

## MICROENCAPSULAÇÃO DO ERGOCALCIFEROL: ESTUDO DO PROCESSO E DIGESTIBILIDADE EM UM ALIMENTO PLANT-BASED

**Palavras-Chave:** VITAMINA D, FORTIFICAÇÃO, ESTABILIDADE, MÉTODO *IN VITRO* ESTÁTICO, MICROPARTÍCULAS

**Autores(as):** ANA RAQUEL ANDRADE DE OLIVEIRA FEA-UNICAMP  
Prof. Dra. LOUISE EMY KUROZAWA (orientadora) LINA-UNICAMP  
Prof Dr. ANTÔNIO VICENTE e Dra. ANA CRISTINA PINHEIRO (co-orientadores)  
UNIVERSIDADE DO MINHO-PT

---

### 1. Introdução

A vitamina D é essencial para a manutenção da saúde do ser humano, atuando nos sistemas muscular, ósseo e imunológico. Pode ser obtida via alimentação ou síntese cutânea. Embora seja de fácil obtenção, ainda existe uma deficiência acometendo um grande número de pessoas, especialmente no hemisfério norte. Contornar essa deficiência pode ser um grande desafio principalmente aos adeptos a dieta vegetariana/vegana, uma vez que ela é majoritariamente encontrada em produtos de origem animal (GREGORY, 2008; HOLICK citado por GIUDICI et al., 2018; CHAN).

A suplementação aparece como uma forma prática de incorporar nos alimentos plant-based em quantidade suficiente para atender as necessidades dietéticas da população. Entretanto, sua grande instabilidade, especialmente frente às exposições à luz, oxigênio e calor, dificulta sua incorporação de maneira eficiente (ARAUJO et al, 2013; HOLICK, 2007; WILSON, 2017; GREGORY, 2008).

A microencapsulação aparece como uma solução, já que cria uma barreira que envolve e protege um determinado composto de interesse das condições adversas do meio (XIAO; ZHOU; Yi, 2012). Além disso, as micropartículas criam um sistema de entrega e liberação controlada durante o processo de digestão, podendo levar a melhor dispersibilidade em água, aumento da estabilidade dentro do organismo e aumento da biodisponibilidade dessa vitamina. Para além dessas vantagens, as microcápsulas asseguram a manutenção da atividade vitamínica, previnem a sua degradação, aprimoram a absorção e distribuição da mesma dentro do organismo (McCLEMENTS, 2015).

Há diversas técnicas de microencapsulação reportadas na literatura, dentre elas pode ser citada a secagem por atomização ou *spray drying*. A seleção adequada do agente encapsulante é necessária para obter maiores eficiências de encapsulação e garantir a formação de partículas com boas propriedades físico-químicas e de proteção ao composto de interesse. Dentre os diferentes agentes encapsulantes usados na produção de micropartículas por *spray drying*, tem-se a maltodextrina. Entretanto, a limitação do uso desse material de parede é a sua baixa capacidade emulsificante, além de resultar na formação de uma parede porosa (REINECCIUS; YAN, 2016). A estabilização da emulsão pode ser alcançada combinando a maltodextrina com proteínas, uma vez que estas possuem capacidade de adsorver na interface óleo/água, formando uma emulsão estável. Tal fato resulta em maior

eficiência de encapsulação e maior proteção oxidativa (Jafari et al., 2008). Também, de acordo com Reineccius e Yan (2016), as proteínas tendem a formar uma estrutura mais densa, diminuindo a permeabilidade do oxigênio no interior da micropartícula, minimizando a degradação oxidativa do composto de interesse.

O uso de proteínas vegetais como agentes estabilizantes em emulsões em detrimento das proteínas animais, apresenta diversas vantagens, pois é uma fonte renovável, biodegradável, além de apresentar interessantes propriedades físico/químicas. A alfarroba tem várias aplicações industriais, mas o germen de alfarroba, subproduto de baixo custo na produção da goma de alfarroba, é uma proteína com potencial de aplicação em sistemas emulsionados. Devido a sua baixa solubilidade em água, especialmente em baixos valores de pH, sua versão hidrolisada também vem sendo estudada, uma vez que nessa conformação tem sua solubilidade aumentada (BENGOECHEA et al., 2008).

Em sistemas emulsionados, o uso de agentes estabilizantes é apenas uma forma de aumentar a estabilidade da emulsão. Uma estratégia é a formação de emulsões multicamadas. Nesse caso, aliado ao agente encapsulante e estabilizante, cria-se uma terceira camada, na qual um polímero de carga oposta (por exemplo, a pectina usada neste trabalho) se liga à proteína por atrações eletrostáticas, assegurando maior proteção ao composto de interesse e estabilidade à emulsão. Alcançar a estabilidade da emulsão garante maior eficiência de encapsulação e maior proteção à vitamina D (Güzey et al., 2006; Burgos-Díaz et al., 2016).

Como já abordado, ao microencapsular a vitamina D, alteramos a forma como o organismo a digere e absorve. De fato, estudos comprovam que em ambos os casos pode haver uma potencialização. Há vários modelos gastrointestinais que permitem estudar o que acontece pós ingestão. Destes, destacam-se o modelo de digestão *in vitro* estático harmonizado, cujo objetivo é replicar o trato gastrointestinal, simulando as três fases da digestão, oral, gástrica e intestinal. Baseia-se na quantificação de ácidos graxos livres liberados pelos lipídios, geralmente triacilgliceróis, em condições de pH próximos à neutralidade (ALI; SIDDIQUI; NAZZAL, 2010).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver diferentes emulsões, simples e multicamadas e avaliar as micropartículas formadas, em termos das suas características físico-químicas e o seu comportamento quando submetidas a um processo de digestão *in vitro* estático.

## **2. Materias e métodos**

**2.1 Materiais:** A proteína concentrada de alfarroba (PCA, 54% proteína), maltodextrina com DE 10 (MD), óleo de linhaça, pectina, ergocalciferol puro (vitamina D2). Pepsina da mucosa gástrica porcina, pancreatina porcina, extrato de bilis de porco. Todos os outros reagentes são de qualidade analítica ou grau HPLC.

**2.2. Obtenção de hidrolisado proteico de alfarroba:** Uma suspensão aquosa contendo concentrado proteico de alfarroba (10%) foi hidrolisada pela ação da protease Protamex a pH 8,0 e 50°C, até grau de hidrólise 2%, determinado pelo método pH-stat.

**2.3. Preparo das emulsões:** foram feitas quatro formulações de emulsão, CPC SE (simples e utilizando de proteína concentrada como agente estabilizante), CPH SE (simples com proteína hidrolisada), CPC ME (multicamadas com proteína concentrada) e CPH ME (multicamadas com proteína hidrolisada). Em todos os casos, a emulsão primária foi obtida,

misturando via Ultra Turrax a 20.000 rpm por 4 min, a vitamina D (material lipofílico) já dissolvida em óleo de linhaça, com um preparado de proteína em água (concentrada ou hidrolisada).

Em seguida adicionou-se o material de parede, a maltodextrina, e nas formulações multicamadas, pectina também. Foi ajustado o pH no final quando necessário.

**2.4. Spray drying:** A microencapsulação foi produzida através do processo de secagem por pulverização das emulsões. O processo foi conduzido em escala laboratorial, seguindo condições controladas: temperatura de entrada do ar 180°C, vazão de 485 mL/h e pressão de 2,8 bar.

**2.5. Tamanho das micropartículas:** Foi utilizado o instrumento de difração a laser (Malvern Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Reino Unido) para determinar a distribuição das micropartículas.

**2.6. Umidade e atividade de água das micropartículas:** A umidade foi obtida gravimetricamente em estufa de circulação forçada à temperatura de 105°C (AOAC, 2006). Já a atividade de água foi medida no AquaLab 4TEV, Decagon Devices Inc, EUA a 25°C.

**2.7. Digestão *in vitro* estática:** Foi realizada conforme protocolo da INFOGEST (Brodkorb et al., 2019). Nos três casos, o processo de digestão foi conduzido ressuspensando as micropartículas em água mili-Q.

**2.7.1 Análise de ácidos graxos livres:** Foi realizada conforme o protocolo da INFOGEST para as fases oral e gástrica, sendo que a fase intestinal, foi realizada no pH stat (902 Titrand, Metrohm, Suíça). O equipamento fornece a quantidade de NaOH necessária para manter o pH constante e a partir dele calcula-se o teor de ácidos graxos liberados.

**2.7.2 Tamanho das micropartículas ao longo da digestão:** Foi determinado ao longo da digestão, retirando 1000 µL de amostra em cada fase, para posterior análise no mastersizer (Malvern Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Reino Unido).

**2.7.3 Estabilidade e bioacessibilidade da vitamina D:** Para esta análise, 1000 µL de amostra foram retirados após o processo de digestão, para analisar a vitamina D em termo de sua estabilidade por HPLC. O restante foi centrifugado, sendo o sobrenadante retirado para análise de bioacessibilidade por HPLC.

### 3. Resultados

#### 3.1 Propriedades das micropartículas: os resultados estão ilustrados na Tabela 1

**Tabela 1**-Propriedades das quatro formulações de micropartículas

	CPC SE	CPH SE	CPC ME	CPH ME
<b>Índice de polidispersividade</b>	3,57 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,53 ± 0,22 <sup>b</sup>	2,67 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,32 ± 0,18 <sup>c</sup>
<b>Diâmetro de partícula</b>	21,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	16,8 ± 0,4 <sup>b</sup>	19,6 ± 0,2 <sup>c</sup>	18,9 ± 1,1 <sup>b</sup>
<b>Umidade (BU)</b>	2,2 ± 0,1	0,6 ± 0,3	1,6 ± 0,1	1,3 ± 0,4
<b>Atividade de água</b>	0,154 ± 0,000	0,128 ± 0,008	0,170 ± 0,001	0,138 ± 0,003

Letras minúsculas representam diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre as diferentes micropartículas

### 3.3 Digestão *in vitro* estática:

#### 3.3.1 Análise de ácidos graxos livres:

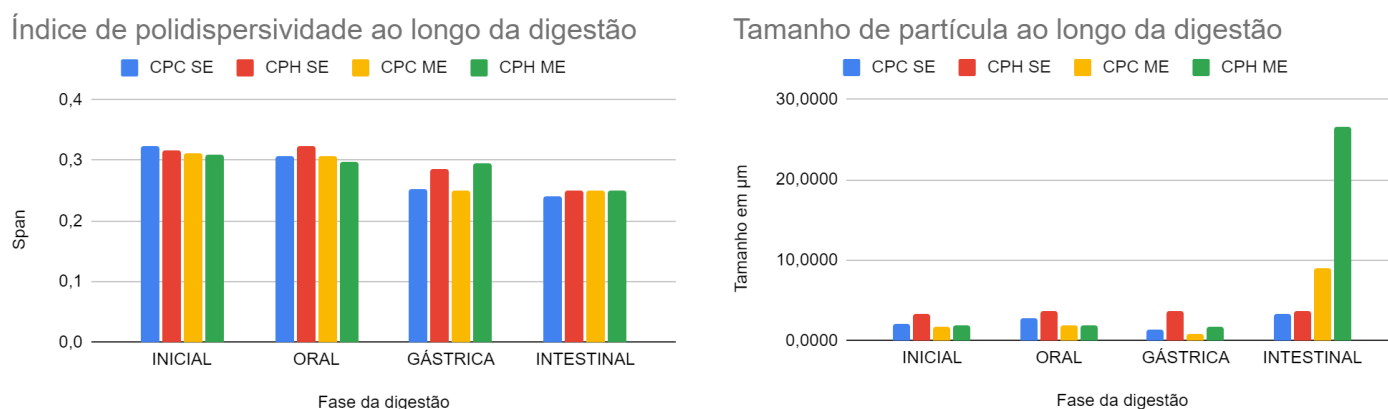
Tabela 2- Porcentagem calculada de ácidos graxos livres obtidos via ensaios em pH stat

	CPC SE	CPH SE	CPC ME	CPH ME
%FFA <sub>médio</sub> e desvio padrão	40,6 ± 0,2	48,7 ± 1,2	45,1 ± 0,6	63,7 ± 6,0

As micropartículas contendo emulsões multicamadas (ME) apresentaram maior teor de ácidos graxos livres em relação às emulsões simples (SE), evidenciando processo digestivo lipídico mais completo. Pode-se notar também que as formulações que possuem a proteína hidrolisada como agente estabilizante (CPH), apresentaram maior teor de ácidos graxos livres. Este resultado pode estar associado a maior porosidade do filme viscoelástico formado a partir das proteínas hidrolisadas, uma vez que neste caso, a emulsão perde a capacidade de formar um filme estável na parede, o que leva a um aumento na porosidade, que permite um maior acesso e adsorção das enzimas e sais biliares e, conseqüentemente, uma maior lipólise.

#### 3.3.2 Tamanho das micropartículas e dispersão ao longo da digestão:

Figura 1: Gráficos obtidos por meio da análise em mastersizer relativo ao índice de polidispersividade e tamanho de partícula



FONTE: Autoria própria (2024)

Em relação ao tamanho das micropartículas ao longo da digestão, é possível observar que nas formulações com CPC, há decréscimo do tamanho na fase gástrica. Por outro lado, quando o agente estabilizante foi a CPH, o tamanho da partícula em relação às três primeiras fases mantém-se praticamente constante. Entretanto, para as partículas com ME, ambos os casos, houve aumento significativo do tamanho na fase intestinal em relação à fase anterior.

A interação da pepsina com a CPC durante a fase gástrica pode ser correlacionado com a diminuição de tamanho observada, pois ela degrada a proteína, resultando na quebra das estruturas das micropartículas levando a redução do tamanho. Nas formulações em que o agente estabilizante é a CPH, o comportamento linear observado na fase inicial, oral e gástrica, pode estar relacionado a estrutura da proteína hidrolisada não sofrer alterações

significativas durante a fase gástrica uma vez que já está parcialmente quebrada (MALDONADO et al, 2008; Zhang et al, 2021).

O aumento significativo do tamanho das micropartículas na fase intestinal em formulações contendo pectina pode ser explicado pela interação da pectina com os componentes da fase intestinal (p.e. pancreatina, sais biliares), que pode levar à formação de estruturas gelatinosas ou redes que aumentam o tamanho das micropartículas (MALDONADO et al, 2008; Zhang et al, 2021).

Já em relação a dispersão das partículas, o índice de polidispersividade mostra um comportamento similar em todos os casos, ou seja, decréscimo do valor ao longo da digestão. A CPC sofre degradação pela pepsina na fase gástrica, o que promove a quebra das micropartículas. Essa degradação pode resultar em um tamanho de partícula mais uniforme. Já nas formulações que contenham pectina, sua presença promove a formação de redes e interações adicionais durante a digestão, o que resulta em uma distribuição mais uniforme do tamanho das micropartículas (MALDONADO et al, 2008; Zhang et al, 2021).

### **Bibliografia:**

ALI, H; SIDDIQUI, A.; NAZZAL, S. The effect of media composition, pH, and formulation excipients on the in vitro lipolysis of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS). *Journal of Dispersion Science and Technology*, New York, v.31, p.226-232, 2010.

ARAUJO, M. C.; BEZERRA, I. N.; BARBORA, F. S.; JUNGUER, W. L.; YOKOO, E. M.; PEREIRA, R. A.; SICHIERI, R.; Macronutrient consumption and inadequate micronutrient intake in adults. *Rev. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.1, p. 2-11, 2013.

BENGOECHEA, C.; PUPPO, M. C.; ROMERO, A.; CORDOBÉS, F.; GUERRERO, A. Linear and non-linear viscoelasticity of emulsions containing carob protein as emulsifier. *Journal of Food Engineering*, v. 87, n. 1, p. 124-135, 2008.

César Burgos-Díaz, M. Gallardo, E. Morales, J. Piornos, A.M. Marqués, M. Rubilar. Utilization of proteins from AluProt-CGNA (a novel protein-rich lupin variety) in the development of oil-in-water (O/W) multilayer emulsion systems. *Eur J Lipid Sci Technol* (2016), p. 117, 10.1002/ejlt.201500260.

Chan J, Jaceldo-Siegl K, Fraser GE. Serum 25-hydroxyvitamin D status of vegetarians, partial vegetarians, and nonvegetarians: the Adventist Health Study-2. *Am J Clin Nutr*. 2009; 89(5):1686S-169S. Dima, C.; Assadpour, E.; Dima, S.; Jafari, S.M. Bioavailability of nutraceuticals: Role of the food matrix, processing conditions, the gastrointestinal tract, and nanodelivery systems. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*. 2020, 19, 954-994.

D. Güzey, D.J. McClements. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Adv Colloid Interface Sci*, 128-130 (2006), pp. 227-248

Giudici, K.V., Peters, B.S.E., Martini, L.A. Vitamina D. Série de publicações ILSI Brasil: Funções plenamente reconhecidas de nutrientes. ILSI Brasil International Life Sciences Institute do Brasil, São Paulo, 2018.

GREGORY, J. F. Vitamins. In: DAMODARAN, S.; PARKING, K. L.; FENNEMA, O. R. *Fennema's Food Chemistry*. 4th edn. Taylor & Francis Group, LLC London, 2008.

HOLICK, M.F. The vitamin D epidemic and its health consequences 1, 2, 3, 4. *The Journal of Nutrition*, 135, 11, S2739-S2748, 2005.

MALDONADO-VALDERRAMA, E.; DICKINSON, E.; MATSUMURA, Y. The orogenic model of displacement of proteins from fluid interfaces has been tested on a biological system with direct implications on nutrition and health. *Langmuir*, v. 24, n. 13, p. 6766-6776, 2008.

Reineccius, G.A.; Yan, C. Factors controlling the deterioration of spray dried flavourings and unsaturated lipids. *Flavour and Fragrance Journal*, 31, 5-21, 2016.

Wilson, L. R., Tripkovic, L., Hart, K. H. & Lanham-New, S. A. (2017). Vitamin D deficiency as a public health issue: using vitamin D2 or vitamin D3 in future fortification strategies. *Proc Nutr Soc* 76, 392-399.

ZHANG, S. et al. Synergistic interactions of plant protein microgels and cellulose nanocrystals at the interface and their inhibition of the gastric digestion of Pickering emulsions. *Food Hydrocolloids*, v. 108, p. 105927, 2020.

ZHU, G. Y.; XIAO, Z. B.; ZHOU, R.J. F.; YI, P. VASBINDER, A. J.; ALTING, A. C.; VISSCHERS, R. W.; DE KRUIF, C. G. Texture of acid milk gels: Formation of disulfide cross-links during acidification. *International Dairy Journal*, v.13, p. 29-38, 2003.