



ValorNatural – Valorização de Recursos Naturais através da Extração de Ingredientes de Elevado Valor Acrescentado para Aplicações na Indústria Alimentar.

Entregável nº 5.2.2.

Versão do Documento: 2

Data de Submissão: 31/08/2021

Responsável: CIMO

Nome do Documento: Relatório dos procedimentos de estabilização mais eficientes para os ingredientes bioativos

Histórico de Revisão

Revisão	Data	Parceiros Envolvidos	Descrição

Lista de Autores

Filomena Barreiro

Arantzazu Santamaria-Echart

Stephany Cunha de Rezende

Ângela Fernandes

Rossana Cardoso

CONFIDENCIAL

Sumário

Neste relatório estão descritos os procedimentos mais eficientes que foram adotados com o intuito de conferir maior estabilidade e compatibilidade com a água ao ingrediente bioativo, nomeadamente a vitamina D2.

CONFIDENCIAL

Índice

1. Identificação.....	5
2. Informação.....	6

1. Identificação

<i>Deliverable</i>	E.5.2.2. Relatório dos procedimentos de estabilização mais eficientes para os ingredientes bioativos
Tipo de <i>deliverable</i>	Relatório
Nível de disseminação	Confidencial
PPS	PPS5. Bioativos naturais

2. Informação

VITAMINA D2: ENCAPSULAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO

Nota: O estudo preliminar com a vitamina D2 sintética foi necessário no sentido de otimizar as metodologias de estabilização numa molécula análoga.

Preparação das partículas contendo a vitamina D2

Os dois sistemas de encapsulação de VitD2 foram preparadas usando o polímero sintético polivinilpirrolidona (PVP, de Sigma-Aldrich) e o polímero natural K-carragenina (KC, de Acros Organics) como polímeros encapsulantes, por meio da técnica de DS e secagem baseada em *spray-drying*. A **Figura 1** evidencia o equipamento *spray-dryer* e a formulação das partículas está resumida na **Tabela 1**.

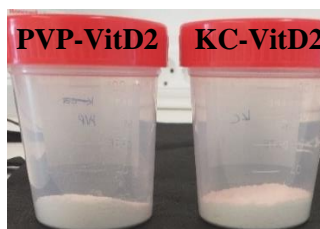


Figura 1. Equipamento de *Spray-dryer* utilizado para a preparação das partículas.

Tabela 1. Composição das partículas preparadas contendo VitD2.

Amostra	Polímero	Conteúdo em VitD (wt%, base-polímero)	Conteúdo em Tween80 (wt%, base-polímero)	pH
PVP-VitD2-2,5	PVP	2,5	15	6
PVP-VitD2-5	PVP	5	15	6
PVP-VitD2-10	PVP	10	15	6
PVP-VitD2-15	PVP	15	15	6
KC-VitD2-2,5	KC	2,5	15	6
KC-VitD2-5	KC	5	15	6
KC-VitD2-10	KC	10	15	6
KC-VitD2-15	KC	15	15	6

As partículas foram preparadas pela tecnologia de dispersão sólida [1,2]. O processo compreende numa primeira etapa a formação das partículas que são, posteriormente, secas. No presente estudo, e visando um reescalonamento apropriado e fácil, utilizou-se como processo de secagem a técnica de *spray-drying*. O polímero (PVP ou KC) e o Tween80 foram dissolvidos numa solução aquosa com tampão a pH 6, preparada com o ácido cítrico e citrato de sódio (0,23 g e 1,12 g, respetivamente em 100 mL de H₂O). Simultaneamente, a VitD2 foi dissolvida em 50 mL de etanol e esta solução foi adicionada à solução aquosa preparada anteriormente. A mistura foi ultrasonificada durante 10 min (30/10 s de ciclos on/off a 70% de potência). A mistura resultante foi seca em *spray-dryer* utilizando um fluxo de 11 mL/min, temperatura de entrada de 140 °C, fluxo de aspiração de 30 m³/h, com um fluxo de N₂ de 667 L/h, obtendo-se assim um produto em forma de pó o qual foi armazenado a 10 °C (protegido da luz) até à sua posterior caracterização. A aparência macroscópica das partículas produzidas é apresentada na **Figura 2**.


Figura 2. Aparência das partículas produzidas pelo método de *spray-drying*.

Caracterização das partículas

Rendimento do processo de Spray-drying

O rendimento do processo de *spray-drying* para a produção de cada sistema, ou seja, PVP-VitD2 e KC-VitD2 foi determinado de acordo à equação (1):

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{w_p}{w_i} \cdot 100$$

Onde w_p é a massa (g) das partículas produzidas e w_i é a soma das massas (g) dos compostos iniciais (polímero, Tween80, VitD2, ácido cítrico e citrato de sódio).

Os rendimentos do processo variaram de 55,2 a 65,2 wt% de acordo com as formulações (**Tabela 2**). Observou-se um ligeiro aumento no rendimento para o polímero K-carragenina comparativamente com o PVP, porém, no geral, os resultados apresentaram similaridade entre todas as formulações, indicando a reprodutibilidade do método utilizado.

Tabela 2. Rendimento do processo de produção das partículas preparadas contendo a VitD2.

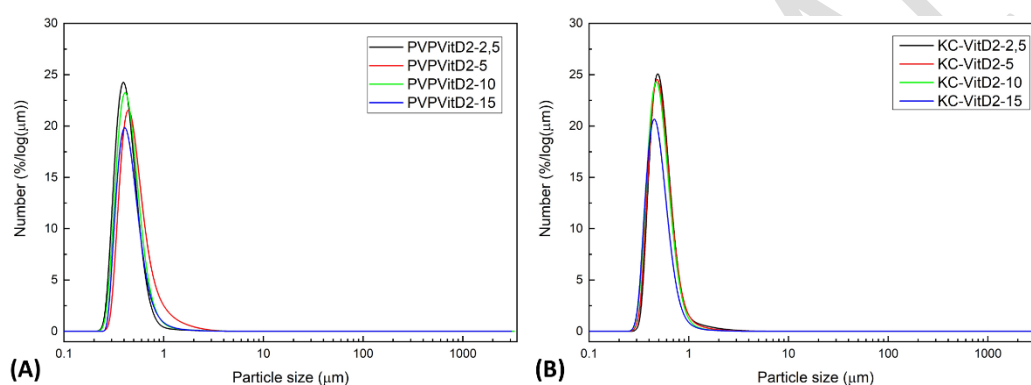
Amostra	Rendimento wt%
PVP-VitD2-2,5	61,4
PVP-VitD2-5	59,4
PVP-VitD2-10	55,2
PVP-VitD2-15	56,6
KC-VitD2-2,5	62,2
KC-VitD2-5	60,9
KC-VitD2-10	65,2
KC-VitD2-15	56,7

Tamanho de partícula e distribuição das partículas

A distribuição de tamanho e respetivo tamanho em número foi medido por difração Laser usando um analisador de partículas Malvern, Mastersizer 3000. O tamanho de partícula em número correspondente a 10, 50 e 90% da amostra, foi medido e referido como D_{10} , D_{50} e D_{90} , respetivamente, estando representado na **Tabela 3**. Adicionalmente, a sua distribuição (em número) é apresentada na **Figura 3**.

Tabela 3. D₁₀, D₅₀ e D₉₀ em número obtido para as amostras produzidas.

Amostra	D ₁₀ (μm)	D ₅₀ (μm)	D ₉₀ (μm)
PVP-VitD2-2,5	0,32±0,00 10 ⁰	0,41±5,48 10 ⁻⁴	0,59±8,37 10 ⁻⁴
PVP-VitD2-5	0,36±0,00 10 ⁰	0,49±4,47 10 ⁻⁴	0,83±1,30 10 ⁻³
PVP-VitD2-10	0,33±4,47 10 ⁻⁴	0,43±8,94 10 ⁻⁴	0,64±1,30 10 ⁻³
PVP-VitD2-15	0,36±2,07· 10 ⁻³	0,47±3,58· 10 ⁻³	0,70±8,44· 10 ⁻³
KC-VitD2-2,5	0,40±0,00 10 ⁰	0,52±0,00 10 ⁰	0,75±0,00 10 ⁰
KC-VitD2-5	0,39±0,00 10 ⁰	0,51±0,00 10 ⁰	0,74±0,00 10 ⁰
KC-VitD2-10	0,38±4,47 10 ⁻⁴	0,50±0,00 10 ⁰	0,71±4,47 10 ⁻⁴
KC-VitD2-15	0,39±4,47· 10 ⁻⁴	0,51±4,47· 10 ⁻⁴	0,73±5,48· 10 ⁻⁴


Figura 3. Distribuição do tamanho de partícula em número das amostras utilizando os polímeros (A) polivinilpirrolidona (PVP) e (B) K-carragenina (KC).

As amostras apresentaram um valor D₅₀ entre 0,41 e 0,52 μm, indicando a sua nano/micro escala, enquanto que o D₉₀ da amostra apresentou valores entre 0,59 a 0,83 μm. Adicionalmente, a distribuição de tamanho estreita, a qual pode ser observada na **Figura 3**, denotou a homogeneidade (em termos de tamanho) obtido durante a formação das partículas. Em geral, todas as amostras apresentaram tamanhos semelhantes para os valores D₁₀, D₅₀ e D₉₀, e perfis de distribuição similares, evidenciando a reprodutibilidade do processo em termos de tamanho dos produtos obtidos, facto de grande importância para a uniformização do produto final.

Morfologia das partículas

As características morfológicas das partículas foram analisadas por microscopia eletrónica de varredura (MEV), e as imagens foram adquiridas utilizando um microscópio eletrónico de varredura Phenom Pro (Thermo Fisher Scientific, Dillenburgstraat,

Holanda). As imagens foram adquiridas para as amostras PVP-VitD2-15 (**Figura 4A**) e KC-VitD2-15 (**Figura 4B**).

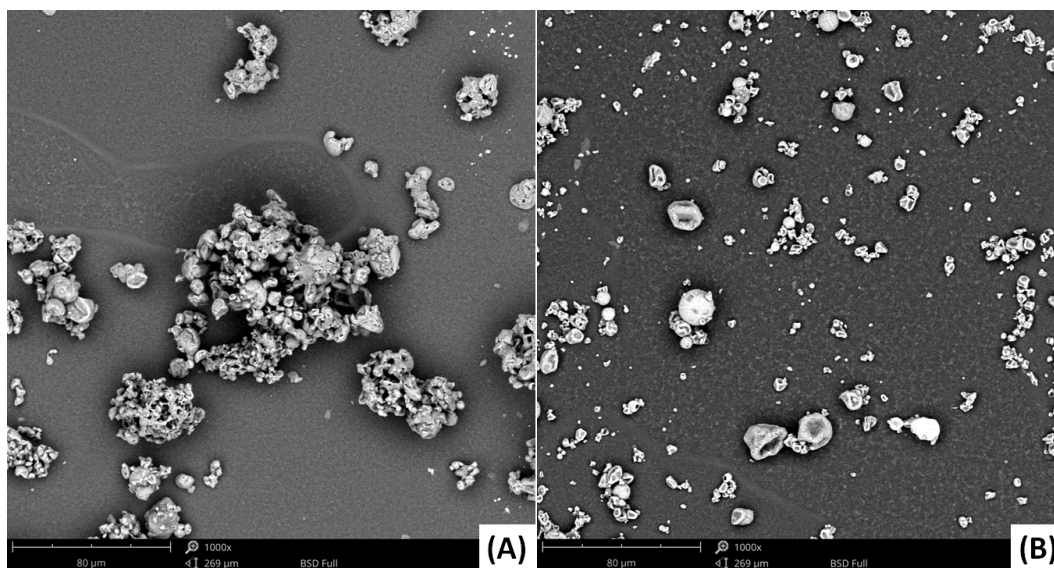


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV, 1000x) para as amostras (A) PVP-VitD2-15 e (B) KC-VitD2-15.

As partículas apresentaram forma esférica, além de uma distribuição de tamanho homogêneo. Exceto algumas partículas de tamanho mais elevado, no geral, a distribuição é uniforme nos dois casos (PVP-VitD2-15 e KC-VitD2-15) e corrobora os tamanhos nano/micrométricos obtidos na análise de tamanho de partícula mediante DLS.

É possível observar alguns sinais de aglomeração, principalmente na formulação PVP-VitD2-15. A aglomeração das partículas é comum no processo de secagem por *spray-dryer*, uma vez que possuem tamanho de nano/microescala. Além disso, este fator não interfere na estabilidade das amostras, uma vez que as partículas serão dissolvidas na sua aplicação final, desfazendo os aglomerados.

Propriedades físico-químicas das partículas

As propriedades físico-químicas e a efetiva encapsulação da VitD2 foram analisadas por Espectroscopia infravermelho de transformada de Fourier (FTIR) utilizando um equipamento MB300 (ABB, Zurich, Switzerland), registrando os espectros com uma média de 32 varrimentos e uma resolução de 16 cm^{-1} (de 4000 até 550 cm^{-1}) em modo de refletância atenuada total (ATR). Os compostos iniciais (PVP ou KC, Tween80 e VitD2) e as partículas (PVP-VitD2 e KC-VitD2) foram analisados, assim como as misturas

físicas PVP-VitD2(M) e KC-VitD2(M), correspondentes às partículas PVP-VitD2 e KC-VitD2, respetivamente, sendo estas preparadas apenas pela mistura dos compostos iniciais. Os espectros das formulações baseadas em PVP ou KC são apresentadas na **Figura 5** e **Figura 6**, respetivamente.

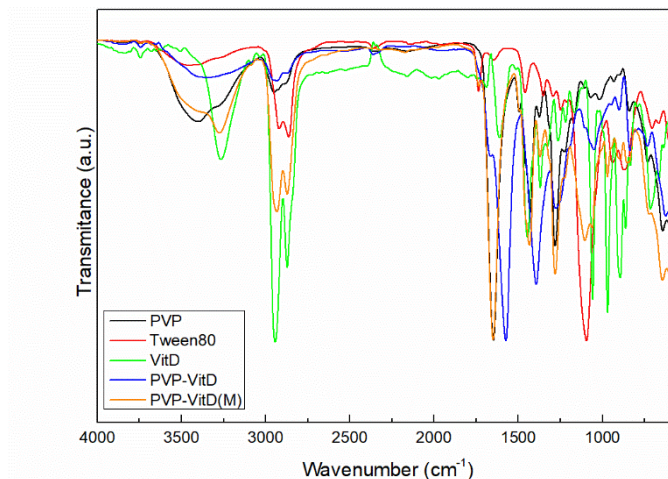


Figura 5. Espectros FTIR da formulação baseada em PVP: Compostos iniciais, partículas e misturas físicas.

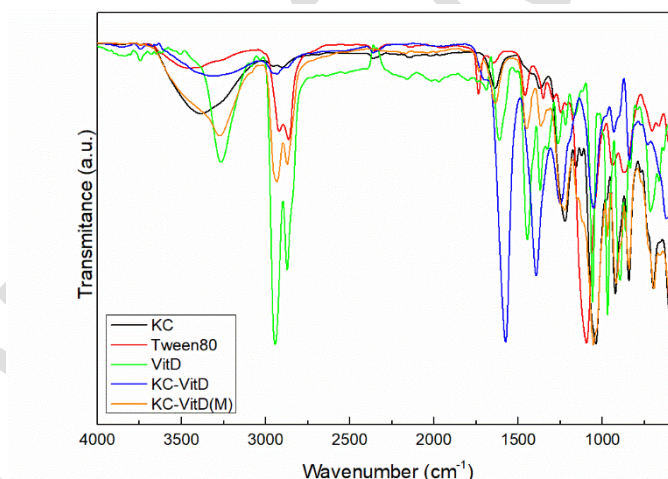


Figura 6. Espectros FTIR da formulação baseada em PVP: Compostos iniciais, partículas e misturas físicas.

De acordo com os compostos iniciais, verificaram-se os picos típicos do PVP [3] onde se observou uma banda compreendido de 3000 até 3600 cm⁻¹ relacionada com a vibração de alongamento dos grupos hidroxilo e um pico centrado entre 2800 e 3000 cm⁻¹, atribuído à vibração de alongamento assimétrica dos grupos C-H. O pico a 1650 cm⁻¹, está relacionado com a vibração de alongamento dos carbonilos (C=O) da amida, enquanto que o pico em 1412 cm⁻¹ foi atribuído à vibração de alongamento dos grupos C-N.

No caso da K-carragenina [4] os picos na gama 3000 – 3600 e 2800 – 3000 cm^{-1} foram associados às vibrações de alongamento dos grupos hidroxilo e C-H, respetivamente. O pico a 1219 cm^{-1} foi associado à vibração por alongamento dos grupos S=O dos grupos sulfato, enquanto que o pico próximo de 1040 cm^{-1} foi atribuído à vibração de alongamento dos grupos C-O-C. O composto encapsulado, ou seja, a VitD2 [5], apresentou um pico a 3260 cm^{-1} devido à vibração de alongamento dos grupos hidroxilo, assim como os picos a 2943 e 2866 cm^{-1} , que foram atribuídos à vibração por alongamento dos grupos C-H e o centrado em 1610 cm^{-1} à vibração de alongamento dos grupos C=O.

As partículas evidenciaram picos para um número de onda similar ao dos respetivos compostos iniciais. Contudo, deve-se assinalar que, em comparação com as misturas físicas, estas últimas, apresentaram picos sobrepostos com os verificados para a VitD2 (*p. ex.* a 3265 cm^{-1}), fato não observado nos espetros das partículas. Adicionalmente, os picos característicos dos polímeros (*p. ex.* a 1650 cm^{-1}) sobrepostos nas misturas físicas, foram deslocados para números de onda inferiores, relativamente aos espetros das partículas. Estes pontos, corroboraram a encapsulação eficiente da VitD2, o que é evidenciado pela ausência dos seus picos característicos e observação da deslocação de outros picos devido à criação de novas interações.

Metodologia de extração da VitD2 encapsulada nas partículas

Com o intuito de determinar a vitamina D2 encapsulada no interior das partículas formadas, foi utilizada a seguinte metodologia de extração: foram adicionados 5 mL de DMSO:H₂O (9:1) a 10 mg de partículas (sistema PVP-VitD2 ou KC-VitD2) e a solução incubada em banho-maria a 60 °C durante 10 min. De seguida, as amostras foram arrefecidas em gelo, seguido da adição de 10 mL de isoctano, tendo ficado este sistema sob agitação constante durante a noite à temperatura ambiente. Após esta etapa, adicionou-se 2 mL de água desionizada e deixou-se em repouso (15 min) para separar o DMSO do isoctano. Seguidamente, as amostras foram centrifugadas (2000 × g, 10 min, centrífuga refrigerada, Centurion K24OR, West Sussex, Reino Unido). Posteriormente, retirou-se o sobrenadante das amostras e procedeu-se à sua evaporação (\pm 40 °C, Hei-VAP Advantage, Heidolph, Germane). Os extratos secos foram redissolvidos em 1 mL de metanol, filtrados (*nylon* Whatman de 0,1 μm) e analisados por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) [6].

O sistema utilizado foi um HPLC (sistema Knauer, Smartline 1000, Berlin, Germany) acoplado a um detetor ultravioleta (UV, Knauer Smartline 2500), operando nas condições descritas pelos autores Barreira et al. [7]. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna de fase reversa Inertsil 100A ODS-3 (5 µm, 250 × 4,6 mm, BGB Analytik AG, Boeckten, Suíça) a 35 °C. A fase móvel utilizada foi metanol/acetoneitrilo (30:70, v/v) com fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 280 nm.

Posteriormente, os resultados foram analisados utilizando o software Clarity 2.4 (DataApex, Pod ohradská, República Tcheca) e a VitD2 quantificada com base na curva de calibração obtida com um padrão comercial desta (Acrós Organics, New Jersey, EUA). Os resultados foram expressos em mg de VitD2 por g de partículas (parâmetro designado por carga (*load*) das partículas). Os cromatogramas obtidos para os dois tipos de partículas produzidas encontra-se representado na **Figura 7**.

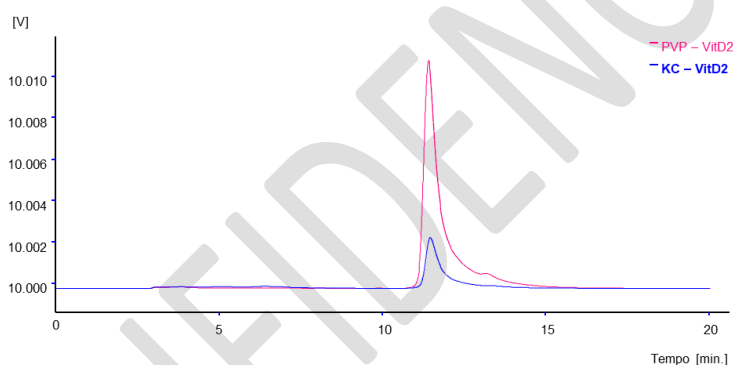


Figura 7. Perfil cromatográfico da vitamina D2 presente nos sistemas PVP-VitD2 e KC-VitD2 com 15% de conteúdo em VitD (wt%, base-polímero).

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 3**, o sistema PVP-VitD2-15 (28,10±0,03 mg/g de partículas) conduziu a uma encapsulação mais efetiva dado que uma maior quantidade de VitD2 por g de partículas foi obtida comparativamente com o sistema KC-VitD2-15 (5,92±0,01 mg/g de partículas).

Eficiência do processo de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) para cada sistema (PVP-VitD2 e KC-VitD2) foi determinada de acordo com a equação (2):

$$Eficiência\ Encapsulação\ (\%) = \frac{w_{ep}}{w_t} \cdot 100$$

Onde w_{ep} traduz a massa de VitD2 encapsulada, isto é a massa de VitD2 existente no interior das partículas e por g de partículas, tal como determinada por HPLC e w_t é a massa teórica de VitD2 por g de partículas (dada pela seguinte fórmula: massa de VitD2/massa dos compostos iniciais (Σ ácido cítrico, citrato de sódio, polímeros, Tween80 e VitD2)).

Para os sistemas testados, a eficiência de encapsulação (EE) foi superior para o sistema PVP-VitD2-15, nomeadamente 87,58 % (**Tabela 4**).

Tabela 4. Determinação cromatográfica da Vitamina D2 nos sistemas PVP-VitD2 e KC-VitD2 e eficiência de encapsulação.

Amostras	Load em VitD2 (mg VitD2/g de partícula)	Eficiência de Encapsulação da VitD2 (%)
PVP-VitD2-2,5	4,20	76,42
PVP-VitD2-5	8,08	73,93
PVP-VitD2-10	15,49	71,64
PVP-VitD2-15	28,10	87,58
KC-VitD2-2,5	3,80	69,16
KC-VitD2-5	8,35	76,40
KC-VitD2-10	18,69	86,44
KC-VitD2-15	5,92	18,44

Em síntese, verificou-se que a VitD2 foi efetivamente encapsulada e que as partículas produzidas, nomeadamente para o caso do sistema PVP-VitD2-15 conduziu a EE mais atrativa para o desenvolvimento de uma aplicação industrial.

Testes de incorporação das partículas em farinha

De forma a avaliar a viabilidade de incorporação das partículas desenvolvidas em farinhas e a preservação da VitD2, foram realizados testes preliminares onde a VitD2 foi incorporada em farinha e foi utilizada no fabrico do pão. A quantificação da vitamina no pão foi determinada utilizando o processo de extração e determinação cromatográfica de acordo com a metodologia anteriormente descrita.

A quantidade teórica de VitD2 adicionada por g de pão (**Tabela 5**) para o sistema PVP-VitD2-15 foi de 0,0168 mg de VitD2/g de pão. A determinação cromatográfica forneceu o valor de 0,0136 mg de VitD2/g de pão. Assim, estes resultados preliminares são um

indicativo do sucesso da incorporação e estabilização da VitD2 para incorporação em farinhas. A metodologia proposta permite melhorar a dispersão da VitD2 na farinha tendo-se verificado que não há degradação significativa do seu conteúdo durante o processo de fabrico e cozedura do pão. Adicionalmente foram testadas diferentes concentrações de VitD2 nas formulações das dispersões sólidas visando obter soluções mais favoráveis para a incorporação do extrato enriquecido em VitD2 (trabalho em curso).

Tabela 5. Quantidade teórica e quantificação cromatográfica da vitamina D2 após o fabrico do pão.

VitD2 (%) Formulação DS	Quantidade em g de DS/g de pão	Quantidade em mg de VitD2/g de pão	Quantificação cromatográfica (mg vitD2/g de pão)
Sistema PVP			
2.5	0,0036	0,0151	0,0135
5	0,0019	0,0151	0,0114
10	0,00099	0,0153	0,0118
15	0,00060	0,0168	0,0136
Sistema KC			
2.5	0,0038	0,0145	0,0130
5	0,0019	0,0155	0,0117
10	0,00079	0,0148	0,0101
15	0,00061	0,0036	0,0035

Referências

- [1] V.F. Leimann, O.H. Gonçalves, G.D. Sorita, S. Rezende, E. Bona, I.P.M. Fernandes, I.C.F.R. Ferreira, M.F. Barreiro. Heat and pH stable curcumin-based hydrophilic colorants obtained by the solid dispersion technology assisted by spray-drying. *Chemical Engineering Science* 205 (2019) 248–258. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.04.044>.
- [2] A.C. Da Silva, P.D. de F. Santos, N.C. Palazzi, V.F. Leimann, R.H.B. Fuchs, L. Bracht, O.H. Gonçalves. Production and characterization of curcumin microcrystals and evaluation of the antimicrobial and sensory aspects in minimally processed carrots. *Food and Function* 8 (2017) 1851-1858. DOI: 10.1039/c7fo00452d.
- [3] M.E. Cam, B. Ertas, H. Alenezi, A.N. Hazar-Yavuz, S. Cesur, G.S. Ozcan, C. Ekentok, E. Guler, C. Katsakouli, Z. Demirbas, D. Akakin, M.S. Eroglu, L. Kabasakal, O. Gunduz, M. Edirisinghe. Accelerated diabetic wound healing by topical application of

combination oral antidiabetic agents-loaded nanofibrous scaffolds: An in vitro and in vivo evaluation study. *Materials Science & Engineering C* 119 (2021) 111586. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111586>

[4] V. Pascalău, V. Popescu, G.L. Popescu, M.C. Dudescu, G. Borodi, A. Dinescu, I. Perhaita, M. Paul. The alginate/k-carrageenan ratio's influence on the properties of the cross-linked composite films. *Journal of Alloys and Compounds* 536S (2012) S418–S423. doi:10.1016/j.jallcom.2011.12.026.

[5] N. Jannasari, M. Fathi, S.J. Moshtaghian, A. Abbaspourrad. Microencapsulation of vitamin D using gelatin and cress seed mucilage: Production, characterization and in vivo study. *International Journal of Biological Macromolecules* 129 (2019) 972–979. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.096>.

[6] Lamsen, M.R.L., Wang, T., D'Souza, D., Dia, V., Chen, G. & Zhong, Q. Encapsulation of vitamin D3 in gum arabic to enhance bioavailability and stability for beverage applications. *Journal of Food Science*, 85 (2020) 2368–2379. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15340>

[7] Barreira, J. C. M., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. Development of a Novel Methodology for the Analysis of Ergosterol in Mushrooms. *Food Analytical Methods*, 7 (2014) 217–223. doi: 10.1007/s12161-013-9621-9