



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

CAMILA GOMES DANTAS MENESES

**CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA DA CASCA DO OVO
DE GALINHA PARA A PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS
DE HIDROGEL PELA TÉCNICA DE GELIFICAÇÃO IÔNICA**

São Cristóvão/SE

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

CAMILA GOMES DANTAS MENESES

**CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA DA CASCA DO OVO
DE GALINHA PARA A PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS
DE HIDROGEL PELA TÉCNICA DE GELIFICAÇÃO IÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Nutrição
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra
Almeida Castro Pagani.

São Cristóvão/SE

2024

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

M543c Meneses, Camila Gomes Dantas
Caraterização da membrana da casca do ovo de galinha para a produção de microcápsulas de hidrogel pela técnica de gelificação iônica / Camila Gomes Dantas Meneses ; orientadora Alessandra Almeida Castro Pagani. – São Cristóvão, SE, 2024.
56 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências da Nutrição) – Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Nutrição. 2. Proteínas. 3. Colágeno. 4. Membranas (Biologia). 5. Casca de ovo. 6. Resíduos. I. Pagani, Alessandra Almeida Castro, orient.
II. Título.

CDU 613.286:606:628.3/.4

CAMILA GOMES DANTAS MENESES

**CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA DA CASCA DO OVO DE
GALINHA PARA A PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS DE
HIDROGEL PELA TÉCNICA DE GELIFICAÇÃO IÔNICA**

Dissertação de mestrado aprovada pelo
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Nutrição 30 de janeiro de
2024.

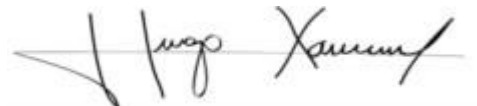
BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **ALESSANDRA ALMEIDA CASTRO PAGANI**
Data: 01/02/2024 12:38:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Alessandra Almeida Castro Pagani
Orientadora/PPGCNUT/UFS
Presidente da banca
examinadora

Documento assinado digitalmente
 **ELMA REGINA SILVA DE ANDRADE WARTHA**
Data: 01/02/2024 13:17:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Elma Regina Silva de Andrade
WarthaExaminadora interna/PPGCNUT/UFS



Prof. Dr. Hugo José Xavier Santos
Examinador externo/Universidade Tiradentes/UNIT

São Cristóvão/SE

2024

AGRADECIMENTOS

Não poderia iniciar os meus agradecimentos sem mencionar a gratidão por todos os momentos em que Deus esteve presente em minha vida. Guiando e iluminando o meu caminho durante o período em que me dediquei ao mestrado.

Ao meu marido Luan, por toda a paciência e apoio. Principalmente nos dias em que achei que não conseguiria conciliar todos os compromissos os quais estava envolvida. Por sempre acreditar em mim e me ajudar a conquistar esse título.

Aos meus pais, Eduardo e Eliane, e irmãos, Carolina e Pedro, por todo o incentivo e amor. Em especial, minha irmã Carolina que sonhou comigo antes mesmo de eu tomar a decisão de me inscrever no programa.

Agradeço com muita admiração e carinho à minha orientadora, Profa. Dra. Alessandra Almeida de Castro Pagani, pela serenidade na orientação, por sempre me encorajar ao longo desses 30 meses e pela compreensão nos momentos em que eu não podia estar tão presente quanto gostaria.

Às técnicas, Aline e Patrícia, do Departamento de Tecnologia de Alimentos por me ajudarem em todas as dúvidas referentes às metodologias da pesquisa. Após dez anos de formada, não teria conseguido sozinha.

À Jordana, amiga que o mestrado me presenteou, pela disponibilidade e ajuda naqueles momentos que a gente pensa em “sentar e chorar”. Do início ao fim você sempre esteve presente, mesmo a quilômetros de distância, tornando essa vivência divertida e possível.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição da Universidade Federal de Sergipe e todos os professores que o compõem por todo o aprendizado. As experiências vividas estarão guardadas em meu coração.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste estudo. Muito obrigada!

MENESES, C. G. D. Caracterização da membrana da casca do ovo de galinha para a produção de microcápsulas de hidrogel pela técnica de gelificação iônica. [Dissertação]. São Cristóvão: Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição. Universidade Federal de Sergipe, 2024.

RESUMO

O ovo é uma fonte de proteína acessível e sua produção no Brasil vêm crescendo ao decorrer dos anos. Esse aumento resulta na ampliação de resíduos gerados pela indústria, visto que a casca corresponde a 11% do peso total do ovo. As membranas presentes na casca do ovo se constituem de proteínas, dentre elas o colágeno, proteína fibrosa formada pelos aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina. A suplementação do colágeno é altamente indicada em razão da diminuição da sua produção natural pelo organismo ao iniciar a fase adulta. Desse modo, a membrana da casca do ovo pode ser empregada como estratégia para essa reposição, uma vez que os colágenos do tipo I, V e X estão presentes na sua composição. Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo microencapsular a membrana da casca do ovo empregando a técnica de gelificação iônica, alternativa simples e de baixo custo que irá preservar o colágeno existente na membrana. As cascas foram coletadas em uma indústria de alimentos localizada na cidade de Aracaju/SE. As membranas e microcápsulas foram caracterizadas empregando as análises físicas: rendimento, tamanho, peso, atividade de água e cor, físico-químicas: umidade, cinzas, pH, proteínas totais, colágeno, hidroxiprolina, prolina, glicina e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e análises microbiológicas quanto a contagem de coliformes termotolerantes e *salmonella* sp. As análises foram realizadas em triplicada e os valores encontrados expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Os resultados obtidos indicaram ausência de *Salmonella* em 25g de membrana e coliformes termotolerantes (<3 NMP/g) para as amostras submetidas a tratamento térmico, conforme preconiza legislação. Quanto ao rendimento do processo de retirada da membrana, o mesmo apresentou valor favorável (13.07%), o que torna o seu reaproveitamento viável. Ao avaliar os resultados das proteínas totais e de colágeno da microcápsula ($1.18\% \pm 0.04$ e $0.65\% \text{ p/p}$) em comparação com os da membrana ($86.80\% \pm 2.17$ e $8.17\% \pm 0.25 \text{ p/p}$) foi identificada a necessidade de ofertar um novo meio de armazenamento da membrana visando o maior aproveitamento nutricional. Portanto, foi encapsulado 100 mg da membrana da casca do ovo em cápsula de gelatina incolor nº1. Os resultados da quantificação dos aminoácidos presentes na membrana foram de hidroxiprolina ($1.02\% \pm 0.02 \text{ p/p}$), prolina ($10.3\% \pm 0.12 \text{ p/p}$) e glicina ($4.72\% \pm 0.02 \text{ p/p}$). Por fim, a análise de FTIR evidenciou a presença de aminas e amidas na partícula da membrana da casca do ovo. Esse estudo resultou na elaboração de um novo produto com alto valor nutricional, encorajando a indústria alimentícia e/ou farmacêutica para o desenvolvimento de novos produtos com valor agregado.

Palavras-chaves: membrana do ovo; resíduo; proteínas; colágeno.

MENESES, C. G. D. Preparation of Hydrogel Microcapsules from Chicken Eggshell Membrane using the Ionic Gelation Technique. [Dissertation defense]. São Cristóvão: Graduate Program in nutrition sciences. Federal University of Sergipe, 2024.

ABSTRACT

Eggs are an affordable source of protein and their production in Brazil has increased over the years. Example: Egg consumption as a cost effective proteine source has seen a market rise in recent years. This growth has led to an increase in waste from the industry, primarily from eggshells, which make up to 11% of an egg's total weight. Along with the shells, the membranes have nutritional value as they are sources of proteins, including collagen, a fibrous protein formed by the amino acids glycine, proline and hydroxyproline. Collagen supplementation is highly recommended due to the decrease in its natural production by the body at the beginning of adulthood. The eggshell membrane can be used as a strategy for this replacement, since type I, V and X collagens are present in its composition. In this context, this study aimed to microencapsulate the eggshell membrane using the ionic gelation technique, a simple and low-cost alternative that will preserve the existing collagen in the membrane. The eggshells were collected in a food industry located in the city of Aracaju/SE. The membranes and microcapsules underwent comprehensive characterization, including physical analyses (yield, size, weight, water activity, and color), physical-chemical analyses (moisture, ash, pH, total proteins, collagen, hydroxyproline, proline, glycine), as well as Infrared Spectroscopy with Transformation Fourier (FTIR), and microbiological analyses for thermotolerant coliforms and *Salmonella* spp. The analyzes were carried out in triplicate and the values found were expressed as the mean $\pm$ standard deviation. The results obtained indicated the absence of *Salmonella* in 25g of membrane and thermotolerant coliforms (<3 MPN/g) for samples subjected to heat treatment, as recommended by legislation. As for the yield of the membrane removal process, it presented a favorable value (13.07%), which makes its reuse viable. When evaluating the results of total and collagen proteins of the microcapsule ($1.18\% \pm 0.04$ and 0.65%) compared to those of the membrane ($86.80\% \pm 2.17$ and $8.17\% \pm 0.25$) the need to offer a new means of storing the membrane was identified, aiming for greater nutritional use. Therefore, 100 mg of eggshell membrane was encapsulated in colorless gelatin capsule nº1. The results of the quantification of amino acids present in the membrane were hydroxyproline ($1.02\% \pm 0.02$), proline ($10.3\% \pm 0.12$) and glycine ($4.72\% \pm 0.02$). Finally, FTIR analyzes showed the presence of amines and amides in the eggshell membrane particle. This study resulted in the development of a new product with high nutritional value, encouraging the food and/or pharmaceutical industry to develop new products with added value.

Keywords: egg membrane; residue; proteins; collagen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Morfologia de membrana de casca de ovo por micrografia eletrônica de varredura: (A) – Fibras da membrana interna (ISM), fibras da membrana externa (OSM) e pontos de fixação dos corpos mamilares (MB), e (B) – Membrana limitante (que circunda a clara do ovo) (LM).....	18
Figura 2 - Membrana externa da casca e membrana interna da casca.....	18
Figura 3 - Tripla hélice composta pelos aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina, formando a fibra de colágeno que resultará no feixe.....	23
Figura 4 - Modelos de microcápsulas.....	25
Figura 5 - Métodos comuns para perda da integridade de partículas.	25
Figura 6 - Resíduos dos ovos utilizados na produção de bolos comerciais.....	28
Figura 7 - Obtenção da membrana externa da casca de ovo de galinha: Limpeza em água corrente (A); retirada manual da membrana (B) e limpeza final das membranas extraídas da casca (C).....	28
Figura 8 - Amostra após processo de esterilização em Autoclave.	29
Figura 9 - Membrana externa da casca de ovo de galinha em pó.....	30
Figura 10 - Obtenção de microcápsulas da membrana externa de ovo de galinha: (A) - Processo de gotejamento; (B) drenagem das microcápsulas; e (C) armazenamento.....	31
Figura 11 - Obtenção de cápsulas da membrana externa de ovo de galinha.....	31
Figura 12 - Medição do tamanho de microcápsula obtida de membrana externa de ovo de galinha, utilizando paquímetro digital.	32
Figura 13 - Curva Padrão.	35
Figura 14 - Microcápsulas obtidas de membrana externa de ovos de galinha.	39
Figura 15 - Comparação cor e índice de escurecimento de membrana exterior de ovo de galinha com as microcápsulas obtidas (A) pelas coordenadas CIELAB no espaço de cores (B).	40
Figura 16 - Cápsula da membrana da casca do ovo.	42
Figura 17 - Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análises microbiológicas de membrana externa extraída da casca de ovo de galinha sem e com tratamento térmico.....	37
Tabela 2 - Rendimento da retirada da membrana externa de ovo de galinha e do processamento de microcápsulas.....	38
Tabela 3 - Caracterização física de membrana externa de ovos de galinha e de microcápsulas obtidas.....	39
Tabela 4 - Caracterização físico-química de membrana externa de ovo de galinha e microcápsulas obtidas.....	40
Tabela 5 - Quantificação das proteínas (totais e colágeno) presentes nas membranas, microcápsulas e cápsulas.	41
Tabela 6 - Quantificação do aminoácido Hidroxiprolina presente nas membranas, microcápsulas e cápsulas.	44
Tabela 7 - Perfil de aminoácidos (Prolina e Glicina) da membrana da casca do ovo.	44
Tabela 8 - Grupamento químico das membranas da casca do ovo, do alginato e das microcápsulas em função das bandas de absorção.	46

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Rendimento das membranas.....	31
Equação 2 - Rendimento das microcápsulas.	32
Equação 3 - Determinação de umidade	33
Equação 4 - Determinação de cinzas.....	33
Equação 5 - Determinação de proteínas	34
Equação 6 - Determinação de hidroxiprolina	35
Equação 7 - Determinação de colágeno	36

LISTA DE SIGLAS

A	Coordenada vermelho/verde
APHA	American Public Health Association
A _w	Atividade de água
B	Coordenada amarelo/azul
CIE	Comissão Internacional da Iluminação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAR	Estimated Average Requirement
ES	Casca do ovo
ESM	Membrana da casca do ovo
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
H	Ângulo de cor
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IAL	Instituto Adolfo Lutz
INIAP	Instituto Nacional de Investigações Agropecuárias
ISO	International Organization for Standardization
ITPS	Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe
L	Luminosidade
LQ	Limite de Quantificação do Método
NASEM	National Academies of Sciences, Engineering and Medicine
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	Peso corporal
pH	Potencial Hidrogeniônico
RDA	Recommended Dietary Allowances
TT	Tratamento térmico
UB-B	Raios Ultravioletas B
UE	União Europeia

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrômetro
μg	Micrograma
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
M	Concentração Molar
NaOH	Hidróxido de sódio
H_3BO_3	Ácido Bórico
ppm	Partes por milhão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
mg	Miligrama
g	Gramma
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
ml	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
p/p	Valor em grama da substância por 100 gramas da amostra
N	Nitrogênio
H	Hidrogênio
C	Carbono
O	Oxigênio
CH_2	Metileno
CH_3	Metil

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 A produção de ovos e resíduos resultantes do processamento industrial	16
2.2 Membrana da casca do ovo de galinha: características biológicas, nutricionais e perspectivas de emprego como recurso natural.....	17
2.3 Proteína.....	19
2.4 A importância do colágeno presente na membrana da casca de ovo de galinha e a suscetibilidade a condições adversas	21
2.5 Microencapsulação	24
2.5.1 Gelificação Iônica.....	26
2.5.2 Alginato de sódio.....	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Materiais	28
4.2 Métodos	29
4.2.1 Análises microbiológicas das membranas	29
4.2.2 Obtenção das microcápsulas e cápsulas da membrana da casca do ovo	29
4.2.3 Análises físicas da membrana e da microcápsula.....	31
4.2.3.1 <i>Rendimento</i>	31
4.2.3.2 <i>Tamanho da microcápsula</i>	32
4.2.3.3 <i>Peso da microcápsula</i>	32
4.2.3.4 <i>Atividade de água</i>	32
4.2.3.5 <i>Cor</i>	32
4.2.4 Análises físico-químicas da membrana e da microcápsula	33
4.2.4.1 <i>Teor de umidade</i>	33

4.2.4.2 Teor de cinzas.....	33
4.2.4.3 Determinação do pH	33
4.2.4.4 Proteínas totais.....	33
4.2.4.5 Teor de Hidroxiprolina.....	34
4.2.4.6 Teor de Colágeno	35
4.2.4.7 Análise de aminoácidos, glicina e prolina, da membrana da casca do ovo	36
4.2.4.8 FTIR.....	36
4.2.5 Análise Estatística.....	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Microcápsulas de membrana de ovo: rendimento, caracterização física e físico-química.	37
5.2 Quantificação de proteínas totais e colágeno	41
5.3 Quantificação da hidroxiprolina e determinação do perfil de aminoácidos por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)	44
5.4 Identificação do perfil de aminoácidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	45
6 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO	57

1 INTRODUÇÃO

O ovo é uma fonte de proteína de elevado consumo pelo fato de ter preço mais acessível, quando comparado a outras proteínas de origem animal. Ademais, a industrialização de ovos possibilita diversas vantagens tanto econômicas quanto relacionadas ao transporte e conservação, contudo, devido à essa prática, um número elevado de resíduos é gerado visto que a casca do ovo corresponde a 11% do peso total do ovo (OLIVEIRA et al, 2013).

O resíduo não comestível representado pela casca do ovo é um subproduto de pouco valor vendável. Além da casca calcificada estão presentes as membranas, que são divididas em externa, interna e limitante, cuja exerce importante função de evitar a penetração de bactérias, sendo indispensáveis à formação da casca do ovo (NAKANO et al, 2003). As membranas contêm valor nutricional por serem fontes de proteínas combinadas, elastina, colágeno, glucosamina, condroitina e ácido hialurônico (HEWLINGS et al, 2019).

Nesse contexto, a possibilidade do consumo das membranas como estratégia potencial para prevenir a baixa ingestão de proteínas pode ser favorável. De acordo com Zhao et al, (2019), este subproduto é uma fonte de proteína de alta qualidade, visto que demonstrações clínicas mostram a sua relação com o alívio da inflamação nas articulações, a cicatrização de feridas, a eliminação de radicais livres, a proteção de DNA, o clareamento da pele e a proteção da derme contra as rugas.

O colágeno é uma proteína fibrosa com cadeias peptídicas de aminoácidos (unidade tripeptídica composta por glicina, prolina e hidroxiprolina) que tem a função de contribuir com a integridade estrutural dos tecidos no organismo em que está presente (SILVA; PENNA, 2012). Ao iniciar a fase adulta, a suplementação do colágeno é indicada, pois sua produção natural é diminuída, logo as membranas presentes na casca do ovo podem ser usadas como alternativa em virtude do colágeno (WONG et al, 1984; ARIAS et al, 1992).

A membrana da casca do ovo não é constituída apenas de colágeno, entretanto os tipos I, V e X estão presentes de forma significativa (NAKANO et al, 2003). Segundo Du et al. (2015), os colágenos dos tipos I (presente na pele, no tendão, nos ossos e na dentina) e V (distribuído no pulmão, na córnea, nos ossos e nos tecidos fetais) aparecem em menor proporção e expressam em torno de 0,6% da proteína da membrana. No entanto, o tipo X tem maior participação e consiste em uma molécula de cadeia curta que colabora para a integridade estrutural, ou seja, é de suma importância na formação da cartilagem (OLIVEIRA et al, 2017).

O consumo de colágeno traz diversos benefícios, como: melhora a firmeza da pele, previne o envelhecimento (devido à sua ação antioxidante), protege as articulações, auxilia no tratamento da osteoporose, é anti-hipertensivo e protege contra úlceras-gástricas. As fibras do

colágeno são consideradas ótimas opções, elas atuam no trato gastrointestinal, mantendo o seu funcionamento normal, previnem a constipação e induzem à saciedade, quando consumidas junto às refeições (SILVA e PENNA, 2012).

Uma forma de ofertar o colágeno da membrana da casca do ovo é através do processo de microencapsulação. Consiste em um método confiável capaz de melhorar o tempo de retenção do nutriente no alimento e preservar a estabilidade dos compostos bioativos durante o processamento e armazenamento, além de retardar os processos de degradação como por exemplo, a oxidação e hidrólise (AGUIAR et al, 2016), aumentando a vida útil do produto (BASU et al, 2018). Conforme Strobel (2020), a gelificação iônica é um processo de encapsulação simples e de baixo custo.

A reflexão acerca da sustentabilidade estimula a criação de novas formas de reaproveitamento dos resíduos gerados pelo homem. Quanto menor for a produção de lixo, maior será a preservação do meio ambiente. Portanto, o projeto em questão visa encontrar uma nova opção de reaproveitamento de um dos resíduos provocados pelo processamento industrial do ovo, como forma de minimizar os impactos ambientais, gerando um novo produto com agregação de valor.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A produção de ovos e resíduos resultantes do processamento industrial

Ao decorrer dos últimos anos, a indústria tem atraído atenção especial por ser uma fonte preocupante de poluição do meio ambiente. O fato de produzir um alto volume de resíduos, sejam eles sólidos ou líquidos, tem despertado nas autoridades a preocupação com a forma de descarte escolhida por esse setor. Uma vez que, o despojamento do material restante pode resultar não só em contaminações dos recursos hídricos e poluição do meio ambiente como também pode vir a causar riscos à saúde pública (FREIRE e HOLANDA, 2006).

Ao analisar a produção nacional de ovos do Brasil, que correspondeu em 2020 a 53,533 bilhões de unidades (EMBRAPA, 2021), é possível concluir que há geração de elevado quantitativo de material restante oriundo do seu consumo, haja vista que, a casca do ovo representa 11% do seu peso total. Uma grande parte desses resíduos resultam de processos industriais e são utilizados na agricultura para corrigir o pH de solos ácidos. Contudo, mesmo gerando retorno econômico, o quantitativo remanescente ainda não é valorizado (OLIVEIRA et al, 2013).

O quantitativo alto de cascas de ovos gerado anualmente é preocupante pois mesmo sendo um material natural, que não apresente perigo no momento do descarte, o fato dele ser despejado no meio ambiente gera um problema de suma importância. Essa atitude impensada além de poluir o meio ambiente irá propiciar o desenvolvimento de ratos e vermes devido à matriz proteica orgânica presente que irá afetar a saúde pública do local (FREIRE e HOLANDA, 2006).

A importância da gestão da parcela residual de ovos utilizados na indústria torna-se pertinente, visto que, esse material está disponível de forma abundante, por ser subproduto comum em todo o mundo, e, mesmo sendo biodegradável, pode causar riscos ambientais quando depositado em grandes quantidades (GURU e DASH, 2014). Considerando o elevado descarte da casca do ovo, o emprego na produção um novo produto torna-se alternativa promissora.

No momento atual, a legislação ambiental em diversos locais do mundo tem pressionado às empresas que se responsabilizem pelos resíduos gerados nos seus processos e criem protocolos corretos para o descarte daquilo que for restante ao finalizar a sua produção. Essa dura fiscalização tem incentivado um olhar diferenciado ao material que antes era descartado sem a devida atenção. Com isso, um grande número de novos produtos tem surgido com a intenção de agregar valor a esses resíduos (CUNHA et al, 2019).

2.2 Membrana da casca do ovo de galinha: características biológicas, nutricionais e perspectivas de emprego como recurso natural

Os ovos de galinha têm pertencido à dieta de muitas culturas ao longo dos séculos e sempre foram bem aceitos. Algumas culturas inclusive possuem o hábito de ingerir as cascas e membranas da casca do ovo (RUFF et al, 2012).

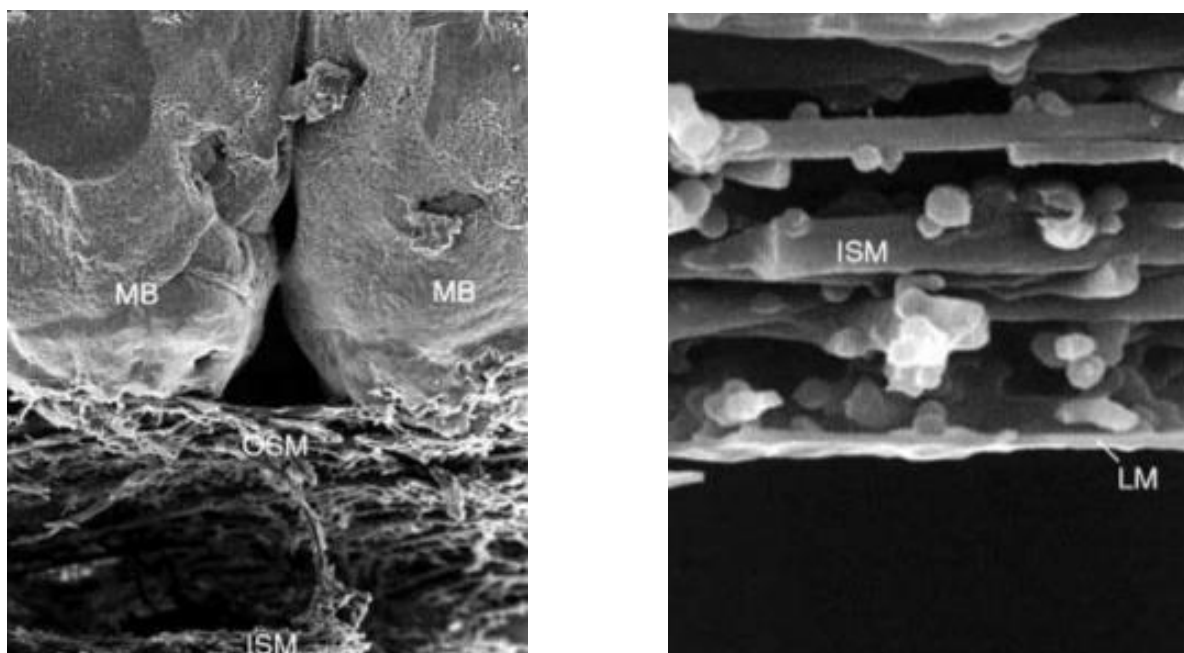
O ovo é composto por diversas partes, as principais são: casca, membranas da casca, gema e clara (também conhecida como albúmen). Há também as partes que estão presentes em menor volume, como por exemplo: o disco germinativo, as calazas, a cutícula e a câmara de ar (MEDEIROS; ALVES, 2014). Cerca de 10% do peso total do ovo é formado pela casca e as membranas, que têm a propriedade de evitar a contaminação por bactérias além de garantir a durabilidade da casca (CORDEIRO; HINCKE, 2011).

Analisando de outra perspectiva, as membranas da casca do ovo possuem potencial como biomaterial útil e são disponíveis em grandes quantidades como um produto residual da indústria de processamento de ovos (DU et al, 2015). Pesquisadores têm dado atenção a este subproduto uma vez que, de acordo com Zhao et al, (2019), a membrana da casca do ovo é uma fonte de proteína de alta qualidade, visto que há relação com o alívio da inflamação nas articulações, a cicatrização de feridas, a eliminação de radicais livres, a proteção de DNA, o clareamento da pele e a proteção da derme contra as rugas.

As membranas da casca do ovo são divididas em membrana externa, membrana interna e membrana limitante. É possível separar de forma mecânica as membranas interna e limitante entretanto a membrana externa é retirada da casca do ovo de forma mais eficaz utilizando tratamento ácido: HCl, EDTA ou até mesmo o ácido acético diluído, (BALAZ, 2014).

As membranas são filamentos unidos por ligamentos de interconexão que dão origem a uma malha fibrosa retiforme e estão localizadas em níveis paralelos à casca do ovo (HINCKE et al., 2000). Ou seja, no alto da clara do ovo encontra-se uma fina faixa que é denominada membrana interna, que permanece incalcificada, e unido à concha é possível localizar a membrana externa (Figura 1A), que em alguns locais torna-se mineralizada por ser pontos de fixação dos corpos mamilares da superfície interna da concha calcificada (Figura 1B (DU et al., 2015; HINCKE et al, 2000).

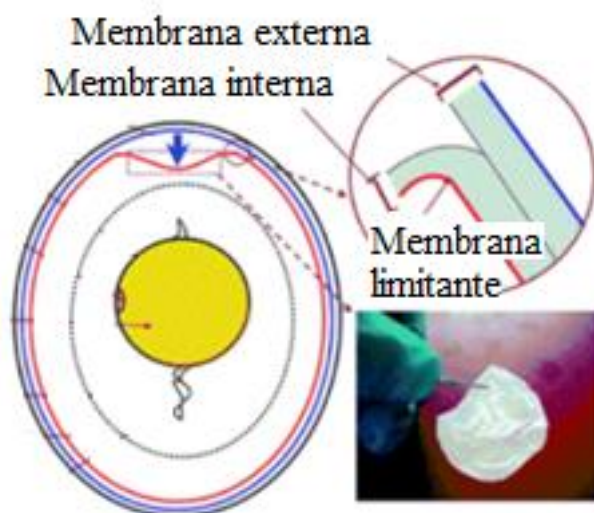
Figura 1- Morfologia de membrana de casca de ovo por micrografia eletrônica de varredura: **(A)** – Fibras da membrana interna (ISM), fibras da membrana externa (OSM) e pontos de fixação dos corpos mamilares (MB), e **(B)** – Membrana limitante (que circunda a clara do ovo) (LM).



Fonte: Adaptado de Hincke et al (2000).

Apartir da figura 2, é possível identificar a disposição das membranas na estrutura do ovo. A membrana externa está localizada próxima aos cones mamilares e tem espessura de 1 a 7 μm . No entanto, a membrana interna tem menor dimensão, com espessura de 0,1 a 3 μm , e é separada da membrana externa por um espaço preenchido com ar. Por fim, a membrana limitante, representada é uma estrutura muito fina que contorna a clara do ovo preenchendo os espaços entre as fibras da membrana interna (BALÁZ, 2014).

Figura 2 - Membrana externa da casca e membrana interna da casca.



Fonte: Adaptado de Baláz (2014).

As membranas são fonte natural de proteína combinada, elastina, colágeno, glucosamina, condroitina e ácido hialurônico (HEWLINGS et al, 2019). Segundo Mohammadi et al (2016), o colágeno representa 10% do total de proteínas presentes na membrana e essa característica incentiva a produção de diversos estudos com o intuito de respaldar o seu uso tanto para fins estéticos como para aqueles relacionados à qualidade de vida do homem. Um exemplo é o estudo de Hewlings et al. (2019), que resultou no aumento da capacidade física e melhoria na sensação de rigidez, em pacientes entre 35 e 65 anos, com osteoporose do joelho, ao consumir 450 mg, por dia, da membrana da casca do ovo solúvel em água, durante 85 dias.

Outro estudo também concluiu que o consumo da membrana da casca do ovo resulta no alívio da dor articular e rigidez em indivíduos com osteoartrite e melhora significativamente os aspectos da artrite inflamatória (WEDEKIND et al, 2017). Cao et al (2008) também estudaram os benefícios do consumo da membrana da casca do ovo e concluíram que o seu consumo resulta no efeito clareador da pele devido às atividades inibidoras de tirosinase e oxidantes de L-DOPA e possui efeitos cicatrizantes. Em síntese, Lee et al (2008) demonstraram que a membrana da casca do ovo hidrolisada é eficaz na diminuição da inflamação celular e da pele além de efeito antibiótico.

Com relação aos efeitos de citotoxicidade, genotoxicidade, toxicidade oral aguda e toxicidade oral dose repetida (90 dias), Ruff et al (2012) avaliaram um produto derivado da membrana da casca do ovo e concluíram que o produto é seguro como suplemento para consumo humano em níveis até 500mg/dia e um potencial ingrediente dietético composto de proteínas essenciais para manter as articulações e tecidos conjuntivos saudáveis. Além dos benefícios citados, a membrana da casca do ovo (quando suplementada 450mg/d por 12 semanas) está associada à melhora da aparência da pele e dos cabelos de acordo com Kalman e Hewlings (2020).

Segundo Yoo et al (2015), a membrana da casca do ovo aumenta a atividade celular e a produção de colágeno, previne o envelhecimento cutâneo e atenua as rugas induzidas pela radiação UV-B. Por conseguinte, as membranas da casca do ovo de galinha são subprodutos sem utilização que possuem potenciais características nutricionais, dado que o principal componente da membrana é a proteína (sendo o colágeno a que se encontra em maior disponibilidade) portanto o seu consumo é uma maneira eficaz de aumentar a ingestão deste macronutriente.

2.3 Proteína

As proteínas são macromoléculas constituídas por um conjunto de aminoácidos ligados entre si, fundamentais para a estrutura e função celular. Diversas são as funções das proteínas

no organismo, eis que desempenham inúmeras atribuições para o ser vivo, por ser constituintes básicos das fibras musculares, cabelo, ossos, dentes e pele, além de ajudar a formar imunoglobulinas para prevenir e combater infecções, dentre outras funções primordiais e essenciais para o corpo humano (MAIA, 2023).

Dada a importância da ingestão proteica, é importante que o consumo da proteína seja estimulado e facilitado a toda população. Para tanto, a proteína do ovo tem extrema relevância e precisa ser difundida, haja vista ser uma das fontes de proteína animal mais abundantes, além de ser uma proteína de menor custo, tornando-se acessível para grupos de baixo poder aquisitivo (PUGLISI; FERNANDEZ, 2022).

Na faixa etária de 40 a 70 anos, o consumo energético dos adultos diminui cerca de 25% podendo levar ao aumento na incidência da desnutrição. Estudos demonstram que a população idosa tem o seu consumo proteico diminuído devido a desafios como características sensoriais, habilidades físicas envolvidas no preparo e na compra de alimentos, a capacidade alimentar: morder, mastigar ou engolir e a relação custo-benefício. Em consonância o consumo de alimentos ricos em proteínas é aumentado na população mais jovem devido ao conhecimento nutricional e dos benefícios relacionados ao seu consumo (HEUVEL et al, 2018).

Caso a diminuição da ingestão de proteínas esteja associada ao sedentarismo, à resistência anabólica (menor sensibilidade do músculo esquelético aos aminoácidos ou proteínas dietéticas) e a deficiência de vitamina D, o idoso pode desenvolver a sarcopenia que está relacionada com a perda de massa muscular e perda de função o que pode exacerbar doenças crônicas como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e algumas formas de demência, principalmente o Alzheimer.

Em concordância com Heuvel et al (2018), os quais avaliaram a ingestão habitual de ovos em 230 pessoas com mais de 55 anos, foi possível concluir que o consumo varia de 1 a 89 com média de 18 (± 13) ovos/mês e que o maior consumo está relacionado de forma significativa com o sabor e a preferência pelo consumo do alimento além de ser considerado um alimento do cotidiano também foi possível comprovar que o seu consumo tende a diminuir com o envelhecimento. Dessa maneira, os idosos tendem a comer mais ovos quando comparados a outras fontes de proteínas sendo interessante investir em tecnologias que diversifiquem e incentivem o seu consumo.

A baixa ingestão de proteínas não é um problema presente apenas na população idosa, em muitos países subdesenvolvidos não há a introdução precoce da proteína o que leva ao desenvolvimento do Kwashiorkor, desnutrição ligada à baixa ingestão de proteínas que acarreta diversos problemas no desenvolvimento da criança. Portanto, o consumo de ovos pode auxiliar

na redução da prevalência de baixa estatura e baixo peso em crianças além de melhorar a composição de nutrientes do leite materno quando o consumo é feito pela nutriz (HEUVEL et al, 2018).

Por outro lado, o excesso do consumo de gorduras saturadas e carboidratos tem levado ao aumento da prevalência da obesidade. Como também a perda significativa de massa muscular e a elevação de massa gorda definida como obesidade sarcopênica. Uma vez que 73% dos americanos adultos estão acima do peso ou obesos, é de suma importância o incentivo do consumo de alimentos que possua proteínas de alta qualidade, assim como valor calórico moderado/baixo e que promova a saciedade (HEUVEL et al, 2018). De acordo com a OMS, os ovos são a fonte de proteína mais digerível (97%) quando comparados aos laticínios (95%), as carnes (94%) e as proteínas vegetais (45-80%).

Devido às evidências de benefícios à população, em especial para prevenir desnutrição, sarcopenia e no controle da obesidade, há a necessidade de promover o aumento do consumo de ovos, em especial aos grupos socioeconômicos que vivem na pobreza e conscientizá-las sobre os benefícios e o custo reduzido dessa proteína notavelmente completa. Um grande auxiliar para obtenção de maior ingestão proteica, aliado ao baixo custo do tratamento, é a possibilidade de encapsular as proteínas do ovo, pelo que se mostra de grande utilidade para o campo alimentício e farmacêutico (ZHANG et al, 2023).

Nesse toar, pode-se resumir que o ovo fornece uma rica fonte de proteína animal completa, com todos os aminoácidos essenciais, reconhecida pelo seu alto valor biológico e biodisponibilidade, sendo essa proteína primordial para a estrutura biológica do organismo. Por essa razão, o encapsulamento de proteínas é uma área de interesse crescente, a fim de facilitar o consumo ideal da proteína.

2.4 A importância do colágeno presente na membrana da casca de ovo de galinha e a suscetibilidade a condições adversas

Atualmente tem crescido o número de pessoas que se preocupam em melhorar seus hábitos alimentares como estratégia para evitar o surgimento precoce de doenças degenerativa ou até mesmo para cuidar da estética. Com isso, os alimentos funcionais, que contêm ingredientes com características terapêuticas, têm recebido uma grande atenção dos pesquisadores, tal como proteínas, fibras alimentares, prebióticos, probióticos, simbióticos, fitoquímicos, peptídeos, carotenoides, oligossacarídeos e ácidos graxos poliinsaturados (SILVA; PENNA, 2012).

O processo de envelhecimento modifica as características intrínsecas e extrínsecas do indivíduo, a densidade do colágeno da derme tende a diminuir com o avanço da idade com isso

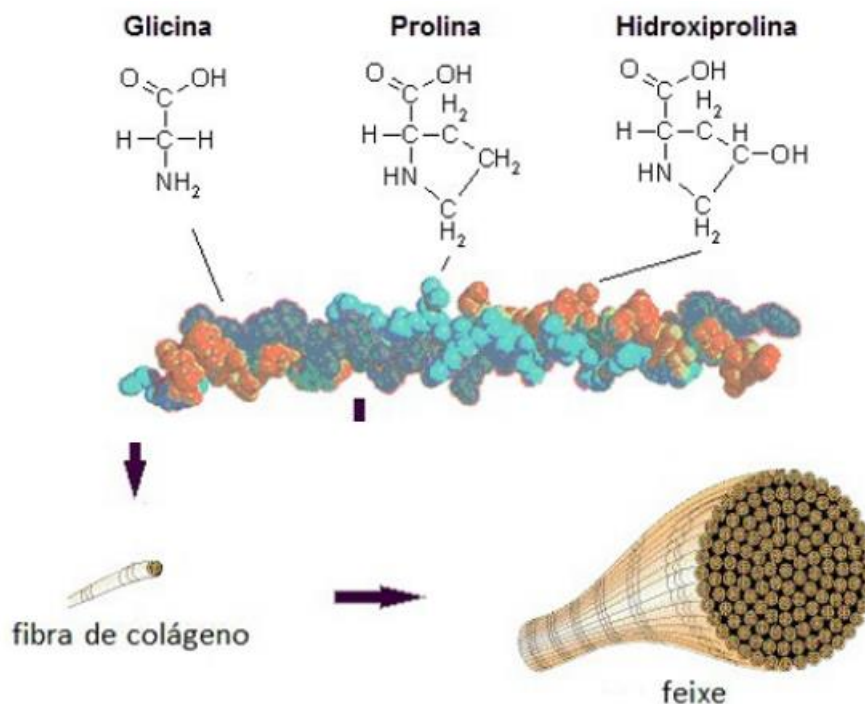
há a diminuição da espessura dérmica como também a modificação na aparência do cabelo (brilho, espessura, etc.) além de alterações moleculares que proporcionam modificações estruturais e diminuição da produção de melanina o que altera a aparência e saúde dos fios. O mesmo pode acontecer com as unhas. Por este motivo a nutrição é de suma importância para a saúde e aparência do cabelo, pele e unhas. Não apenas os alimentos como também os suplementos dietéticos têm relação com a saúde de forma geral e com a aparência física da pessoa (KALMAN; HEWLINGS, 2020).

O colágeno é uma proteína que se encontra de forma considerável e corresponde a aproximadamente 25% das proteínas totais presente nos vertebrados (OGAWA et al, 2004). Pode ser classificado como alimento funcional por ser uma proteína de origem animal que tem a função de colaborar com a integridade estrutural dos tecidos em que está presente (SILVA; PENNA, 2012). Foram identificados ao menos 29 tipos de colágenos que diferem quanto à estrutura molecular, sequência de aminoácidos e função (OLIVEIRA et al, 2017).

A membrana da casca do ovo não é constituída apenas de colágeno, entretanto os tipos I, V e X estão presentes de forma significativa (NAKANO et al, 2003). Segundo Du et al. (2015), os colágenos dos tipos I (presente na pele, no tendão, nos ossos e na dentina) e V (distribuído no pulmão, na córnea, nos ossos e nos tecidos fetais) aparecem em menor proporção e expressam em torno de 0,6% da proteína da membrana. No entanto, o tipo X tem maior participação e consiste em molécula de cadeia curta que colabora para a integridade estrutural, ou seja, é de suma importância na formação da cartilagem (OLIVEIRA et al, 2017).

A estrutura molecular do colágeno é formada por uma tripla hélice composta por três cadeias polipeptídicas. Essas cadeias são constituídas, na maioria das vezes, pelos aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina e dão origem às fibras de colágeno que conferem, à estrutura onde estão presentes, as propriedades de resistência e elasticidade (Figura 3) (MOHAMMADI et al, 2016). Dentre os aminoácidos que compõem a proteína fibrosa, a hidroxiprolina destaca-se, pois é usada como parâmetro para determinar a quantidade de colágeno presente no alimento, visto que a hidroxiprolina é um aminoácido exclusivo do colágeno (REIS et al, 1999).

Figura 3 - Tripla hélice composta pelos aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina, formando a fibra de colágeno que resultará no feixe.



Fonte: Adaptado de Silva e Penna (2012).

As ligações que estabilizam a tripla hélice sofrem mudanças quando expostas a tratamento térmico. De acordo com o estudo de Santana et al (2012), as fibras de colágeno apresentaram desordem nas suas estruturas quando submetidas a temperaturas entre 50 e 85°C no período de 20 ou 60 minutos. Outro ponto analisado foi o fato de o tratamento térmico diminuir a carga da proteína presente no material estudado e aumentar a solubilidade dessa proteína em água, que certamente resultou na diminuição das interações com o óleo.

O consumo de colágeno traz diversos benefícios, como: melhora a firmeza da pele, previne o envelhecimento (devido à sua ação antioxidante), protege as articulações, auxilia no tratamento da osteoporose, é anti-hipertensivo e protege contra úlceras-gástricas. As fibras do colágeno são consideradas ótimas opções de fibras, elas atuam no trato gastrointestinal, mantendo o seu funcionamento normal, previnem a constipação e induzem à saciedade, quando consumidas junto às refeições (SILVA e PENNA, 2012).

Ingerir o colágeno é uma alternativa prática para retardar o aparecimento de sinais da maturidade. Uma vez que, tanto o envelhecimento quanto a má alimentação ou até mesmo um estado de estresse ou doença podem afetar a produção dessa proteína. Nesses casos, é necessário optar por fontes externas, como incluir alimentos à sua dieta e/ou o uso de suplementos. A membrana da casca do ovo é uma fonte segura de colágeno visto que testes bioquímicos, de

citotoxicidade e genotoxicidade comprovam ausência de risco de reações alérgicas e autoimunes ao consumo (MOHAMMADI et al, 2016).

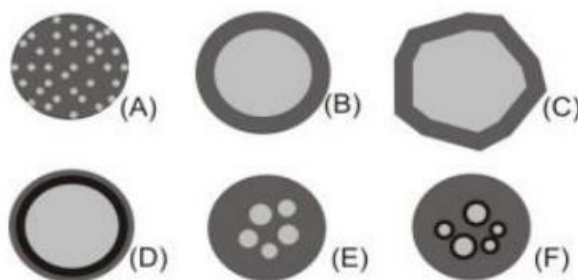
2.5 Microencapsulação

O processo de encapsulação tem como finalidade proteger compostos bioativos presentes no alimento de fatores externos, que possam influenciar na vida útil e/ou propiciar a perda de valor nutricional do produto, tal como presença de luz, altas temperaturas, água e oxigênio. Com isso, a biodisponibilidade e a estabilidade dos compostos serão preservados tanto durante o seu processamento como no período de armazenamento. Outro ponto positivo é o fato da encapsulação amenizar o sabor do componente envolvido no processo, o que facilita a sua aceitação, caso haja rejeição sensorial daquele determinado alimento (FERREIRA et al, 2021).

Encapsular é uma alternativa para preservar minúsculas partículas, denominadas de núcleo ou recheio, em cápsulas comestíveis. O elemento utilizado para a formação da microcápsula é nomeado de encapsulante ou material de parede (GIBBS et al, 1999). Um bom agente encapsulante deve possuir propriedades como: capacidade de formar filmes, ser biodegradável, ter resistência ao trato gastrointestinal, possuir baixa viscosidade em altos teores de sólidos, apresentar baixa higroscopicidade e ter custo acessível (REZENTE et al, 2018). Entretanto, é pouco provável que um agente encapsulante possua todas essas características, portanto, torna-se interessante combinar dois ou mais componentes.

As microcápsulas podem ser divididas em dois grupos. Aquelas as quais o núcleo é concentrado na região central, circundado por um filme definido, podendo ter uma ou duas paredes (Figura 4 (B); (C); (D)), e um segundo grupo representado pelas microcápsulas que possuem o núcleo uniformemente disperso resultando em microesfera, microcápsula com diversos núcleos ou agrupamento de microcápsulas (Figura 4 (A); (E); (F)) (AZEREDO, 2005). Para que o resultado do processo de encapsulação possa ser conforme o esperado, é de suma importância que a forma de liberação do núcleo, o método de encapsulação e o material encapsulante sejam escolhidos de forma planejada.

Figura 4 - Modelos de microcápsulas.

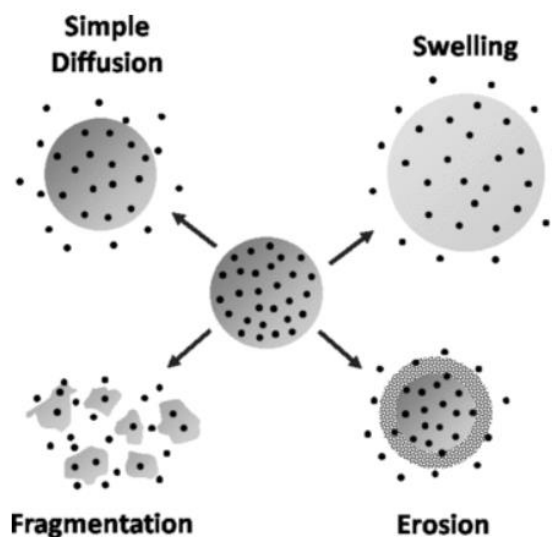


Fonte: Adaptado de Azeredo (2005).

Os modelos podem ser definidos como: (A) matriz ou microesfera; (b) microcápsula simples; (C): simples e irregular; (D) com duas paredes; (E) com vários núcleos; (F) agrupamento de microcápsulas (Figura 5) (AZEREDO, 2005).

Segundo Jones e McClements (2010), a microcápsula pode liberar o recheio por meio de diversas técnicas que irão controlar a sua liberação de acordo com o objetivo programado. O núcleo pode ser disponibilizado a partir de estresse mecânico, agitação, variação de pH, de temperatura, força iônica, força osmótica ou por atividade enzimática. A liberação controlada, que é o ato de libertar as partículas de forma lenta e programada, exige atenção, visto que, se o objetivo da encapsulação for proteger a partícula da fase inicial do processo digestivo (boca, faringe, esôfago e estômago), por exemplo, o agente encapsulante deve ser resistente às condições ácidas do estômago, de maneira que não prejudique a integridade do agente ativo (Figura 5).

Figura 5 - Métodos comuns para perda da integridade de partículas.



Fonte: Adaptado de Jones e McClements (2010).

A integridade pode ser perdida por Simple Diffusion (difusão simples), Swelling (inchaço), Fragmentation (fragmentação) ou Erosion (erosão) que resultam na disponibilização do núcleo encapsulado (Figura 6) (JONES; MCCLEMENTS, 2010).

2.5.1 Gelificação Iônica

Existem muitas técnicas que podem ser utilizadas no processo de encapsulação. A escolha do método ideal vai depender de fatores como custo, tipo do material que será encapsulado, tamanho do recheio e propriedades físicas e químicas tanto do agente ativo como do carreador. Alguns exemplos de processos físicos são: extrusão, extrusão centrífuga, spray drying, suspensão por ar, spray chilling e spray cooling. Os processos químicos podem ser realizados pelos métodos de coacervação e lipossomas. (JACKSON e LEE, 1991).

A técnica de gelificação iônica é um processo físico-químico que consiste na preparação de uma solução polimérica (contendo a substância ativa) que será gotejada, utilizando equipamento de extrusão, em uma solução iônica onde ocorrerá a reação de troca de íons resultando na formação das microcápsulas (MORAIS et al, 2015). Essa técnica é bastante utilizada na área de alimentos pois aumenta a vida útil dos compostos encapsulados, é de fácil execução, possui baixo custo e tem característica atóxica (FERREIRA et al, 2021).

2.5.2 Alginato de sódio

O agente encapsulante deve ser selecionado de acordo com a aplicação desejada, as propriedades físicas e químicas do agente ativo e do método de encapsulação escolhido. O alginato é um polissacarídeo natural e possui característica atóxica, como também, propriedade de formar filmes, estabilidade, biocompatibilidade e espessamento, além de possuir baixo custo. Esse polissacarídeo é solúvel em água, porém tem a capacidade de formar gel ao entrar em contato com íons cálcio, o que estimula a sua aplicação em sistemas de liberação controlada nos processos de microencapsulação (YANG et al, 2020).

O uso do alginato têm recebido destaque, não apenas por promover o aumento da vida útil do produto, como também devido aos benefícios decorrentes do seu consumo diário uma vez que a sua classificação nutricional (fibra insolúvel) influencia na redução do açúcar e colesterol (MORAIS et al, 2015). Diante do exposto, é possível concluir que a microencapsulação por gelificação iônica com alginato de sódio é uma alternativa eficaz para preservar compostos bioativos e aumentar a sua ingestão diária com o desenvolvimento de um novo produto.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Microencapsular a membrana da casca do ovo de galinha empregando o processo de gelificação iônica.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a existência de contaminação por microrganismos nas membranas.
- Obter as microcápsulas de hidrogel e cápsulas de gelatina.
- Caracterizar as membranas e as microcápsulas por meio de análises físicas e físico-químicas.
- Quantificar o teor de proteínas totais, hidroxiprolina e colágeno existente tanto nas membranas quanto nas microcápsulas.
- Determinar os aminoácidos prolina e glicina presentes nas membranas da casca do ovo por meio de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).
- Identificar os compostos por análise de Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das membranas e das microcápsulas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise Físico-química de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Sergipe (UFS), na cidade de São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

4.1 Materiais

As cascas de ovos brancos de galinha foram obtidas em uma Indústria de Alimentos localizada em Aracaju, Sergipe, Brasil (Figura 6).

Figura 6 - Resíduos dos ovos utilizados na produção de bolos comerciais.



Fonte: própria autora (2023).

As cascas, contendo as membranas, foram lavadas em água corrente para a retirada de resíduos de clara e gema (Figura 5A). Em seguida, as membranas foram retiradas de forma manual (Figura 5B) e, posteriormente, as membranas foram limpas novamente em água corrente (Figura 5C), para serem submetidas à análise microbiológica e desidratação.

Figura 7 - Obtenção da membrana externa da casca de ovo de galinha: Limpeza em água corrente (A); retirada manual da membrana (B) e limpeza final das membranas extraídas da casca (C).



Fonte: A e C própria autora (2023) e B, adaptada de Pagani (2019).

4.2 Métodos

4.2.1 Análises microbiológicas das membranas

Após o processo de preparo da amostra, uma quantidade correspondente a 15g das membranas foi levada ao ITPS para a realização das análises microbiológicas de coliformes a 45°C e salmonelas utilizando os métodos APHA 9:2015 e ISO 6579, respectivamente.

Outra parte das membranas, equivalente ao peso de 3,4g foi moída em processador e submetida ao processo de esterilização em autoclave (Figura 8), permanecendo por 15min a 121°C, e, em seguida, encaminhada ao ITPS, onde foi realizada a análise de coliformes a 45°C.

Figura 8 - Amostra após processo de esterilização em Autoclave.



Fonte: própria autora (2023).

Por fim, uma terceira porção da amostra, passou por processo de higienização que foi dividido em duas partes. Na primeira etapa, as membranas ficaram emergidas em solução sanitizante 200ppm (500ml de água corrente + 2,5075 g de ácido tricloroisocianúrico 3%) por 15 minutos. A etapa seguinte, denominada enxágue a 3ppm, consiste em inserir as membranas sanitizadas em solução enxaguante (500ml de água corrente + 0,0326g de ácido tricloroisocianúrico 3%) por 10 minutos. Depois de retirar o máximo de água potável, com o auxílio de uma peneira, a amostra foi colocada em estufa a 100°C para secagem por 25 minutos. Ao final no processo, a amostra (5g) foi encaminhada ao ITPS para análise de coliformes a 45°C.

4.2.2 Obtenção das microcápsulas e cápsulas da membrana da casca do ovo

As membranas, após passarem por processo de sanitização e secagem, foram moídas em moinho elétrico com o intuito de obter a sua forma em pó (Figura 9).

Figura 9 - Membrana externa da casca de ovo de galinha em pó.



Fonte: própria autora (2023).

Em seguida, ocorreu a produção das microcápsulas pela técnica de gelificação iônica por gotejamento. Foram preparadas duas soluções: solução 1 – formada por 1,510g de alginato de sódio, 1,001g da membrana da casca do ovo em pó e 150ml de água filtrada, com o auxílio de uma colher a solução 1 foi homogeneizada até apresentar aspecto de gelatina; solução 2 – solução aquosa composta por 2,040 g de cloreto de cálcio e 100ml de água filtrada.

A solução 1 foi inserida em aparelho (modelo piloto desenvolvido pela professora doutora Alessandra Pagani para a construção de um equipamento que produzirá microcápsulas em grandes quantidades e curto tempo) que, por meio da pressão exercida por motor apropriado, gotejou a solução 1 através das seringas acopladas ao local onde a solução 1 se encontrava sobre o recipiente que continha a solução 2, com isso ocorreu uma reação de troca dos íons cálcio e sódio que resultou na formação das microcápsulas (Figura 10A). Com um instrumento perfurado as microcápsulas formadas foram drenadas e imersas em um recipiente com água para a retirada de possíveis resíduos da solução 2 (Figura 10B). Após a lavagem, foram acondicionadas em potes de vidro e armazenadas sob refrigeração a 5°C (Figura 10C).

Figura 10 - Obtenção de microcápsulas da membrana externa de ovo de galinha: (A) - Processo de gotejamento; (B) drenagem das microcápsulas; e (C) armazenamento.



Fonte: própria autora (2023).

Além da produção das microcápsulas, foram produzidas cápsulas de gelatina contendo a membrana da casca do ovo em pó. Foram pesados 100 mg da membrana da casca do ovo em pó e utilizando uma encapsuladora de acrílico e uma pipeta conta gotas o quantitativo foi empacotado em cápsula de gelatina incolor nº1 (Figura 11).

Figura 11 - Obtenção de cápsulas da membrana externa de ovo de galinha.



Fonte: própria autora (2023).

4.2.3 Análises físicas da membrana e da microcápsula

4.2.3.1 *Rendimento*

Foi analisado o rendimento da retirada das membranas. No primeiro momento, as cascas dos ovos, contendo as membranas, após serem lavadas, foram pesadas e, logo após a separação, as membranas. O resultado foi calculado por meio da fórmula:

Equação 1 - Rendimento das membranas.

$$rendimento = \frac{b}{a} \times 100$$

O rendimento das microcápsulas (R) foi analisado pesando as membranas utilizadas antes do microencapsulamento e as microcápsulas após serem processadas. Com esses resultados, o valor foi calculado utilizando a seguinte equação:

Equação 2 - Rendimento das microcápsulas.

$$rendimento = \frac{c}{b} \times 100$$

4.2.3.2 Tamanho da microcápsula

O tamanho das microcápsulas foi avaliado utilizando um paquímetro digital Pantec com escala de 0 a 25 mm (Figura 12). Este procedimento foi realizado vinte vezes e o resultado obtido por média.

Figura 12 - Medição do tamanho de microcápsula obtida de membrana externa de ovo de galinha, utilizando paquímetro digital.



Fonte: própria autora (2023).

4.2.3.3 Peso da microcápsula

As microcápsulas foram pesadas em balança analítica digital marca Radwag AS 220/C/2 30g com precisão de 0,0001g. O procedimento foi realizado vinte vezes e o resultado obtido por média.

4.2.3.4 Atividade de água

A A_w foi medida por meio de leitura direta utilizando medidor eletrônico Aqualab marca 4TEV-Decagon.

4.2.3.5 Cor

A determinação da cor e índice de escurecimento foi realizada por meio das leituras obtidas utilizando o colorímetro portátil da marca Konica Minolta CR-10, de acordo com o método CIELAB.

4.2.4 Análises físico-químicas da membrana e da microcápsula

4.2.4.1 Teor de umidade

Foi determinado pelo método de secagem direta em estufa marca Biopar, a 105°C, até peso constante de acordo com o método 012/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). O valor foi encontrado por meio do cálculo:

Equação 3 - Determinação de umidade

$$\% \text{ Umidade} = \frac{100 \times N}{P}$$

Onde:

N = número de gramas da umidade, ou seja, perda da massa em gramas

P = equivale ao número de gramas da amostra

4.2.4.2 Teor de cinzas

Foi determinado pelo método de incineração em mufla marca GP Científica a 550°C descrita pela metodologia 018/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). Após a análise para determinação da umidade, os cadinhos foram colocados na chapa elétrica até a massa carbonizar, em seguida, foram incineradas na mufla a 550°C até a eliminação completa do carvão. Em seguida, foram resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente e pesadas. O resultado foi demonstrado utilizando a fórmula:

Equação 4 - Determinação de cinzas

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{100 \times N}{P}$$

Onde:

N = número de gramas de cinzas

P = número de gramas da amostra

4.2.4.3 Determinação do pH

O potencial hidrogeniônico foi determinado seguindo a metodologia 017/IV descrita por Instituto Adolfo Lutz (2008), utilizando um potenciômetro da marca Del-Lab previamente calibrado. Em seis béqueres foram pesados 1,0039g, 1,0015g e 1,0043g da membrana e 3,0862g, 3,0716g e 3,0709g da microcápsula. Em seguida, as massas foram diluídas com auxílio de 40 mL de água destilada. O pH foi determinado através da leitura dada no equipamento.

4.2.4.4 Proteínas totais

As análises de proteínas seguiram a técnica de quantificação de proteínas pelo método de Kjeldahl 036/IV, descritas no Instituto Adolfo Lutz (2008), com adaptações.

Foram pesados 0,5026g e 0,5036g da membrana e 0,5036g e 0,5019g da microcápsula em papel seda e então transferidos para os tubos Kjeldahl. Após foram adicionados 2g da mistura catalítica e 10ml de H₂SO₄ em cada tubo. A solução foi levada ao aquecimento em chapa elétrica até se tornar azul-esverdeada e livre de material não digerido. Após o resfriamento dos tubos, foram adicionadas 4 gotas do indicador fenolftaleína e 7 ml de água destilada em cada tubo e, então, foram ligados ao conjunto de destilação, a extremidade afilada do refrigerante foi mergulhada em 25 ml de H₃BO₃ 4%, que estava contido em frasco Erlenmeyer de 500 ml com 2 gotas do indicador vermelho de metila 0,25% e 2 gotas de verde de bromocresol 0,2%. A solução de NaOH a 40% foi adicionada ao tubo contendo a amostra digerida, por meio de um funil com torneira, até garantir um ligeiro excesso de base. O conteúdo foi aquecido à ebulição e destilado até obter aproximadamente 125 ml do destilado. Por fim, foi realizada a titulação das amostras contendo as membranas com solução de NaOH 0,1 M e f=0,9795 e das amostras contendo as microcápsulas com solução de NaOH 0,01M e f=0,989. As proteínas foram determinadas por meio do cálculo:

Equação 5 - Determinação de proteínas

$$\% \text{ Proteínas} = \frac{V(HCl) \times f(HCl) \times N(HCl) \times F \times 1,4}{P}$$

Onde:

V = Volume de ácido clorídrico gasto na titulação

f = Fator de correção do ácido clorídrico

F = Fator de correspondência nitrogênio-proteína (Tabela 1).

P= Peso da amostra em gramas

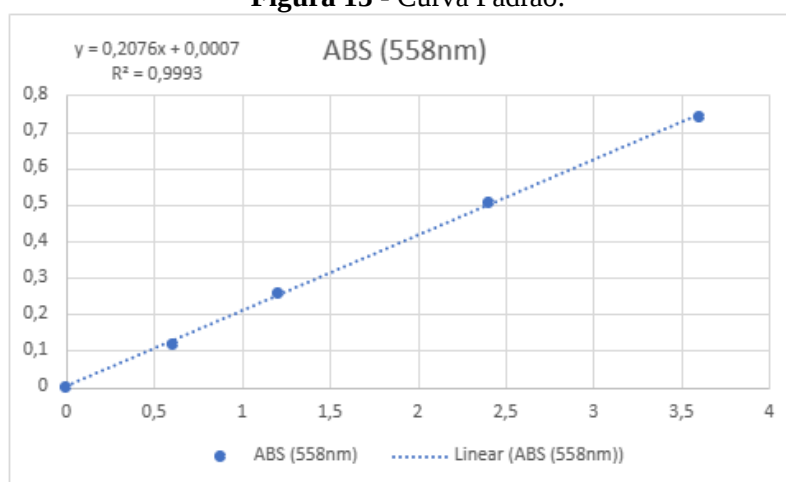
4.2.4.5 Teor de Hidroxiprolina

Foi utilizada a metodologia 282/IV Determinação espectrofotométrica de hidroxiprolina do Instituto Adolfo Lutz (2008). Foram pesados 2,0112g e 2,0035g da membrana e 2,0004g e 2,0266g da microcápsula em béqueres de 600mL. Em seguida, foi adicionado 15ml de HCl 6M e algumas pérolas de vidro a cada frasco. A solução foi aquecida à fervura branda por 8 horas sob refluxo e então o hidrolisado foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 250 ml com água destilada. O volume foi completado e agitado. A solução foi filtrada por meio de papel filtro e transferida para frasco âmbar. Foi transferido 5ml de cada filtrado da membrana para balões volumétricos de 250ml e 5ml de cada filtrado da microcápsula para balões volumétricos de 50ml. Os volumes foram completados com água destilada. Foram pipetados 2 ml da diluição final de cada amostra em tubos de ensaio e adicionado 1 ml da solução oxidante.

Os tubos foram agitados e colados à temperatura ambiente no escuro por 20 minutos. Após foi adicionado 1ml do reagente de cor e misturado vigorosamente. Cada tubo foi fechado e colocado em banho de água a 60°C por 15 minutos. Ao fim, os tubos foram resfriados em água corrente por 3 minutos. A absorbância das soluções foi medida contra o branco dos reagentes a 558 nm.

A curva-padrão foi preparada para cada série de medições. Foi transferido 2 ml de água (branco) e 2 ml de cada solução-padrão de trabalho aos tubos de ensaio e então foi realizada a adição de 1ml da solução oxidante e 1ml do reagente de cor conforme procedimento da amostra. A curva foi construída com absorbância no eixo y e concentrações de hidroxiprolina 0,3; 0,6; 1,2 e 1,8 µg/ml no eixo x (Figura 13).

Figura 13 - Curva Padrão.



Fonte: Própria autora (2023).

O cálculo utilizado para a determinação do teor de hidroxiprolina a partir dos resultados encontrados foi:

Equação 6 - Determinação de hidroxiprolina

$$\text{Hidroxiprolina em \% p/p} = \frac{A - b}{a \times p}$$

Onde:

A = absorbância do filtrado da amostra diluída 10 vezes (5mL em 50mL)

B = o coeficiente linear da reta obtida na curva padrão

a = a absorvidade, coeficiente angular da reta obtida na curva padrão

p = o peso em gramas da amostra.

4.2.4.6 Teor de Colágeno

O teor de colágeno foi encontrado a partir do teor de hidroxiprolina (H) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), seguindo o cálculo:

Equação 7 - Determinação de colágeno

$$\text{Tecido colagenoso em \% p/p} = H \times 8$$

4.2.4.7 Análise de aminoácidos, glicina e prolina, da membrana da casca do ovo

A concentração dos aminoácidos glicina e prolina foi determinada por meio de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Para esta caracterização foi utilizado o método desenvolvido por INIAP (1985), no qual a amostra da membrana foi submetida à digestão ácida com HCl 6M, por 22 horas, a 110°C. Após este período, a proteína presente na amostra foi decomposta em seus aminoácidos constituintes. A seguir, o ácido foi evaporado em rotaevaporador e o resíduo seco, contendo os aminoácidos, foi dissolvido em tampão citrato em pH 2,2 para finalmente ser injetado no equipamento de HPLC (INIAP, 1985).

4.2.4.8 FTIR

Os espectros de reflexão total atenuada na região do infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) foram obtidos no espectrofotômetro Cary 630 FTIR (Marca Agilent). A faixa espectral utilizada foi de 650 a 4000cm⁻¹, com resolução de 4cm⁻¹. Para a realização da análise de FTIR, 10µg das amostras foram espalhados sobre a superfície do cristal ATR, e, em seguida, obteve-se o espectro. Entre as amostras, o acessório ATR foi limpo com acetona PA e o espectro de fundo foi obtido.

4.2.5 Análise Estatística

As análises dos dados foram realizadas pela aplicação da ANOVA e do teste Tukey visando identificar diferenças significativas entre as médias, usando o software Assistat®, versão 7.7 beta (SILVA, 2016). O nível de significância foi considerado para a diferença entre as médias foi de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas em três repetições e os resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Microcápsulas de membrana de ovo: rendimento, caracterização física e físico-química

Após o processo de retirada das membranas, fez-se necessária a realização de análise microbiológica, cujos resultados estão ilustrados na tabela 1. A amostra sem tratamento térmico resultou em ausência de Salmonellas.

Tabela 1 - Análises microbiológicas de membrana externa extraída da casca de ovo de galinha sem e com tratamento térmico.

Amostra	TT *	Ensaio	Resultado	Umidade	LQ*	Método
1	-	Salmonellas	Ausência	em 25g	-	ISO 6579
2	-	Coliformes a 45°C	$>1,1 \times 10^3$	NMP/g	3,0	APHA 9:2015
3	Autoclave	Coliformes a 45°C	$<3,0$	NMP/g	3,0	APHA 9:2015
4	Estufa	Coliformes a 45°C	$<3,0$	NMP/g	3,0	APHA 9:2015

*TT = Tratamento térmico; *LQ= Limite de Quantificação

Dentre as possíveis contaminações bacterianas presentes nos ovos, a contaminação por Salmonellas representa maior destaque no controle de qualidade dos ovos, uma vez que, primeiramente, se dá por meio das cascas, e a depender do tempo e temperatura de armazenagem pode passar da superfície para as estruturas internas do ovo (OLIVEIRA; SILVA, 2000).

Ainda ao analisar a Tabela 1, é possível identificar que a amostra que não passou por tratamento térmico apresentou quantitativo maior que o permitido ($< 3,0$ NMP/g) quando analisada a presença de coliformes a 45°C. Em contrapartida, a amostra submetida ao tratamento térmico de autoclavagem durante tempo suficiente (15 minutos), foi eficaz no processo de eliminação de possível contaminação por coliformes. A análise da presença de coliformes a 45°C também avalia a qualidade do alimento, sendo que o resultado acima do permitido ($< 3,0$ NMP/g) demonstra falha nas boas práticas na manipulação de alimentos devido à contaminação fecal, isto significa que as condições higiênicas sanitárias estão deficientes (ELPO; NEGRELLE; GOMES, 2004).

De forma semelhante, a amostra que passou por processo de higienização e esterilização em estufa (100°C por 15 minutos) apresentou resultado negativo para contaminação, o que está de acordo com a literatura que demonstra a eficácia do processo de esterilização por calor a 80-90°C em cascas de ovos (AHMED et al, 2021).

As membranas utilizadas na pesquisa são provenientes de resíduos dos ovos empregados na indústria de alimentos, uma vez que a intenção é criar um novo produto que aumente a ingestão de proteínas em especial a do colágeno aproveitando um material rico nutricionalmente

que é habitualmente descartado, um potencial risco de contaminação bacteriana e sujeira pode estar presente em várias etapas da cadeia reprodutiva, desde o trato reprodutivo das galinhas até o descarte após o uso dos ovos (AHMED et al, 2021).

O processo de retirada da membrana foi realizado de modo que o rendimento obtivesse o maior aproveitamento. Na Tabela 2, pode-se observar que o processo de retirada da membrana foi bem sucedido. De acordo com Han et al (2023), a proporção de casca de ovo e membrana da casca de ovo na estrutura do ovo é de 10-12% e 1,02% respectivamente, dessa maneira é possível concluir que a membrana representa cerca de 8,5 a 10,2% em relação a casca do ovo.

Tabela 2 - Rendimento da retirada da membrana externa de ovo de galinha e do processamento de microcápsulas.

Caracterização	Membrana externa de ovo de galinha	
	<i>In natura</i>	Microcápsulas
Rendimento	13,07% $\pm$ 0,02	50,11% $\pm$ 0,08

Fonte: elaborada pela autora (2023).

A pesquisa desenvolvida por Ponkham, Limroongreungrat e Sangnark (2010), a qual utilizou solução de EDTA a 5% para separar a membrana, obteve rendimento da membrana da casca do ovo em quantidades diferentes de casca de ovo variando entre 5,45 e 7,53%.

Conforme a Tabela 2, o rendimento obtido no processo de microencapsulação da membrana da casca do ovo foi de 50,11%, valor menor que o esperado, provavelmente, devido ao fato da membrana não ter se dissolvido na solução 1 (alginato de sódio + água filtrada) o que prejudicou a etapa de gotejamento da solução 1 no recipiente que continha a solução 2 (cloreto de cálcio e 100ml de água filtrada).

No entanto, na obtenção das microcápsulas é comum haver perdas durante o processamento. De acordo com REIS (2021), o rendimento da microcápsula de suco de laranja e colágeno hidrolisado aplicando a técnica de gelificação iônica utilizando o gelificante alginato foi de 59,23%, resultado similar à pesquisa realizada com microcápsulas de erva cidreira com alginato que obteve rendimento de 67,54% (Oliveira, 2020). Em 2015, Moraes et al quantificaram um rendimento de 62,12% em microcápsulas de maracujá com alginato. Valores maiores, 70% e 85,77%, foram encontrados nos estudos de Xavier (2019) e Moraes (2020) os quais aplicaram a técnica de gelificação iônica utilizando o gelificante alginato na obtenção de microcápsulas de maracujá.

As microcápsulas (Figura 14) resultaram em diâmetro médio de $3,37 \pm 0,15$ mm, confirmando a sua especificação, dado que Baker (1986) definiu que as cápsulas devem ser classificadas como micro quando apresentarem diâmetro entre 0,0002 e 5 mm. Além disso, o peso das microcápsulas ($0,0260\text{g} \pm 0,0030$) também está de acordo com o esperado visto que

outros estudos, Reis (2021) e Moraes (2020), obtiveram resultados semelhantes, 0,0243g e 0,0268g.

Figura 14 - Microcápsulas obtidas de membrana externa de ovos de galinha.



Fonte: própria autora (2023).

A atividade da água da membrana externa da casca do ovo, apresentou valor favorável quanto à disponibilidade de água para a ocorrência de reações químicas e crescimento biológico, conferindo possível estabilidade química e microbiológica para a membrana. No entanto, a microcápsula, por ter apresentado elevada A_w , deve ser armazenada sob refrigeração (5°C) para garantir as condições higiênico-sanitárias do produto (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização física de membrana externa de ovos de galinha e de microcápsulas obtidas.

Caracterização	Membrana externa de ovo de galinha	
	<i>In natura</i>	Microcápsulas
Tamanho (mm)	-	$3,37 \pm 0,15$
Peso (g)	-	$0,0260 \pm 0,0030$
A_w	$0,63 \pm 0,01$	$0,99 \pm 0,00$
L^*	$66,80 \pm 0,46$	$43,97 \pm 3,65$
a^*	$+6,33 \pm 0,64$	$+4,93 \pm 0,99$
b^*	$+26,10 \pm 0,20$	$+22,30 \pm 1,44$
H^*	$76,37 \pm 1,33$	$77,53 \pm 2,12$

L^* - luminosidade; a^* - coordenada vermelho/verde; b^* - coordenada amarelo/azul; H^* - ângulo de cor.

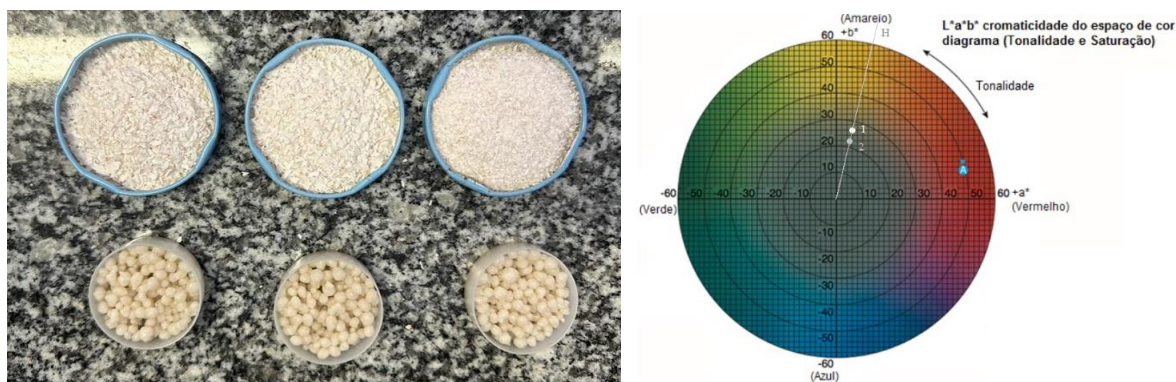
Fonte: elaborada pela autora (2023).

Com relação à atividade de água (A_w), destaca-se que o alimento que consiste em A_w menor que 0,6 pode ser considerado microbiologicamente estável (QUEK; CHOK; SWEDLUND, 2007). É evidente que essa medida termodinâmica da energia da água de um produto está relacionada ao controle de qualidade. Em função da sua ligação com as reações químicas e microbiológicas que modificam o prazo de validade dos alimentos comercializados (NEGRÃO-MURAKAMI et al., 2017; ETHUR; ZANATTA; SCHLABITZ, 2010).

No intuito de avaliar o frescor e sabor do produto foi determinada a cor e índice de escurecimento. Os dados obtidos indicam que a luminosidade (L) das membranas é maior que

a das microcápsulas o que é possível identificar ao comparar as amostras (Tabela 3 e Figuras 15A).

Figura 15 - Comparação cor e índice de escurecimento de membrana exterior de ovo de galinha com as microcápsulas obtidas (A) pelas coordenadas CIELAB no espaço de cores (B).



Fonte: (A) Própria autora (2023) e (B) Adaptado de Konica Minolta

No tocante às cores tanto das membranas (ponto 1 – Figura 15B) quanto das microcápsulas (ponto 2 – Figura 15B), ambas estão localizadas próximas ao eixo b^+ sendo possível confirmar as posições por meio dos ângulos de Hue, aproximadamente iguais (Tabela 3), demonstrados pela reta H (Figura 15B). Por conseguinte, houve um escurecimento na cor das microcápsulas, entretanto, os valores da determinação de cor e luminosidade comprovam que os resultados obtidos estão de acordo com o esperado.

O teor de umidade da membrana externa de ovo de galinha apresentou conteúdo baixo (Tabela 4), o qual foi superior quando comparado aos estudos de Santos et al. (2017) e Vargas (2015) que obtiveram, respectivamente, 12,42% e 11,61% de umidade em membranas extraídas de casca de ovo de galinha. Todavia, a umidade das microcápsulas obtidas está dentro da faixa esperada (Tabela 4). Reis (2021) produziu microcápsulas de suco de laranja e colágeno hidrolisado com 90,23% de umidade enquanto Oliveira (2020) elaborou microcápsulas do extrato de erva cidreira que obtiveram 97% de umidade. O valor da umidade pode alterar de acordo com o material encapsulado e valores acima de 90% são esperados, devido ao processo de obtenção de cápsulas por gelificação iônica o qual utiliza quantidade considerável de água em seu processamento.

Tabela 4 - Caracterização físico-química de membrana externa de ovo de galinha e microcápsulas obtidas.

Caracterização	Membrana externa de ovo de galinha	
	<i>In natura</i>	Microcápsulas
Umidade (%)	14,23 ± 0,20	91,05 ± 0,70
Cinzas (%)	4,72 ± 1,20	1,29 ± 0,11
pH	8,93 ± 0,07	7,53 ± 0,15

Fonte: elaborada pela autora (2023).

O teor de resíduos minerais da membrana externa da casca do ovo pode ser considerado expressivo (Tabela 4) quando comparado aos existentes na literatura científica. Santos (2018) obteve 0,43% de cinzas em membranas extraídas do ovo de galinha. Em estudo realizado por DeVore et al (2017) citado por Vargas (2015), o teor de cinzas foi de 0,6% e Santos (2017) quantificou 1,04% de resíduos minerais na membrana da casca do ovo. Em contrapartida, Vargas (2015) quantificou 15,88% de cinzas. Para as microcápsulas houve redução de aproximadamente 73% devido a proporção de membrana encapsulada ter sido menor que o planejado.

O valor de pH determinado tanto para a membrana de ovo de galinha *in natura* quanto para a microcápsula está na faixa alcalino, conforme os demais componentes do ovo de galinha. O pH do Álbumen e da gema observado por Biesek (2023) foi 9,2 e 6,09, respectivamente. De forma similar, Leandro et al (2005) quantificaram o pH da gema do ovo de galinha de 6,26 a 6,38, a depender do local onde os ovos eram comercializados, e pH de 8,04 a 9,48 quando analisado o Álbumen desses ovos. O valor do pH demonstrado na Tabela 5 tanto para a membrana quanto para a microcápsula está dentro da faixa encontrada quando analisados os demais componentes do ovo de galinha.

5.2 Quantificação de proteínas totais e colágeno

Com base nos dados da análise de proteínas da membrana externa, descritos na tabela 5, o resultado está dentro da faixa ou acima de valores reportados na literatura científica.

Tabela 5 - Quantificação das proteínas (totais e colágeno) presentes nas membranas, microcápsulas e cápsulas.

Caracterização	Membrana externa de ovo de galinha		
	<i>In natura</i>	Microcápsulas	Cápsulas
Proteínas (%)	86,80 ± 2,17	1,18 ± 0,04	86,80 ± 2,17
Colágeno (% p/p)	8,17 ± 0,25	0,65 ± 0	8,17 ± 0,25

Fonte: elaborada pela autora (2023).

De acordo com Han et al (2023), a membrana externa da casca do ovo de galinha contém 90% de proteínas. Resultados similares foram encontrados por MacNeil (2001) e Vlad (2007) que quantificaram em 85% e 90,08% de proteínas na membrana externa. Contrariamente, Santos (2018), Campos (2015) e Vargas (2020) quantificaram 70,31%, 71% e 72% de proteínas presentes nas membranas extraídas das cascas de ovos de galinha, respectivamente. Evidentemente, a quantidade significativa de macronutriente na membrana da casca do ovo torna-a potencial insumo no desenvolvimento de produtos que tenham como objetivo dietas hiperprotéicas.

Todavia ao analisar o percentual de proteínas presente nas microcápsulas, o valor não se mostrou em consonância com o esperado (Tabela 5). A redução pode estar ligada a falhas no

processamento das microcápsulas, visto que as membranas não possuem a propriedade de dissolver em água. Por este motivo, o processo de gotejamento foi prejudicado pois as partículas das membranas ficavam alojadas nos instrumentos de extrusão (seringas) impedindo que a quantidade ideal da membrana estivesse presente na microcápsula. Desse modo, devido à redução significativa quando comparada à proteína total presente na membrana externa *in natura*, se fez necessário ofertar a membrana de modo que se pudesse aproveitar ao máximo os seus benefícios, sendo empacotada em cápsula gelatina incolor nº1. Logo, a Figura 16 retrata a cápsula contendo 100mg de membrana externa em pó da casca do ovo, por conseguinte, concentrando o conteúdo proteico aproximadamente 74 vezes, como pode ser observado na Tabela 5.

Figura 16 - Cápsula da membrana da casca do ovo.



Fonte: Ilustração Pagani (2023).

Os percentuais de colágeno presente na membrana externa, nas microcápsulas e na cápsula hidrogel estão ilustrados na tabela 5. Segundo MacNeil (2001), as fibras que compõem as membranas da casca do ovo incluem o colágeno, dado que a presença de hidroxiprolina, aminoácido presente exclusivamente em gelatina e colágeno (STOILOV et al., 2018), foi identificada nos hidrolisados das camadas de membrana por meio de testes bioquímicos e imunológicos. A proporção de colágeno por conteúdo proteico da membrana da casca do ovo corresponde a cerca de 10% e, dentre as variantes genéticas do colágeno, os do tipo I e V predominam na membrana, no entanto, estudo por meio de análise imunoistoquímica já identificou a presença do colágeno tipo X.

O resultado obtido na pesquisa em questão é menor que 10% (Tabela 6), o que provavelmente tenha sido influenciado pela desnaturação térmica do colágeno, correspondente a 55,10°C, valor revelado por Zhao e Chi (2009) ao realizar análise de calorimetria de varredura diferencial na membrana da casca do ovo. Em consequência das amostras terem sido

submetidas a processo de secagem em estufa a 100°C por 25 minutos, uma parte do colágeno presente nas membranas pode ter desnaturado uma vez que, em concordância com Rosa (2007), alterações na estrutura do colágeno que provocam a desnaturação em sua conformação nativa podem ocorrer em temperaturas superiores a 45°C resultando em perdas da função biológica específica.

Quanto às microcápsulas, assim como na análise de proteínas, o valor encontrado é menor que o esperado. Apesar da cápsula conter mais colágeno que a microcápsula, uma unidade (100mg) contém apenas 8,17mg da proteína e está distante da recomendação diária para humanos, cerca de 10g de colágeno ao dia (FERREIRA; ROBERTO; CAMISA, 2018; JACKIX et al., 2010). Clark et al. (2008) também consideraram o quantitativo de 10g/dia na pesquisa que avaliou o benefício do colágeno hidrolisado na doença articular, resultando na melhora significativa quanto à dor no grupo suplementado.

Analisando por outra perspectiva, um ensaio clínico randomizado, com o objetivo de avaliar a eficácia da membrana da casca de ovo para restabelecer a funcionalidade articular na osteoartrite do joelho, demonstrou melhora em todas as variáveis (mobilidade, força articular do joelho, dor, capacidade funcional e qualidade do sono) nos indivíduos que estavam consumindo 300mg ou 500mg da membrana/dia (CÁNOVAS et al., 2022). Do mesmo modo, Kiers e Bult (2020) selecionaram 75 voluntários de ambos os sexos, com idade entre 40 e 75 anos e diagnóstico de osteoartrite de joelho, para participar de pesquisa envolvendo o consumo de 300mg da membrana da casca do ovo/dia durante 12 semanas e, baseado nos resultados obtidos, concluíram que a intervenção auxiliou no alívio da dor da osteoartrite do joelho.

Demais randomizações foram realizadas para avaliar o consumo de 500mg/dia e obtiveram resultados favoráveis quanto a redução significativa da dor e rigidez associadas à osteoartrite do joelho, tornando o consumo da membrana uma opção segura e eficaz para o tratamento da dor e da inflexibilidade (RUFF et al., 2009¹; RUFF et al., 2009²; DANESCH et al. 2014; HEWLINGS; KALMAN; SCHNEIDER, 2019). Por conseguinte, o consumo diário de três cápsulas da membrana da casca do ovo desenvolvida neste trabalho, provavelmente, resultará em benefícios ligados à distúrbios articulares e do tecido conjuntivo.

No estudo desenvolvido por Ponkham, Limroongreungrat e Sangnark (2010), a extração do colágeno aumentou após a associação do ácido cítrico à membrana da casca do ovo. Contudo, há a possibilidade do ácido cítrico interferir na absorção do colágeno sendo necessária a realização de pesquisas que comprovem as vantagens da ingestão da membrana conjuntamente com o ácido, no intuito de aumentar a absorção do colágeno.

5.3 Quantificação da hidroxiprolina e determinação do perfil de aminoácidos por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

A membrana *in natura* obteve valor superior (Tabela 6) quando comparado à pesquisa realizada por Strohbehn (2012) que obteve 0,22% p/p do aminoácido hidroxiprolina no hidrolisado da membrana da casca do ovo. Acresce que, o resultado encontrado corresponde a 12,48% dos aminoácidos, que formam as proteínas de colágeno presentes na membrana, uma vez que o valor total de colágeno é $8,17 \pm 0,25$ (Tabela 5). A porcentagem da hidroxiprolina está superior que o valor médio esperado, o que confirma a quantidade significativa e relevante deste aminoácido e, portanto, do colágeno na amostra.

Todavia, o valor de hidroxiprolina presente na microcápsula é de 0,08% p/p. Por conseguinte, a presença de uma pequena quantidade deste aminoácido pode afetar a conformação da tripla hélice resultando no prejuízo do processo de gelificação, dado que este aminoácido é de suma importância na estabilidade da tripla hélice do colágeno (PRESTES et al., 2013). Diante do exposto, a cápsula contendo a membrana da casca do ovo continua sendo a opção mais viável com relação aos benefícios nutricionais ofertados (Tabela 6).

Tabela 6 - Quantificação do aminoácido Hidroxiprolina presente nas membranas, microcápsulas e cápsulas.

Caracterização	Membrana externa de ovo de galinha		
	<i>In natura</i>	Microcápsulas	Cápsulas
Hidroxiprolina (% p/p)	$1,02 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0$	$1,02 \pm 0,03$

Fonte: elaborada pela autora (2023).

Quanto ao perfil dos aminoácidos, prolina e glicina, os resultados obtidos estão de acordo com a faixa de dados existentes na literatura. A Tabela 7 demonstra que os valores encontrados nesta pesquisa são favoráveis quando comparados aos dos demais pesquisadores. Em face aos dados apresentados, obteve-se evidência da presença do colágeno na membrana da casca do ovo devido à existência dos aminoácidos responsáveis por sua estruturação. O escopo do presente estudo contemplou a importância da reavaliação dos resíduos de casca do ovo de galinha em razão do seu potencial nutritivo.

Tabela 7 - Perfil de aminoácidos (Prolina e Glicina) da membrana da casca do ovo.

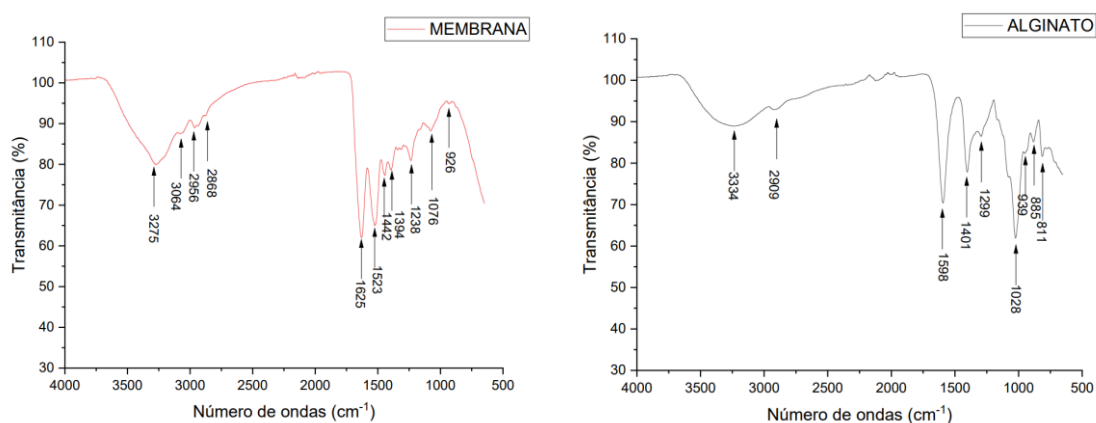
Aminoácido % p/p	Meneses (2023)	Vargas (2020)	MacNeil (2005)	Vlad (2007)	Long et al. (2008)	Nacano et al. (2003)
Prolina	$10,3 \pm 0,12$	8,47	9,34	10,79	8,23	11,80
Glicina	$4,72 \pm 0,02$	5,19	4,94	5,43	3,99	10,85

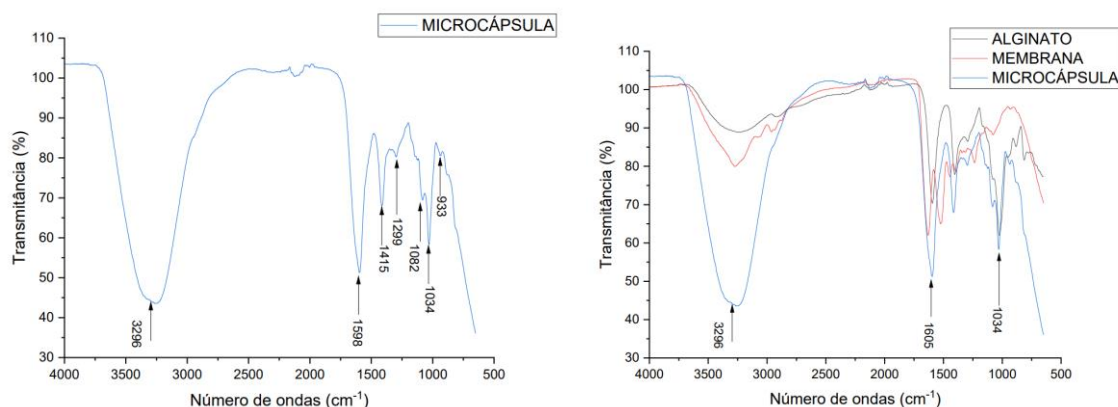
Fonte: elaborada pela autora (2023).

5.4 Identificação do perfil de aminoácidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Analizando os espectros originados do FTIR a partir dos aminoácidos presentes na membrana de casca de ovo de galinha (Figura 17), foi possível identificar os picos característicos que correspondem as aminas A, B, I e II, cuja longitude de onda se reporta na literatura a 3464 cm^{-1} , 2927 cm^{-1} , 1639 cm^{-1} , 1555 cm^{-1} , respectivamente e, por último, a amida III em rango de longitude de onda entre 1200 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} . Nas 4 amostras a amida A se identifica com facilidade entre os valores de número de onda de 3300 cm^{-1} e 3350 cm^{-1} , o que se associa a presença de grupamentos -NH do colágeno quantificado na membrana. Entre 3000 cm^{-1} e 2750 cm^{-1} se observa ligeira hidrólise nos colágenos obtidos que representa a amida B. Esta banda se associa com o estiramento assimétrico do CH_2 . No caso das amidas I e II, estas se encontram entre 1800 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} , sendo a primeira banda a correspondente a amida I e seguidamente, a banda da amida II. Estas representam o estiramento de $\text{C}=\text{O}$ ao longo da estrutura do colágeno e o caso da amida I, e a flexão do grupamento N-H junto com o estiramento do grupo C-N para a amida II. De novo, se observa que a banda de absorção da amida II é mais visível na Figura 17. Por último, se identifica a amida III entre 1200 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} , a qual representa a deformação N-H e o estiramento C-N.

Figura 17 - Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier





Fonte: própria autora.

Na região de comprimento de onda mais elevado na membrana da casca de ovo (Figura 14), a banda mais intensa é evidenciada a 3275 cm^{-1} o que corresponde presença de grupos O-H e N-H, os picos a 3064 , 2956 e 2868 cm^{-1} correspondem a ligações de estiramento C-H. Na região com comprimentos de onda mais baixos, a bandas a 1625 cm^{-1} corresponde a C=O, 1523 cm^{-1} corresponde NC/NH. Desta forma é evidenciada a presença de amins e amidas na partícula da membrana da casca do ovo. Na Tabela 8 estão especificados os picos e os grupos funcionais das amostras analisadas.

Tabela 8 - Grupamento químico das membranas da casca do ovo, do alginato e das microcápsulas em função das bandas de absorção.

Picos	Posição das Bandas (cm-1)			Grupo Funcional*
	MEM	ALG	MICR	
1	3275	3334	3296	3600-3200 (O-H) e N-H
2	3064	-	-	3200-2500 (O-H Quelato)
3	2956	2909	-	1760-1712 (C=O ác.Carboxílicos)* 2820-2720; 2956-2909 (C-H) 1.700-1630 (Aminas)
4	2868	-	-	2956-2868 (C-H)
5	1625	-	-	1.700-1630 (Aminas)
6	1523	1598	1598	NC/NH
7	1442	1401	1415	1.470 - 1.430 (CH ₂)
8	1394	-	-	1390-1370 (CH ₃) 1320 (Aminas aromáticas)
9	1238	1299	1299-1082	1238- Amina III 1275-1020 (C-O de ésteres)
10	1076	1028	1034	1200-1050 (Álcoois e fenóis)
11	926	939	933	~ 920 (ácido carboxílico) 900-860-800 (Anel aromático)
12	-	811-885	-	900-860-800 (Anel aromático)

MEM (Membrana da casca do ovo); ALG (Alginato de sódio); MIC (Microcápsulas)

Fonte: elaborada pela autora (2023).

Os espectros obtidos estão de acordo com Muyonga, Cole e Duodu (2004), Wang et al., (2008) e Woo et al., (2008), pois os mesmos apresentam todas as absorções relativa ao colágeno contido na membrana da casca do ovo.

6 CONCLUSÃO

Em virtude dos resultados mencionados, pode-se concluir que a membrana da casca do ovo é, atualmente, um resíduo do processamento industrial que merece destaque em função da sua composição nutricional, dado que é importante reconhecer a presença de colágeno nas membranas em razão da sua importância econômica. Ainda durante o preparo das amostras, constatou-se que o tratamento térmico era necessário para garantir a qualidade do alimento, devido ao potencial de contaminação com coliformes termotolerantes, mesmo que fossem seguidas as Boas Práticas de Manipulação.

O escopo desta pesquisa era o desenvolvimento da microcápsula da membrana da casca do ovo de galinha utilizando a técnica de gelificação iônica, com o intuito de facilitar a forma de consumo pela população. No entanto, devido aos resultados de quantificação de proteínas totais e colágeno se apresentarem abaixo do esperado, obteve-se como produto final a cápsula da membrana da casca do ovo, a fim de propiciar uma melhor forma de armazenar quantidade pertinente da membrana que resulte em benefícios quanto à sua ingestão.

Os resultados de FTIR verificaram a existência de amins e amidas na partícula da membrana da casca do ovo comprovando que são boas fontes de proteínas. Esse estudo resulta no desenvolvimento de um novo produto com alto valor nutricional que pode melhorar a saúde humana, otimizar a ingestão de proteínas, especialmente colágeno, e encorajar estudos clínicos que demonstrem a importância do consumo da membrana da casca do ovo de galinha. Em uma segunda análise, é viável avaliar o custo, o prazo de validade e a aceitação dos consumidores quanto aos aspectos sensoriais e intenção de compra do produto.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J.; ESTEVINHO, B. N.; SANTOS, L. Microencapsulation of natural antioxidants for food application e The specific case of coffee antioxidants - A review. **Trends in Food Science & Technology**, v.58, p.21-39, 2016.
- AHMED, T. A. E.; YOUNES, M.; WU, L. HINCKE, M. T. A Survey of Recent Patents in Engineering Technology for the Screening, Separation and Processing of Eggshell. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 4(9), p. 677559, 2021.
- ARAGON-ALEGRO, L. C.; SOUZA, K. L. de O.; COSTA SOBRINHO, P. de S.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. Avaliação da qualidade microbiológica de ovo integral pasteurizado produzido com e sem a etapa de lavagem no processamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.618-622, 2005.
- ARIAS, J. L.; CARRINO, D. A.; FERNANDEZ, M. S.; RODRIGUES, J. E.; DENNIS, J. E.; CAPLAN, A. I. Partial biochemical and immunochemical characterization of avian eggshell extracellular matrices. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.298, p.293–302, 1992.
- ARIAS, J.L.; FERNANDEZ, M.S.; DENNIS, J.E.; CAPLAN, A.I. Collagens of the chicken eggshell membranes. **Connect Tissue Res**, v.26, p.37–45, 1991.
- ARVANITOYANNIS, I.S. Waste Management for the Food Industries. **Academic Press e Elsevier Ltd.**, p.136-174, 2008.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.16, p.89-97, 2005.
- BAKER, R. Controlled release of biologically active agents. **New York: John Wiley & Sons**, 1986.
- BALÁZ, M. Eggshell membrane biomaterial as a platform for in materials Science. **Acta Biomaterialia**, v.10, p.3827-3843, 2014.
- BASU, S.; BANERJEE, D.; CHOWDHURY, R.; BHATTACHARYA, P. Controlled release of microencapsulated probiotics in food matrix. **Journal of Food Engineering**, v.238, p.61-69, 2018.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant Soil**, v.39, p.205-207, 1973.
- BIESEK; J. The physicochemical features of eggshell, thick albumen, amniotic fluid, and yolk during chicken embryogenesis. **Poultry Science**, v. 102(12):103119, 2023.
- BUTNARU, M.; LUCACI, A. M.; COSMAN, B. P.; VERESTIUC, L. Hydrogels Based on Collagen and Dextran for Bioartificial Tissues. 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, I. Tiginyanu, V. Sontea y S. Railean, eds., ép. IFMBE Proceedings, Cham: Springer International Publishing, p. 385-389, 2020.
- CAMPOS, Tania García. Extracción y aplicaciones alimentarias de membranas de cáscaras de huevo. [Dissertação]. Programa em Biotecnologia Alimentar. Universidad de Oviedo, 2015.

CÁNOVAS, F.; RUÍZ, M. S. A.; MUÑOZ, A. M. G.; RUBIA, A. J. L.; MONTESINOS, D. V.; PIÑERO, S. P.; MACARRO, M. S.; ROMÁN, F. J. L. Randomised Clinical Trial to Analyse the Efficacy of Eggshell Membrane to Improve Joint Functionality in Knee Osteoarthritis. **Nutrients**, v. 14(11), 2022.

CAO, C.; WAN, S.; JIANG, Q.; AMARAL, A.; LU, S.; HU, G.; BI, Z.; KOUTTAB, N.; CHU, W.; WAN, Y. All-trans retinoic acid attenuates ultraviolet radiation-induced down-regulation of aquaporin-3 and water permeability in human keratinocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 215(2), p. 506-516, 2008.

CLARK, K. L.; SEBASTIANELLI, W.; FLECHSENHAR, K. R.; AUKERMANN, D. F.; MEZA, F.; MILLARD, R. L. 24-Week study on the use of collagen hydrolysate as a dietary supplement in athletes with activity-related joint pain. **Curr Med Res Opin**, v.24(5), p.1485-96, 2008.

COELHO-JUNIOR, H. J.; MARZETTI, E.; PICCA, A.; CESARI, M.; UCHIDA, M. C.; CALVANI, R. Protein Intake and Frailty: A Matter of Quantity, Quality and Timing. **Nutrients**, v. 12(10), 2020.

CORDEIRO, C.M.M.; HINCKE, M.T. Quantitative proteomics analysis of eggshell membrane proteins during chick embryonic development. **Journal of Proteomics**, v.130, p.11-25, 2016.

CUNHA, T. P., SIQUEIRA, F. B., HOLANDA, J. N. F. Development of Sustainable Eggshell Waste-Polyester Resin Composite Material for Using as Artificial Rock. **Materials Research**, 2019.

DAMODARAN, S., PARKIN, K., FENEMMA, O. R. Química de Alimentos de Fenemma. **Artmed**, 2010.

DANESCH, U.; SEYBOLD, M. RITTINGHAUSEN, R. TREIBEL, W.; BITTERLICH, N. NEM. Brand Eggshell Membrane Effective in the Treatment of Pain Associated with Knee and Hip Osteoarthritis: Results from a Six Center, Open Label German Clinical Study. **Journal Arthritis**, v. 3(3), 2014.

DHAKAL, D.; KOOMSAP, P.; LAMICHHANE, A.; SADIQ, M. B.; ANAL, A. K. Optimization of collagen extraction from chicken feet by papain hydrolysis and synthesis of chicken feet collagen based biopolymeric fibres. **Food Bioscience**, v. 23, p. 23-30, 2018.

DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **Washington: American Public Health Association**, v.4, p.676, 2001.

DU, J.; HINCKE, M.T.; ROSE-MARTEL, M.; HENNEQUET-ANTIER, C.; BRIONNE, A.; COGBURN, L. A.; NYS, Y.; GAUTRON, J. Identifying specific proteins involved in eggshell membrane formation using gene expression analysis and bioinformatics. **BMC Genomics**, v.6, p.792, 2015.

ELPO, E. R. S.; NEGRELLE, R.R.B.; GOMES, E. C. Avaliação da qualidade microbiológica do gengibre “in natura” comercializado na região metropolitana de Curitiba, PR. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 139-146, 2004.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>>. Acesso em: 19 de novembro de 2021.

ETHUR, E. M.; ZANATTA, C. L.; SCHLABITZ, C. Avaliação físico-química e microbiológica de farinhas obtidas a partir de vegetais não conformes à comercialização. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 459-468, 2010.

FERREIRA, L. O. C.; XAVIER, A. C. R.; SANTOS, J.; WARTHA, E. R. S. A.; PAGANI, A. A. C. Microencapsulação de extrato de beterraba (*Beta Vulgaris* L.) pelo processo de gelificação iônica. **Research Society and Development**, v.10, 2021.

FERREIRA, M. P.; ROBERTO, S. B.; CAMISA, J. Caracterização e Aceitabilidade de Barras de Cereais Enriquecidas com Colágeno Hidrolisado. **Revista Virtual de Química**, v. 10, 2018.

FREIRE, M. N., HOLANDA, J. N. F. Characterization of avian eggshell waste aiming its use in a ceramic wall tile paste. **Cerâmica**, v.52, p.324, 2006.

GAMAL, S. E. B.; EL-SAYED, M. E. -S; ABDEL, A. M.; NOHA, M. G. Preparation and Characterization of Poly Vinyl Alcohol /Gelatin Blends. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 8(7), p. 3544-3551, 2012.

GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.50, p.213-224, 1999.

GRIEVE, C. M.; GRATAN, S. R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. **Plant and soil**, v.70, p.303-307, 1983.

GURU, P. S., DASH, S. Sorption on eggshell waste – A review on ultrastructure, biomineralization and Other applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.209, p.49-67, 2014.

HAN, C.; CHEN, Y.; SHI, L.; CHEN, H.; LI, L.; NING, Z. H.; ZENG, D.; WANG, D. Advances in eggshell membrane separation and solubilization technologies. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, 2023.

HEUVEL, E.V.D.; MURPHY, J. L.; APPLETON, K. M. Towards a Food-Based Intervention to Increase Protein Intakes in Older Adults: Challenges to and Facilitators of Egg Consumption. **Nutrients**, v. 10 (10), p. 1409, 2018.

HEWLINGS, S.; KALMAN, D.; SCHNEIDER, L. V. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Prospective Clinical Trial Evaluating Water-Soluble Chicken Eggshell Membrane for Improvement in Joint Health in Adults with Knee Osteoarthritis. **Journal of Medicinal Food**, v. 22, 2019.

HINCKE, M.T.; GAUTRON, J.; PANHELEUX, M.; GARCIA-RUIZ, J.; MCKEE, M.D.; NYS, Y. Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix. **Matrix Biology**, v. 19, p. 443–453, 2000.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, v.4, 2008.

INIAP – **Método para análise de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**, 1985.

JACKIX, E. A.; CÚENO, F.; AMAYA-FARFAN, J.; ASSUNÇÃO, J. V.; QUINTAES, K. D. A food supplement of hydrolyzed collagen improves compositional and biodynamic characteristics of vertebrae in ovariectomized rats. **J Med Food**, v. 13(6), p. 1-6, 2010.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and the Food Industry. **LWT - Food Science and Technology**, v.24, p.289-297, 1991.

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Functional Biopolymer Particles: Design, Fabrication and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p.374-397, 2010.

KALMAN, D. S.; HEWLINGS, S. The effect of oral hydrolyzed eggshell membrane on the appearance of hair, skin, and nails in healthy middle-aged adults: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 19(6), p. 1463-1472, 2020.

KIERS, J. L.; BULT, J. H. F. Mildly Processed Natural Eggshell Membrane Alleviates Joint Pain Associated with Osteoarthritis of the Knee: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. **Journal of Medicinal Food**, v. 24(3), p. 292-298, 2021.

LEANDRO, N. S. M.; DEUS, H. A. B.; STRINGHINI, J. H.; CAFÉ, M. B.; ANDRADE, M. A.; CARVALHO, F. B. Aspectos de qualidade interna e externa de ovos comercializados em diferentes estabelecimentos na região de Goiânia. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 2, p. 71-78, 2005.

Lee J. H., Seo J. H., Park Y. H., Kim W. G., Lim K. M., Lee S. J. The effect of hydroxyproline and prohyp dipeptide on UV-damaged skin of hairless mice. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 436-442, 2008.

LONG, F.; ADAMS, R.; DEVORE, D.; FRANKLIN, M. Therapeutic, nutraceutical and cosmetic applications for eggshell membrane and processed eggshell membrane preparation. **US PATENTS No. 2008/0234195**, 2008.

MacNeil, J.H. Method and apparatus for separating a protein membrane and shell material in waste egg shells. The Penn State Research Foundation, **US PATENTS No. 6176376 B1**, 2001.

MacNeil, J.H. Hatchery eggshell waste processing method and device **US PATENTS No. 6899294 B2**, 2005

MAIA, P. N. **PROTEÍNAS: muito além dos músculos**. Disponível em: <<https://diabetes.org.br/proteinas-muito-alem-dos-musculos/>>. Acessado em: 23 de dezembro de 2023.

MEDEIROS, F. M. de; ALVES, M. G. M. Qualidade de ovos comerciais. **Revista Eletrônica Nutrine**, v.257, p.3515-3524, 2014.

MINOLTA. Precise color communication: color control from feeling to instrumentation. **Brasil: MINOLTA Co. Ltda**, p. 49, 1994.

MOHAMMADI, R.; MOHAMMADIFAR, M. A.; MORTAZAVIAN, A. M.; ROUHI, M.; GHASEMI, J. B.; DELSHADIAN, Z. Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v.190, p.186-193, 2016.

MORAIS A. B. L. Bioativação de água mineral a partir da adição de microcápsulas de maracujá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) com potencial probiótico. [Tese] Doutorado em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe, 2020.

MORAIS A. B. L., XAVIER A. C. R., SILVA G. F., SILVA M. A. A. P., PAGANI A. A. C. Bioactivation of Carbonated Mineral Water with Passion Fruit Microcapsules. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 4, n. 3, p. 310-319, 2015.

NAKANO, T.; IKAWA, N.I.; OZIMEK, L. Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. **Poultry Science Association**, v.82, p.510-514, 2003.

NEGRÃO-MURAKAMI, A.N.; NUNES, G. L.; PINTO, S. S.; MURAKAMI, F.S.; AMANTE, E. R.; PETRUS, J. C. C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C. Influence of DE-value of maltodextrin on the physicochemical properties, antioxidant activity and storage stability of spray dried concentrated mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **LWT – Food Science and Technology**, v. 79, p. 561-567, 2017.

OGAWA, M., PORTIER, R. J., MOODY, M. W., BELL, J., SCHEXNAYDER, M. A., LOSSO, J. N. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). **Food Chemistry**, v.88, p.495-501, 2004.

OLIVEIRA, D. A., BENELLI, P., AMANTE, E. R. “A literature review on adding value to solid residues: egg shells”. **Journal of Cleaner Production**, v.46, p.42-47, 2013.

OLIVEIRA, D.D.; SILVA, E.N. Salmonela em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52(6), 2000.

OLIVEIRA, J.M. Obtenção de microcápsulas do extrato de erva cidreira (*Melissa officinalis* L.), pelo processo de gelificação iônica: caracterização dos compostos bioativos e capacidade antioxidante [Dissertação]. São Cristóvão: Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe, 2020.

OLIVEIRA, V. M.; CUNHA, M. N. C.; NASCIMENTO, T. P.; ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S.; PORTO, A. L. F. Colágeno: características gerais e produção de peptídeos bioativos – uma revisão com ênfase nos subprodutos do pescado. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v.5, p.56-68, 2017.

PADOVANI, R. M.; AMAYA-FARFÁN, J.; COLUGNATI, F. A. B.; DOMENE, S. M. A. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. **Revista de Nutrição**, v. 19(6), 2006.

PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B. G. Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. **Journal of Food Science**, v.64, p.42-45, 1999.

PONKHAM; W. LIMROONGREUNGRAT, K.; SANGNARK, A. Extraction of collagen from hen eggshell membrane by using organic acids. **Food, Health and Trade**, v. 19, 2010.

PRESTES, R. C. Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. **UNOPAR Cient. Ciências Biológicas Saúde**, vol.15, n.1, p. 65-74, 2013.

PUGLISI, M. J.; FERNANDEZ, M. L. The Health Benefits of Egg Protein. **Nutrients**, v. 14(14), p. 2904, 2022.

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing, Lausanne**, v. 46, n.5, p. 386-392, 2007.

REIS, A. A. Microencapsulação de suco de laranja (*Citrus sinensis*) e colágeno hidrogenado por gelificação iônica [Dissertação]. São Cristóvão: Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe, 2021.

REIS, R. A. A.; SANTOS, W. L. M.; OLEIVEIRA, A. L.; SOUZA, R. M. VELOSO, C. R. V. Quantificação da hidroxiprolina como índice de qualidade de salsicha comercializada em Belo Horizonte – MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, 1999.

REZENDE, Y. R. R. S.; NOGUEIRA, J. P.; NARAIN, N. Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization. **Food Chemistry**, v.254, p.281-291, 2018.

ROSA, Rubens dos Santos. Avaliação morfológica do colágeno após aquecimento induzido in vivo. [DISSERTAÇÃO] Programa de pós-graduação Interunidades em Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2007.

RUFF, K. J.; DEVORE, D. P.; LEU, M. D.; ROBINSON, M. A. Eggshell membrane: A possible new natural therapeutic for joint and connective tissue disorders. Results from two open-label human clinical studies. **Clinical Interventions in Aging**, v. 4, 2009.

RUFF, K. J.; ENDRES, J. R.; CLEWELL, A. E.; SZABO, J. R.; SCHAUSS, A.G. Safety evaluation of a natural eggshell membrane-derived product. **Food and chemical toxicology**, v. 50, p. 604-611, 2012.

RUFF, K. J.; WINKLER, A.; JACKSON, R. W.; DEVORE, D. P.; RITZ, B. W. Eggshell membrane in the treatment of pain and stiffness from osteoarthritis of the knee: a randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled clinical study. **Clinical Rheumatol**, v. 28, p. 907-914, 2009.

SANTANA, R. C.; SATO, A. C. K.; CUNHA, R. L. Emulsions stabilized by heat-treated collagen fibers. **Food Hydrocolloids**, v.26, p.73-81, 2012.

SANTOS, K. O.; BEZZERA, JUNIOR, A. G.; BARBOSA, R. C.; Extração e avaliação da membrana da casca do ovo para possível utilização como biomaterial. In: 14º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos artificiais e Engenharia de Tecidos – SLABO, Maresias – São Paulo, 2017.

SANTOS, K. O. Desenvolvimento de filmes de quitosana incorporados com membrana celular do ovo para aplicações biomédicas [Dissertação]. Campina Grande: Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual da Paraíba, 2018.

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.71, p.530-539, 2012.

STOILOV, I., STARCHER, B. C., MECHAM, R. P., BROEKELMANN, T. J. Measurement of elastin, collagen, and total protein levels in tissues. **Methods in Cell Biology**, vol. 143, 133-146, 2018.

STROBEL, S. A.; KNOWLES, L.; NITIN, N.; SCHER, H. B.; JEOH, T. Comparative technoeconomic process analysis of industrial-scale microencapsulation of bioactives in cross-linked alginate. **Journal of Food Engineering**, v.266, 2020.

STROHBEHN, R.; ETZEL, L.; FIGGINS, J. Solubilized protein composition obtained from eggshell membrana. **US PATENTS No. 8 173 174 B2**, 2012.

TSAI, W. T.; YANG, J. M.; LAI, C. W.; CHENG, Y. H.; LIN, C. C.; YEH, C. W. Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. **Bioresource Technology**, v.7, p.488-493, 2006.

VARGAS, Erika Lorena Urbano. Extracción a escala de laboratorio del complejo de proteínas presentes en las membranas intersticiales de residuos de cáscara de huevo de gallina (*Gallus Domesticus*) mediante el proceso de hidrólisis alcalina. Escola Politécnica Nacional, Faculdade de engenharia Química e agroindústria. Abril de 2015. Disponível em: <<http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/10458>>. Acesso em: 25 de dezembro de 2023.

VLAD, V. Avian eggshell membrane polypeptide extraction via fermentation process. **United States Patent nº 2007/0017447 A1**, 2007.

WEDEKIND, K. J.; RUFF, K. J.; ATWELL, C. A.; EVANS, J. L.; BENDELE, A. M. Beneficial effects of natural eggshell membrane (NEM) on multiple indices of arthritis in collagen-induced arthritic rats. **Modern Rheumatology**, v. 27, p. 838-848, 2017.

WONG, M. M. J. C.; HENDRIX, K.; VON DER MARK, C. L.; STERN, R. Collagen in the egg shell membranes of the hen. **Developmental Biology**, v.104, p.28–36, 1984.

XAVIER, A. C. R. Tecnologias inovadoras na obtenção de bebidas lácteas probióticas. [Tese] Doutorado em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe, 2019.

YANG, M.; LIANG, Z.; WANG, L.; QI, M.; LUO, Z.; LI, L. Microencapsulation Delivery System in Food Industry – Challenge and the Way Forward. **Advances in Polymer Technology**, 2020.

YOO, J. H.; KIM, J. K.; YANG, H. J.; PARK, K. M. Effects of Egg Shell Membrane Hydrolysates on UVB-radiation-induced Wrinkle Formation in SKH-1 Hairless Mice. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, p. 58-70, 2015.

ZHANG, Y.; GUO, Y.; LIU, F.; LUO, Y.; Recent development of egg protein fractions and individual proteins as encapsulant materials for delivery of bioactives. **Food Chemistry**, v. 403, 2023.

ZHAO, Q. C.; ZHAO, J. Y.; AHN, D. U.; JIN, Y. G.; HUANG, X. Separation and identification of highly efficient antioxidant peptides from eggshell membrane. **Antioxidants**, v. 8, p. 45, 2019.

ZHAO, Y. H.; CHI, Y. J. Characterization of Collagen from Eggshell Membrane. **Biotechnology**, v. 8, 2009.

ANEXO



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2021 026440 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 13031547000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária, "Prof. José Aloísio de Campos", Bairro Rosa
Elze

Cidade: São Cristóvão

Estado: SE

CEP: 49100000

País: Brasil

Telefone: (79) 3194-8885

Fax:

Email: cinttec.ufs@gmail.com

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 27/12/2021 às
10:24, Petição 870210120598