



CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E ESTABILIDADE DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE GELIFICAÇÃO IÔNICA POR ATOMIZAÇÃO

ANA CLARA T. R. FIOCCO¹, ANA CARLA K. SATO², CAROLINA S. F. PICONE^{1*}

¹Universidade Estadual de Campinas, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição
Faculdade de Engenharia de Alimentos

²Universidade Estadual de Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos

*e-mail: cpicone@unicamp.br

RESUMO – Classificado como um polissacarídeo, o alginato de sódio é extraído de algas marrons e bactérias. São biocompatíveis, biodegradáveis, atóxicos e com alta capacidade gelificante, sendo comum o seu uso como hidrogéis para a entrega de compostos bioativos. Nesse estudo, micropartículas de alginato foram preparadas através do método de gelificação iônica por atomização, variando concentração do banho de CaCl₂ (3 e 6% m/m), pressão do ar (0,25 e 0,50 bar) e distância de pulverização (20 e 25 cm). As micropartículas obtidas foram avaliadas quanto à distribuição de tamanho, morfologia da superfície e estabilidade frente a diferentes pHs (pH 2,5, 3,5 e 4,5) por 4 dias. O processo de atomização produziu partículas com tamanhos entre 83 e 146 µm com morfologias diversas (irregulares, esféricas ou elípticas). Observou-se que as partículas produzidas com 0,25 bar sofreram alteração de tamanho e morfologia após 4 dias de estabilidade. As amostras produzidas em concentração de 6% CaCl₂ apresentaram maiores tamanhos quando comparadas às formadas com 3%, possivelmente devido à maior força iônica da solução. Quanto à altura de pulverização, as amostras produzidas a 25cm apresentaram morfologia mais esféricas que as demais.

INTRODUÇÃO

A gelificação iônica pode ser empregada na formação de estruturas para entrega de bioativos e apresenta vantagens como baixo custo, simplicidade e ausência de solventes orgânicos. A formação das partículas pode ocorrer via gotejamento, obtendo partículas de tamanho milimétrico, ou por atomização, com tamanho micrométrico (de Moura et al., 2022). Partículas maiores em geral oferecem maior proteção a bioativos incorporados, mas sua dispersão em matrizes alimentares é comprometida (de Moura et al., 2018), além de afetarem a sensação na boca quando aplicadas em produtos alimentícios. Com isso, partículas menores de 100 µm são

preferidas para este tipo de aplicação (Leong et al., 2016).

O alginato de sódio é comumente utilizado como material de parede na técnica de gelificação iônica por ser não tóxico, biodegradável, biocompatível e por formar gel instantaneamente quando em contato com solução de cálcio (Ca²⁺) (Zhang et al., 2021). Esta propriedade é oriunda da estrutura do alginato, consistindo em copolímeros de ácido α-L-glucurônico (G) e ácido β-D-manurônico (M) (Soliman et al., 2013). Este último é capaz de estabelecer pontes salinas com o cálcio originando uma estrutura cruzada denominada “caixa de ovos” (Zhang et al., 2021). O tamanho e da morfologia das partículas formadas influenciam diretamente a estabilidade das mesmas frente a condições ambientais adversas, bem como o perfil de

liberação de bioativos em alimentos e ao longo do trato gastrointestinal. Tais características são fortemente dependentes das condições de atomização e reticulação dos géis de alginato.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito das condições de atomização e da concentração de reticulante nas propriedades de partículas de alginato de cálcio. Foram avaliadas duas concentrações de CaCl_2 visando alterar a disponibilidade de íons Ca^{2+} para reticulação do alginato (Soliman et al., 2013), a pressão de ar e distância de pulverização. As micropartículas foram avaliadas quanto ao tamanho e à morfologia, bem como estabilidade ao longo do tempo frente a diferentes valores de pHs.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Os materiais utilizados neste projeto foram alginato de sódio Grindsted® Alginate FD 175 (França), gentilmente cedido pela Danisco. Os demais reagentes empregados foram de grau analítico.

Métodos

Preparo das soluções: o alginato de sódio 1,5% (m/m) foi preparado com água ultrapura (Milli-Q) sob agitação magnética a 420 rpm por 1,5 horas a 30 °C.

Formação das partículas: A solução de alginato (1,5% (m/m)) foi atomizada em bico atomizador modelo UM-10 com diâmetro 1,0 mm à temperatura ambiente (25 °C). A distância de pulverização, concentração de solução de CaCl_2 e a pressão de ar foram variadas conforme Tabela 1. A vazão das partículas produzidas a 0,25 e 0,50 bar foi de 3,35 e 5,60 mL/min, respectivamente. Após a atomização as partículas permaneceram por 15 minutos em soluções de CaCl_2 sob leve agitação magnética. Então, as partículas foram filtradas a vácuo e lavadas com água destilada. Em seguida, parte das partículas foram incubadas em diferentes pHs para avaliação da estabilidade ao longo do tempo. A outra fração foi analisada quanto ao tamanho de partícula e morfologia logo após o preparo. O rendimento foi determinado através da divisão entre a massa final de micropartículas e a massa inicial de solução de alginato.

Tabela 1: Concentrações de CaCl_2 , altura de pulverização e pressão de ar das amostras.

Amostra	Pressão (bar)	Altura (cm)	[CaCl_2] (% m/m)
0,25-20-3	0,25	20	3
0,25-20-6	0,25	20	6
0,25-25-3	0,25	25	3
0,25-25-6	0,25	25	6
0,50-20-3	0,50	20	3
0,50-20-6	0,50	20	6
0,50-25-3	0,50	25	3
0,50-25-6	0,50	25	6

Análises

Tamanho de partícula: Para avaliar o tamanho de partícula foi utilizado espalhamento estático de luz em um equipamento *Mastersizer* (*Malvern Instruments Ltd*, Marvern, Reino Unido). As partículas foram dispersas em água destilada para leitura em 6 repetições. Os resultados foram expressos como diâmetro médio volumétrico (diâmetro de De Brouckere – $D_{[4,3]}$) (Equação 1). A mediana das distribuições de tamanho foi avaliada (D_{50}).

$$D_{[4,3]} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (1)$$

onde, d_i é o diâmetro da partícula e n_i é o número de partículas.

O índice de polidispersidade (PDI) foi calculado de acordo com de Moura e colaboradores (2019) utilizando a Equação 2.

$$PDI = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (2)$$

onde D_{90} e D_{10} são os diâmetros de 90 % e 10 % do volume acumulado, respectivamente.

Morfologia: A morfologia das partículas foi examinada por microscopia óptica usando um microscópio modelo *JENVAL 30-G0020* (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha).

Estabilidade: Para avaliar a estabilidade das micropartículas frente a diferentes pHs, elas foram incubadas na proporção de 1:10 (micropartícula:tampão) em tampão glicina 0,2 mol/L pH 2,5 e tampão acetato de sódio 0,2 mol/L em pH 3,5 e pH 4,5 por 4 dias. Após este período, as partículas foram avaliadas quanto ao tamanho e morfologia.

Estatística: As análises foram realizadas em triplicata. A diferença entre as médias foi verificada por ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$) através do *software* PAST (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

RESULTADOS

O método de atomização empregado para a formação de partículas através da solução de alginato de sódio tem como força motriz o ar em alta velocidade que passa por um pequeno bico simultaneamente a aspiração do fluido a ser nebulizado, através do efeito venturi (Smyth et al., 2011). Dessa forma, a solução de alginato é pulverizada em solução contendo cátions divalentes (Ca^{2+}) que imediatamente originam uma estrutura de rede tridimensional insolúvel. O presente estudo produziu micropartículas de tamanho pequeno (entre 83 e 146 μm), valores em concordância com o relatado por Ching et al., (2017), e, em geral, com morfologia irregular.

A concentração da solução de CaCl_2 e os parâmetros de processamento (pressão de ar, distância do bico atomizador) influenciaram a distribuição de tamanho e morfologia da superfície (Tabela 3 e Figura 1). Na Tabela 2 é possível verificar que o melhor rendimento foi observado nas amostras com menor pressão (0,25 bar). A pressão de 0,5 bar pode ter sido alta para as alturas de pulverização avaliadas. A alta velocidade imposta às partículas nesta condição e o impacto contra a superfície do banho de reticulação dificultaram a formação de partículas homogêneas.

Em relação à concentração de íons, nota-se a influência na estabilidade das partículas frente a diferentes pHs (Figura 2), devido a maior reticulação de íons e, portanto, menor propensão ao intumescimento.

O maior rendimento observado nos sistemas formados com 3% (m/m) de CaCl_2 pode estar associado à maior retenção de água

de tais amostras. Em maiores forças iônicas, a densidade da rede de alginato é maior devido à maior quantidade de pontes salinas. Isso pode diminuir a sua capacidade de retenção de água dos sistemas, causando o encolhimento das partículas. Como o cálculo do rendimento foi realizado em base úmida, a quantidade de água retida pelas partículas contribui para a observação de maiores valores de rendimento.

Tabela 2: Rendimento e cálculo de vazão das amostras.

Amostra	Rendimento (%)
0,25-20-3	11,85 ^d
0,25-20-6	18,84 ^b
0,25-25-3	20,71 ^a
0,25-25-6	11,72 ^d
0,50-20-3	13,96 ^c
0,50-20-6	13,15 ^{cd}
0,50-25-3	13,40 ^{cd}
0,50-25-6	9,85 ^e

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa para $p < 0,05$.

Análises

Tamanho de partícula: As caracterizações de tamanho das partículas são apresentadas na Tabela 3. Para todas as amostras foi encontrado pico monomodal, porém com altos valores de PDI (3,12 a 5,79), resultado este que pode ser esperado devido à metodologia de atomização utilizar de rompimento caótico da solução de alginato sob condições turbulentas (Leong et al., 2016).

A distância de pulverização foi um fator relevante para o tamanho das partículas (Tabela 3). Houve diminuição significativa de todos os índices analisados ($D_{[4,3]}$, D_{50} e PDI) das amostras preparadas a 25 cm em relação à 20 cm e 0,25 bar. A maior distância permitiu a formação mais homogênea das gotas antes de tocarem a interface do meio reticulante,

resultando em partículas mais uniformes e de menor tamanho.

De modo oposto, as amostras produzidas a 0,50 bar não apresentaram diferença significativa quando alterada a altura de pulverização, entretanto nota-se ligeira diminuição de tamanho do $D_{[4,3]}$ (exceto para 0,5-0,25-6, na qual foi observada fenômeno de agregação na microscopia óptica (dados não mostrados)).

Em geral, observa-se que o tamanho de partícula diminui com o aumento de pressão (exceto para 0,25-25-3), devido à velocidade de rompimento da tensão superficial entre o fluxo de solução de alginato e o ar durante a formação das gotas, resultado este que também foi observado por Smrdel e colaboradores (2008).

Tabela 3: Tamanho de partícula das amostras recém preparadas.

Amostra	$D_{[4,3]}$ μm	D_{50} μm	PDI
0,25-20-3	146,29 \pm 13,19 ^a	68,79 \pm 3,98 ^a	5,79 \pm 0,32 ^a
0,25-20-6	97,55 \pm 3,63 ^c	54,98 \pm 1,47 ^b	4,01 \pm 0,12 ^{de}
0,25-25-3	83,06 \pm 2,51 ^d	40,79 \pm 0,35 ^f	4,97 \pm 0,32 ^b
0,25-25-6	89,03 \pm 0,33 ^d	51,38 \pm 0,56 ^d	3,77 \pm 0,05 ^{df}
0,50-20-3	85,49 \pm 4,81 ^d	50,88 \pm 0,82 ^d	3,47 \pm 0,30 ^d
0,50-20-6	91,18 \pm 8,41 ^{cd}	51,89 \pm 2,15 ^{bcd}	4,03 \pm 0,42 ^d
0,50-25-3	84,20 \pm 3,20 ^d	53,98 \pm 0,69 ^{bc}	3,12 \pm 0,20 ^{dg}
0,50-25-6	138,15 \pm 6,78 ^{ab}	70,45 \pm 1,97 ^{ae}	4,86 \pm 0,19 ^{bc}

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa $p < 0,05$

Para a polidispersidade, as partículas produzidas com maior pressão de ar apresentaram PDI significativamente menores,

em especial para as amostras de 3 % m/m de CaCl_2 , indicando maior homogeneidade da amostra.

Morfologia: As micropartículas recém preparadas foram analisadas quanto à morfologia (Figura 1). De acordo com Hariyadi et al., (2010), devido ao impacto das gotículas de solução de alginato com a solução de reticulação, é esperado que as micropartículas apresentem formato irregular elíptico.

Para as partículas formadas em banho de CaCl_2 3% (m/m), as amostras produzidas com menor pressão de ar (0,25 bar) apresentaram morfologia irregular, maior agregação e partículas fraturadas. Esta pressão pode não ter sido suficiente para romper a tensão superficial entre o fluxo de solução de alginato e o ar durante a formação das gotas (Perrechil et al., 2012).

Em 0,50 bar observa-se maior esfericidade, em especial para as partículas 0,5-25-3, além da maior homogeneidade da amostra, o que reflete os valores obtidos de PDI (Tabela 3).

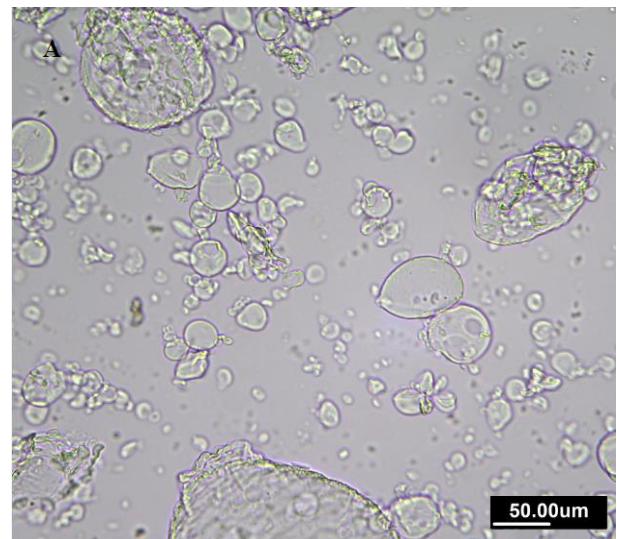




Figura 1: Morfologia das amostras. A) 0,25-20-3, B) 0,25-25-3, C) 0,5-20-3, D) 0,5-25-3

Estabilidade: Após o preparo das micropartículas, as mesmas foram incubadas em pH 2,5, pH 3,5 e pH 4,5 com o objetivo de verificar a estabilidade frente a pHs ácidos que mimetizam matrizes alimentares lácteas. Na Figura 2 é possível comparar o tamanho das

micropartículas logo após o preparo e após 4 dias.

O alginato apresenta pKa 3,4, e sua estrutura conta com a presença de grupos carboxílicos, que conferem grande sensibilidade a estímulos externos de pH. Meios com pH abaixo de seu pKa promovem insolubilidade da rede devido à forma não ionizada dos grupos carboxílicos (COOH). Entretanto, para pHs maiores que 3,4, os grupos carboxílicos tornam-se ionizáveis (COO⁻), aumentando a repulsão eletrostática das cargas negativas podendo promover inchaço da matriz hidrofílica (Agüero et al., 2017).

As amostras produzidas a 0,25 bar apresentaram diferença estatística significativa quando imergidas a diferentes pHs, sendo a amostra 0,25-25-6 a mais estável por variar apenas em pH 4,5. Quando a pressão de ar é aumentada para 0,50 bar, nota-se que, exceto para 0,5-25-3, as amostras apresentaram-se mais estáveis, em especial a 0,5-20-6, na qual não houve variação estatisticamente significativa. Ambas as amostras mencionadas como mais estáveis estatisticamente, foram produzidas em banho de CaCl₂ de 6 % (m/m). De acordo com Dodero et al., (2019) partículas formadas com alta densidade de reticulação apresentam baixa absorção de água devido à maior número de restrições entre as cadeias poliméricas. Além disso, a maior reticulação provoca também maior encolhimento das micropartículas, diminuindo a porosidade da rede e propensão ao intumescimento. A restrição das cadeias poliméricas e consequente baixa absorção de água preveniu a troca iônica destas amostras, diferente das demais em que pode ter acontecido troca iônica entre os íons Na⁺ presentes nas soluções tampão (pH 3,5 e 4,5) com os íons Ca²⁺, representando a fase inicial do processo de inchamento do gel (Bajpai & Sharma, 2004).

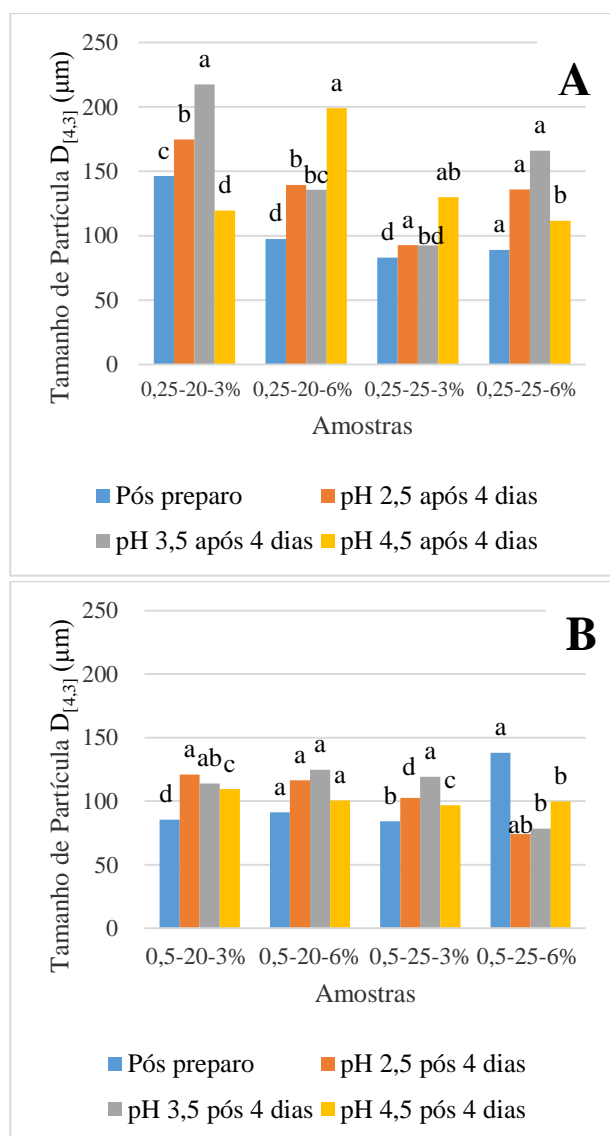


Figura 2. Estabilidade das amostras produzidas com A) 0,25 bar de pressão de atomização em pH 2,5, 3,5 e 4,5 após 4 dias de estocagem a 10 °C, B) 0,50 bar de pressão de atomização em pH 2,5, 3,5 e 4,5 após 4 dias de estocagem a 10 °C. Letras diferentes no mesmo conjunto de dados (por amostra) indicam diferença significativa $p < 0,05$.

CONCLUSÃO

A altura de 25 cm promoveu a formação de partículas de menor tamanho. Em relação à pressão de atomização, embora 0,25 bar apresente melhor rendimento, sua estabilidade frente a pHs ácidos é menor. As amostras preparadas com 0,5 bar apresentaram rendimento inferior, porém foram mais esféricas e estáveis nos diferentes pHs avaliados, o que pode ser interessante para

aplicação em alimentos ácidos, como nas condições avaliadas no presente estudo.

AGRADECIMENTOS

FAPESP (#2019/27354-3), CNPq (142480/2020-7), CAPES (#001).

Agradecemos ao suporte de Manoel Victor Frutuoso Barrionuevo na utilização do equipamento de atomização no Laboratório de Microestrutura de Alimentos – FEA – UNICAMP.

REFERÊNCIAS

- Agüero, L., Zaldivar-Silva, D., Peña, L., & Dias, M. (2017). Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. *Carbohydrate Polymers*, 168, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.033>
- Bajpai, S. K., & Sharma, S. (2004). Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions. *Reactive and Functional Polymers*, 59(2), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2004.01.002>
- Ching, S. H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2017). Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1133–1152. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.965773>
- de Moura, Sílvia C.S.R., Berling, C. L., Germer, S. P. M., Alvim, I. D., & Hubinger, M. D. (2018). Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. *Food Chemistry*, 241(May 2017), 317–327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.095>
- de Moura, Sílvia C.S.R., Schettini, G. N., Garcia, A. O., Gallina, D. A., Alvim, I. D., & Hubinger, M. D. (2019). Stability of Hibiscus Extract Encapsulated by Ionic Gelation Incorporated in Yogurt. *Food and Bioprocess Technology*, 12(9), 1500–1515. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02308-9>

- de Moura, Sílvia Cristina Sobottka Rolim, Schettini, G. N., Gallina, D. A., Dutra Alvim, I., & Hubinger, M. D. (2022). Microencapsulation of hibiscus bioactives and its application in yogurt. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(4), 1–13. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16468>
- Dodero, A., Pianella, L., Vicini, S., Alloisio, M., Ottonelli, M., & Castellano, M. (2019). Alginate-based hydrogels prepared via ionic gelation: An experimental design approach to predict the crosslinking degree. *European Polymer Journal*, 118(April), 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.06.028>
- Hariyadi, D. M., Lin, S. C. Y., Wang, Y., Bostrom, T., Turner, M. S., Bhandari, B., & Coombes, A. G. A. (2010). Diffusion loading and drug delivery characteristics of alginate gel microparticles produced by a novel impinging aerosols method. *Journal of Drug Targeting*, 18(10), 831–841. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2010.525651>
- Jones, O. G., & McClements, D. J. (2010). Functional biopolymer particles: Design, fabrication, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(4), 374–397. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00118.x>
- Leong, J. Y., Lam, W. H., Ho, K. W., Voo, W. P., Lee, M. F. X., Lim, H. P., Lim, S. L., Tey, B. T., Poncelet, D., & Chan, E. S. (2016). Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. *Particuology*, 24, 44–60. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2015.09.004>
- Perrechil, F. A., Vilela, J. A. P., Guerreiro, L. M. R., & Cunha, R. L. (2012). Development of Na-CN- κ -carrageenan Microbeads for the Encapsulation of Lipophilic Compounds. *Food Biophysics*, 7(3), 264–275. <https://doi.org/10.1007/s11483-012-9265-0>
- Srmdel, P., Bogataj, M., & Mrhar, A. (2008). The influence of selected parameters on the size and shape of alginate beads prepared by ionotropic gelation. *Scientia Pharmaceutica*, 76(1), 77–89. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0611-07>
- Smyth, H. D. C., Guzman-Villanueva, D., Herrera-Ruiz, D., & El-Sherbiny, I. M. (2011). A novel aerosol method for the production of hydrogel particles. *Journal of Nanomaterials*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/507508>
- Soliman, E. A., El-Moghazy, A. Y., El-Din, M. S. M., & Massoud, M. A. (2013). Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and <i>in Vitro</i> Evaluation of Antifungal Activity. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 03(01), 48–55. <https://doi.org/10.4236/jeas.2013.31006>
- Zhang, H., Cheng, J., & Ao, Q. (2021). Preparation of alginate-based biomaterials and their applications in biomedicine. *Marine Drugs*, 19(5), 1–24. <https://doi.org/10.3390/md19050264>