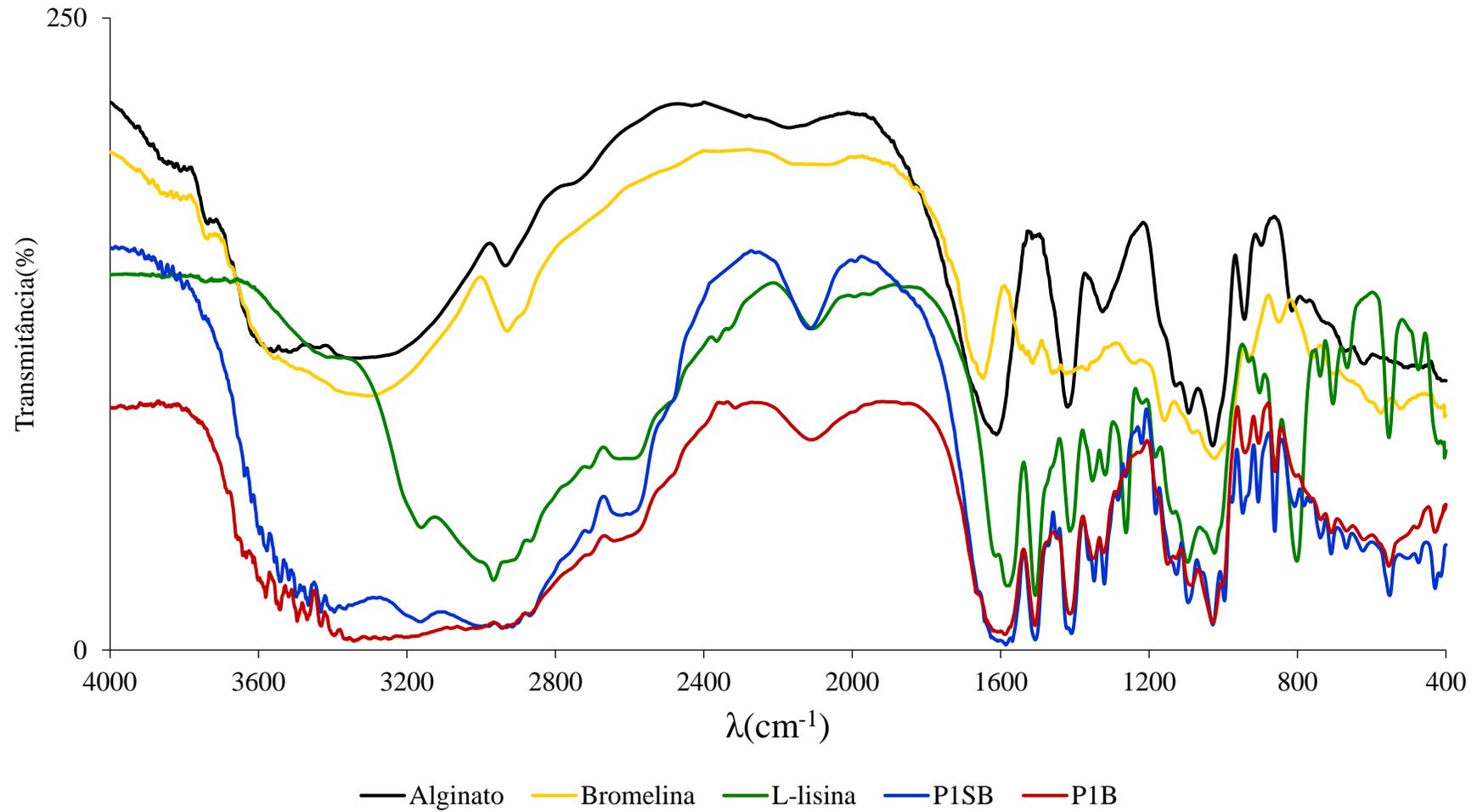


Figura 82: Sistema Arg do planejamento de misturas.

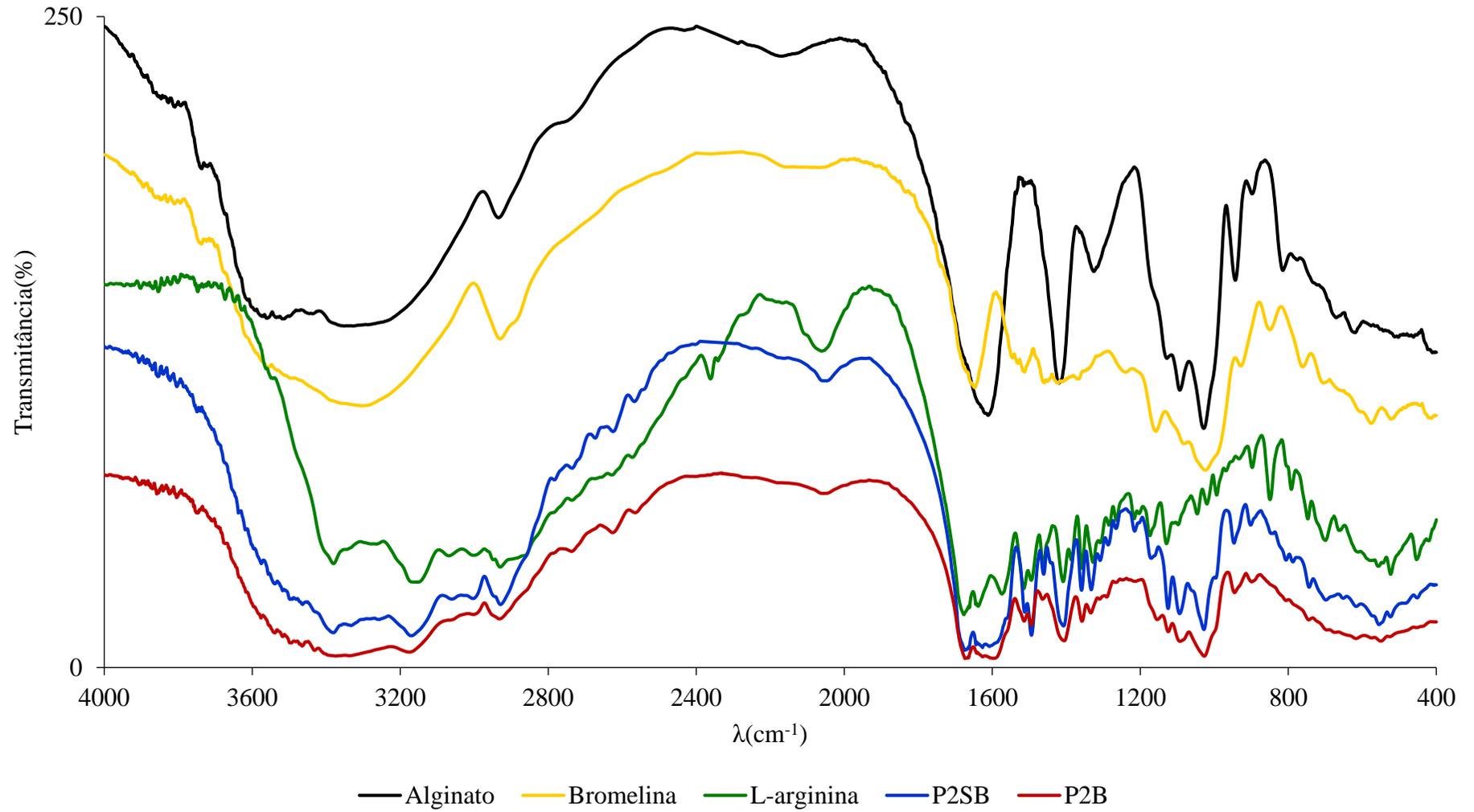


Figura 83: Sistema His do planejamento de misturas.

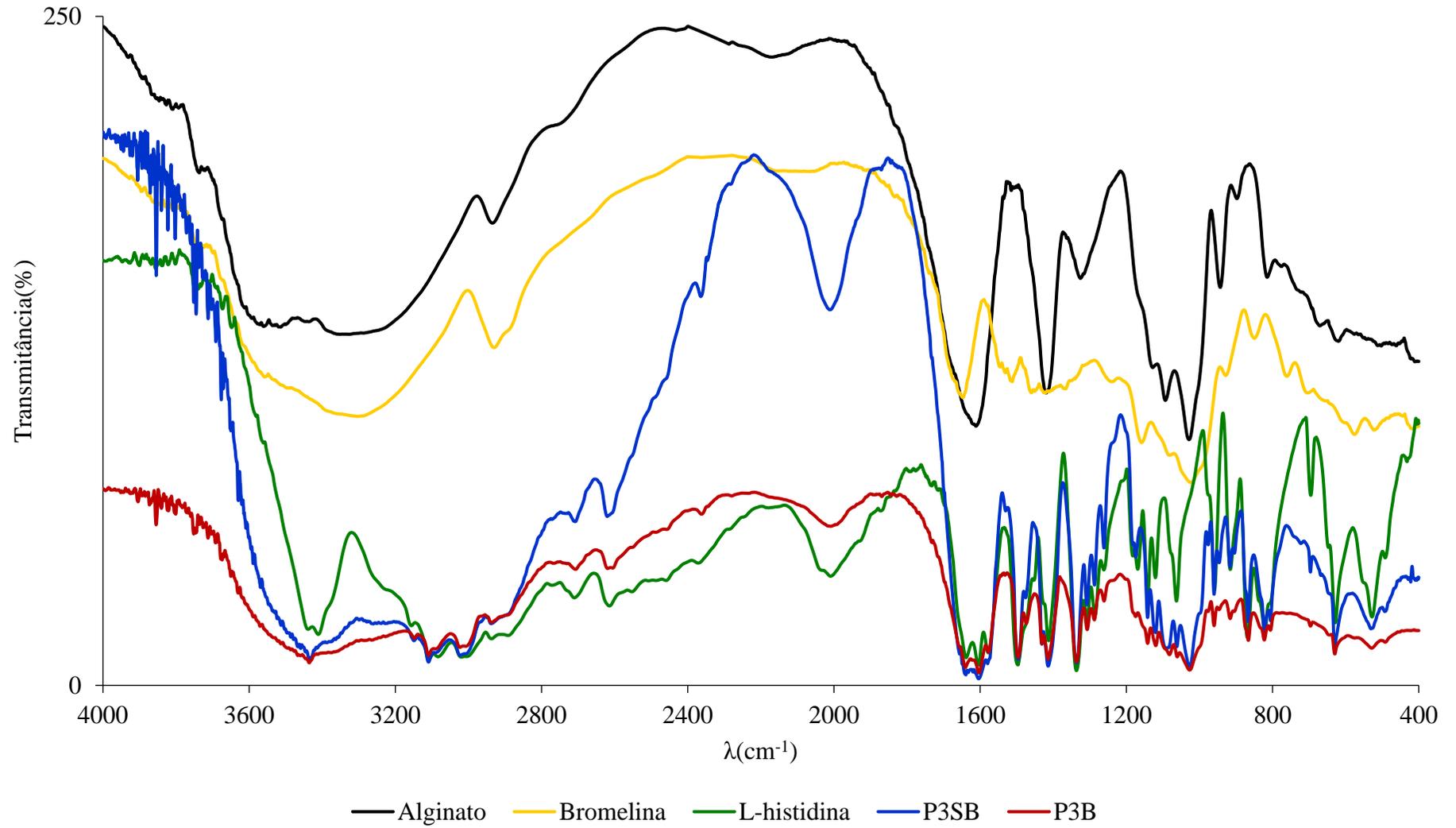


Figura 84: Sistema LA do planejamento de misturas.

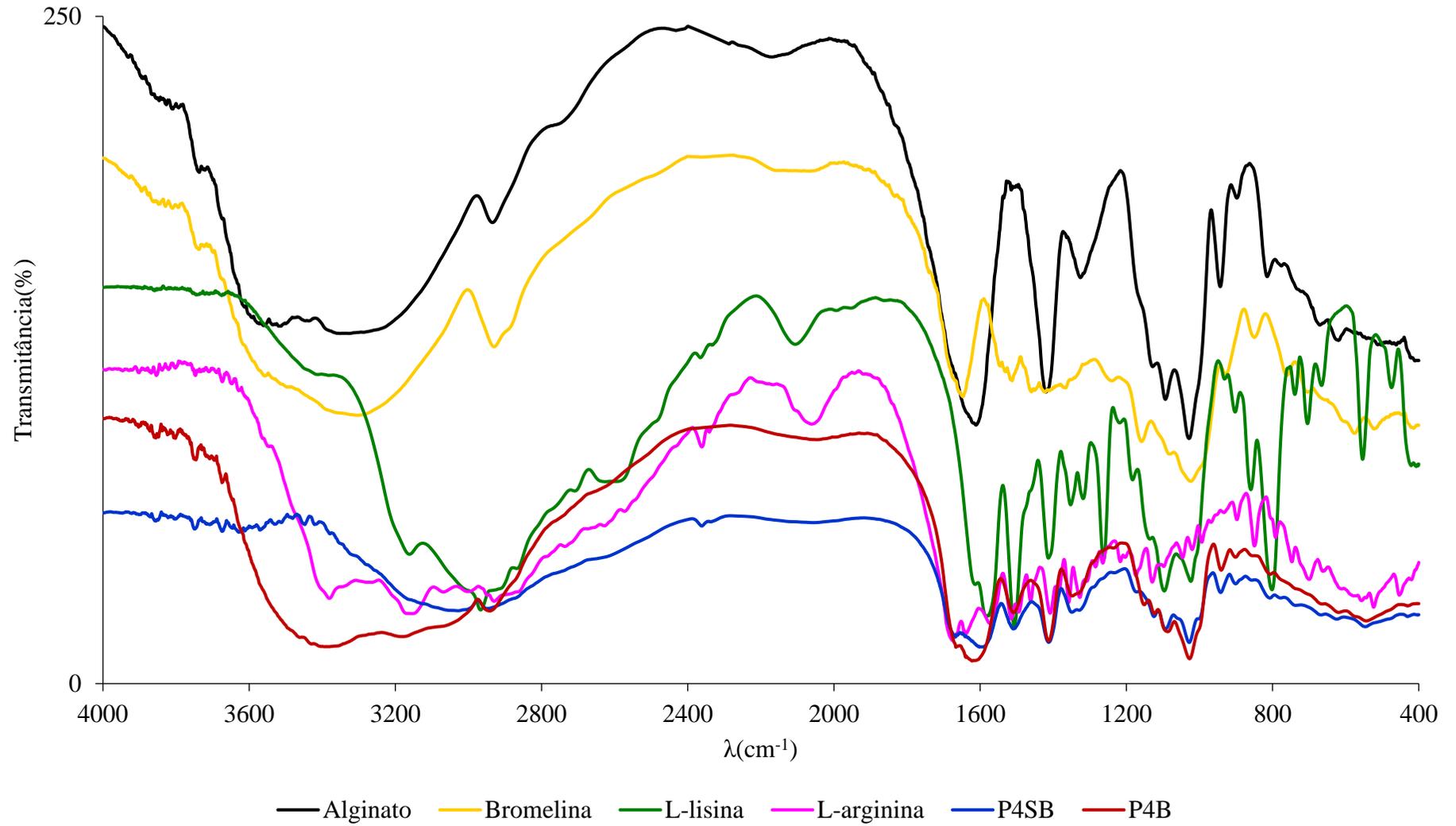


Figura 85: Sistema LH do planejamento de misturas.

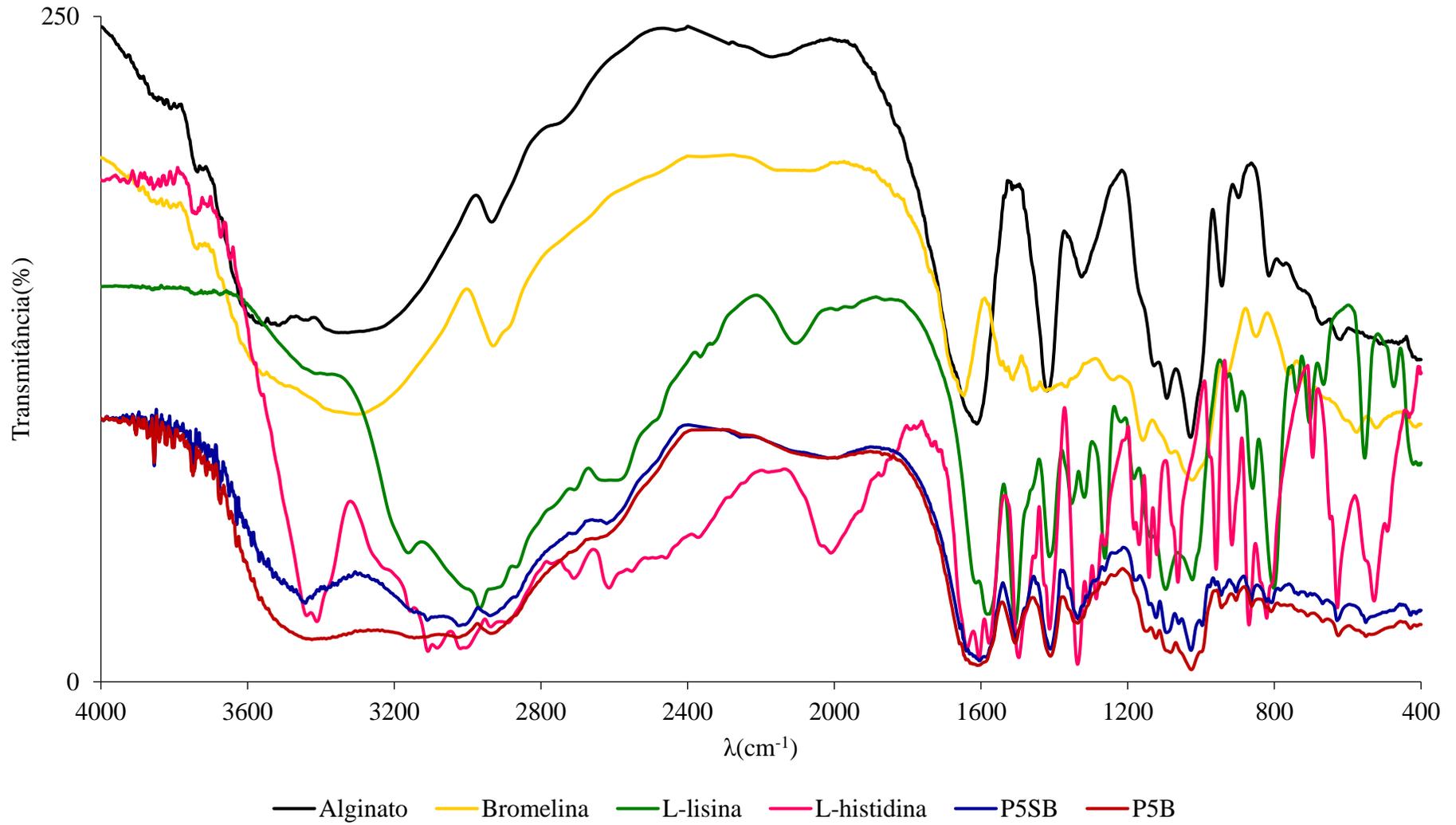


Figura 86: Sistema AH do planejamento de misturas.

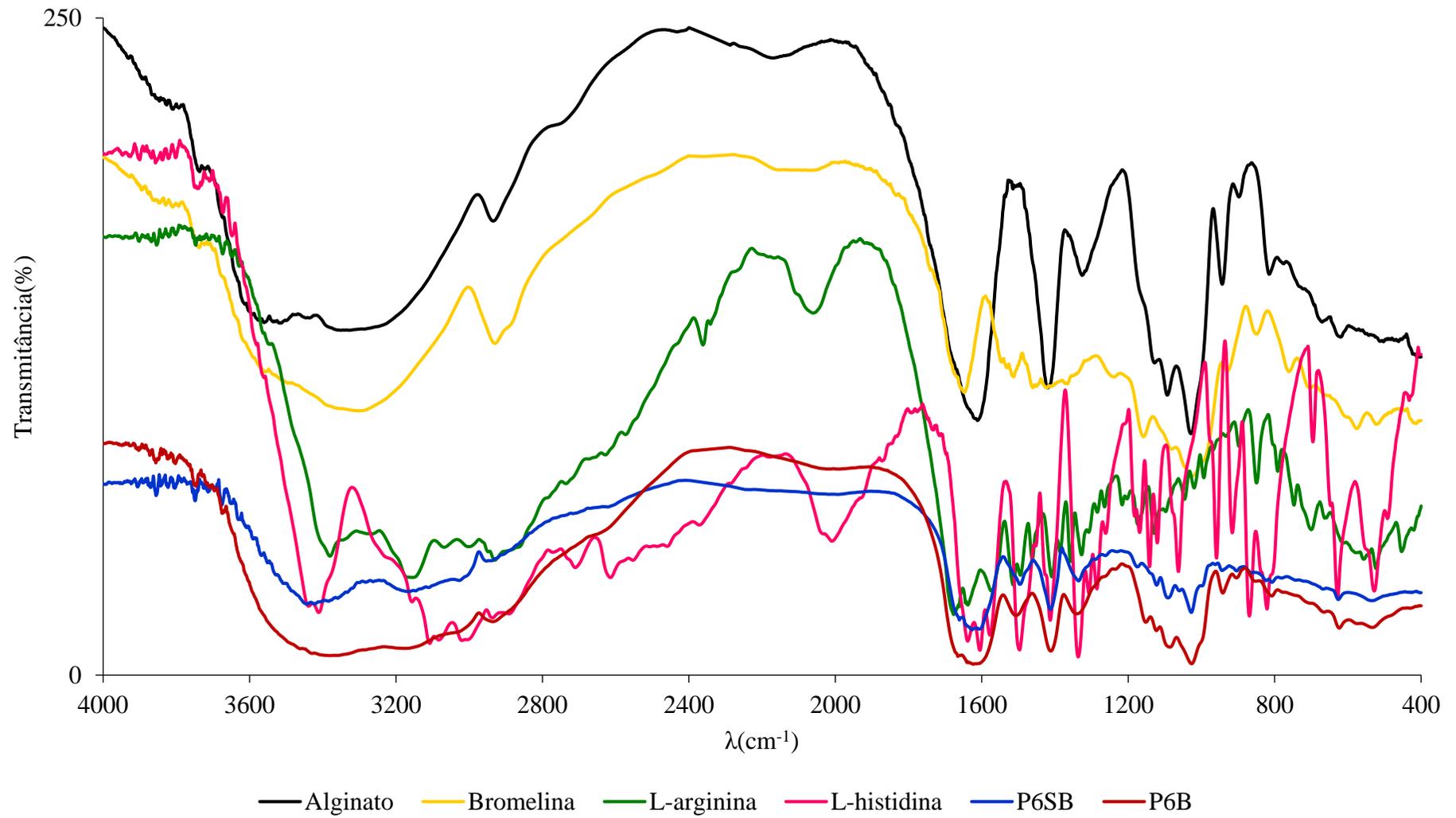
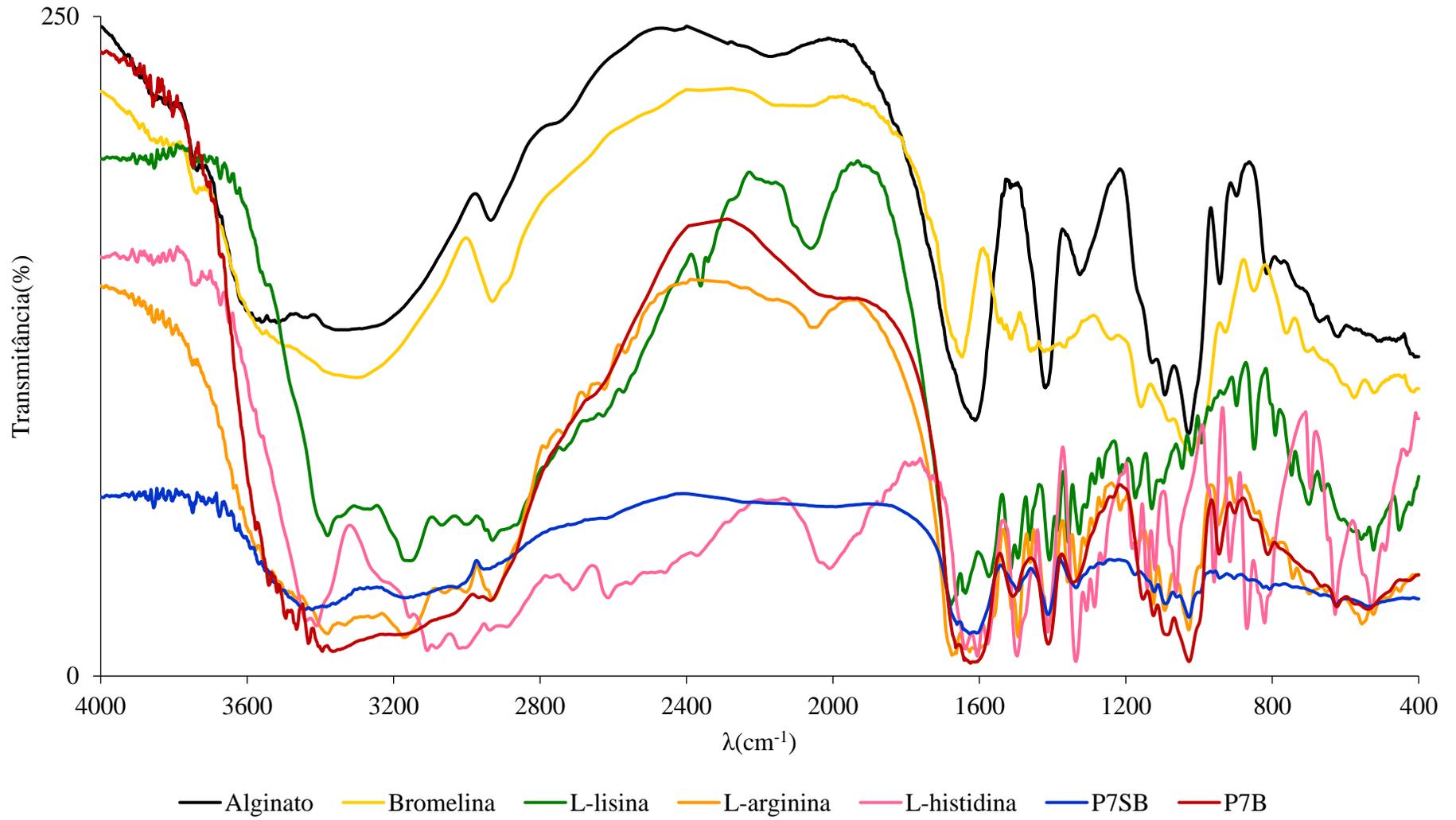


Figura 87: Sistema LAH do planejamento de misturas.



Quadro 13: Planejamento dos experimentos aplicando design de misturas *simplex centroid* com 3 repetições do ponto central.

Sistema	Ordem de Execução	L-lisina(m/v)	L-arginina(m/v)	L-histidina(m/v)
Lis	7(C)	1,000	0,000	0,000
Arg	5	0,000	1,000	0,000
His	3	0,000	0,000	1,000
LA	7(C)	0,500	0,500	0,000
LH	2	0,500	0,000	0,500
AH	4	0,000	0,500	0,500
LAH	1	0,333	0,333	0,333
LAH	7(C)	0,333	0,333	0,333
LAH	6	0,333	0,333	0,333

Tabela 20: Resultados numéricos obtidos em todos os sistemas para todos os parâmetros medidos.

Sistema	Recuperação de Sólidos Total (%)	Teor de Umidade (%)	Proteínas (%) FIM SFG	AE (U.mL ⁻¹) Fim da SFG	Proteínas (%) FIM SFG+SFI	AE (U.mL ⁻¹) Fim da SFG+SFI
Lis	26,8	0,62	63,6	3,2	59,7	4,3
Arg	33,1	1,92	90,1	3,5	31,7	0,6
His	38,0	1,67	72,3	2,6	44,6	3,2
LA	36,7	1,27	78,3	3,0	33,0	0,6
LH	44,6	1,25	85,8	3,7	46,2	3,4
AH	40,1	1,84	85,8	1,8	51,5	2,9
LAH	38,5	0,61	87,1	1,5	41,8	2,7
LAH	39,7	0,49	87,3	1,4	42,4	2,5
LAH	37,9	0,29	89,8	1,4	44,0	2,1