

ENCAPSULAÇÃO DE VITAMINA B₂ EM NANOESTRUTURAS DE α -LACTOALBUMINA

R. L. CARVALHO¹, L. G. FONSECA¹, J. S. R. COIMBRA², A. B. MAGESTE³, I. J. B. SANTOS¹

¹ Universidade Federal de São João del Rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos

² Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia em Alimentos

³ Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Química

E-mail para contato: igorboggione@ufsj.edu.br

RESUMO – A nanotecnologia é uma área da ciência eficaz em potencializar o uso de nanoestruturas em diversas áreas, entre elas a indústria de alimentos, proporcionando novos produtos com propriedades diferenciadas. Assim, o trabalho tem como objetivo encapsular vitamina B₂ em nanoestruturas de α -lactoalbumina e analisar a estabilidade dessas nanoestruturas durante 120 dias. A nanoestrutura obtida em 10 mM de NaCl a 45 °C por 2 h apresentou um tamanho de 216 nm. A nanoestrutura obteve uma eficiência de encapsulação de vitamina B₂ maior que 45 %. Dessa forma, os resultados encontrados confirmam o grande potencial de aplicação dessas nanoestruturas na indústria de alimentos.

1. INTRODUÇÃO

O estado de Minas Gerais abriga grande parte dos laticínios do território brasileiro e como um dos principais produtos desse setor está a produção de queijo. Esta operação gera como subproduto um volume muito grande de soro de leite, sendo 15% deste destinado à fabricação de bebidas lácteas e a outra parte é destinada ao descarte, portanto ao ser descartado ao meio ambiente sem tratamento específico, pode gerar problemas de poluição ambiental como a eutrofização (Pedersen *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2014). Consequentemente, o aproveitamento do soro do leite é de grande importância, pois, além de ser uma medida de controle ambiental, pode também ser utilizado para agregar valor de produtos no setor alimentício, visto que, possuem propriedades nutricionais e funcionais variadas (Alahdad *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2010).

As proteínas representam 0,9% em média da composição do soro do leite, destacando-se a α -lactoalbumina (α -la) com 13% da composição dessas proteínas (Antunes, 2003; Ben-Hassan e Ghaly, 1994). Esse tipo de proteína é apropriada para preparar diversos alimentos devido suas propriedades nutricionais e técnico-funcionais. A α -lactoalbumina também é estratégica para obtenção de nanoestruturas que podem ser usadas para a encapsulação de nutracêuticos, como vitamina B₂, e proporcionar, desta forma, novas características ao sistema alimentício (Livney, 2010). A aplicação dessa proteína para a formação de nanoestruturas é classificada como segura pelo GRAS (Generally Recognized as Safe), não causando danos à saúde e nem ao meio ambiente (Abd El-Salam e El-Shibiny, 2012; Benshitrit, 2012).

O interesse da encapsulação de bioativos em nanoestruturas proteicas está relacionado com a capacidade de agregar os valores nutricionais e farmacológicos destas substâncias, definindo-se, então, os alimentos nutraceuticos. Estes definem uma classe de componentes alimentícios que são essenciais para atender as necessidades do corpo humano de minerais e vitaminas, como também proporcionar a defesa do sistema imunológico contra o ataque de doenças infecciosas (Moraes e Colla, 2006). A vitamina B₂ (riboflavina) é um tipo de nutraceutico multifuncional, na qual apresenta propriedades na prevenção do câncer (Souza *et al.*, 2005).

Por este motivo, a encapsulação dos bioativos tem-se mostrado eficiente na proteção dessas moléculas durante o processamento do alimento e da liberação controlada do mesmo na região do organismo de melhor absorção dos seus nutrientes (Augustin e Sanguansri, 2007; F. Gibbs *et al.*, 1999). Desta maneira, este trabalho objetiva obter nanoestruturas de α -lactoalbumina, encapsular a vitamina B₂ e analisar a estabilidade das nanoestruturas em 120 dias.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

A α -lactoalbumina (contendo 90% de α -lactoalbumina) foi gentilmente cedida pela Davisco Foods International (EUA). A vitamina B₂ (98% de riboflavina) foi adquirida da Aldrich-Sigma (USA). O NaCl foi adquirido da Êxodo Científico (Brasil), e o HCl da Synth (Brasil).

2.1. Métodos

Obtenção e caracterização de nanoestruturas de α -lactoalbumina: As nanoestruturas foram obtidas de acordo com a metodologia de De Kruif (2012) com modificações, onde, soluções de proteína a 2 mg.mL⁻¹ em água destilada, em pH 2 (HCl) e em 10 mM de NaCl foram mantidas a 45°C sob agitação por duas horas em uma estufa incubadora (Nova Técnica, Brasil). A dispersão de nanoestrutura foi armazenada a -16°C para posteriores análises. O tamanho e o índice de polidispersividade (PdI) foram obtidos através do espalhamento dinâmico de luz - DLS (NanoZetaSizer, Malven, Japão).

Encapsulação de vitamina B₂: Uma solução estoque de vitamina B₂ na concentração de 0,3 mg.mL⁻¹ foi preparada em água destilada. Então, em microtubos foram adicionados a solução estoque de vitamina B₂, água destilada e a dispersão de nanoestrutura em acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Preparação de diferentes concentrações de vitamina B₂ em nanopartículas para determinar a eficiência de encapsulação EE%

[V] na dispersão de NPs em µg.mL ⁻¹	Solução estoque V (0,3 mg.mL ⁻¹) em µL	Dispersão de NPs em µL	Solvente (água destilada) em µL
0,015	75	1000	425
0,030	150	1000	350
0,060	300	1000	200
0,075	375	1000	125
0,090	450	1000	50

As amostras foram agitadas manualmente por 5 min e centrifugadas por 30 min, 20°C em 13500 rpm (Eppendorf, Alemanha). Após esse processo, os sobrenadantes foram diluídos e analisados em espectrofotômetro UV-VIS (Biospectro, Brasil) em 445 nm e o pellet foi seco em estufa a 50°C. A eficiência de encapsulação (EE%) e a capacidade de ligação (LC) foram obtidos pelas Equações 1 e 2.

$$EE(\%) = (W_{\text{total}} - W_{\text{livre}}) \times \frac{100}{W_{\text{total}}} \quad (1)$$

Onde EE (%) é a eficiência de encapsulação, W_{total} é o total de vitamina B₂ adicionado nas NPs e W_{livre} é o total de vitamina B₂ livre encontrado no sobrenadante.

$$LC(\%) = (W_{\text{total}} - W_{\text{livre}}) \times \frac{100}{W_{\text{np}}} \quad (2)$$

Onde o LC (%) corresponde à capacidade de ligação, W_{total} é o total de vitamina B₂ adicionada na nanoestrutura, W_{livre} é o total de vitamina B₂ livre encontrado no sobrenadante e W_{np} é o valor da vitamina B₂ ligada na nanoestrutura.

Teste da estabilidade das nanoestruturas: Foi preparada a solução de nanoestruturas de α-lactoalbumina obtida a 2 mg.mL⁻¹. A mistura foi levada à incubadora shaker refrigerada (Nova Técnica, Brasil) por 2 h a 50°C e 180 rpm. Uma amostra foi coletada no dia do preparo e levada ao congelador, o restante da solução foi mantida em geladeira (4°C) e após 1, 3, 6, 7, 15, 30, 120 dias coletou-se alíquotas de mesma quantidade e armazenadas em congelador. As amostras foram analisadas no DLS (NanoZetaSizer, Malvern, Japão).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A nanoestrutura de α-lactoalbumina foi constatada pelo espalhamento dinâmico de luz (DLS), apresentando um tamanho de 216 nm por meio de um prévio tratamento térmico da proteína na presença de NaCl (10 mM). Com as nanoestruturas α-lactoalbumina obtidas foi avaliada a eficiência de encapsulação e a capacidade de ligação entre as nanoestruturas e a vitamina B₂. Os valores encontrados nessa análise estão apresentados na Tabela 2.

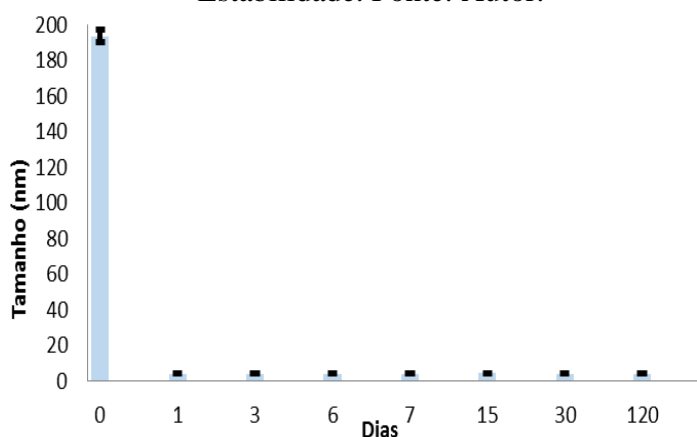
Tabela 2 – Resultados obtidos da eficiência de encapsulação da vitamina B₂ na nanoestrutura formada pela proteína α -lactoalbumina e da sua capacidade de ligação

[B ₂] na dispersão de NPs em (mg.mL ⁻¹)	Eficiência de encapsulação (%)	Capacidade de ligação (%)
0,015	13,86 \pm 3,60	0,0006 \pm 0,0002
0,030	25,01 \pm 3,84	0,0022 \pm 0,0007
0,060	22,91 \pm 3,80	0,0049 \pm 0,0008
0,075	39,33 \pm 1,09	0,0048 \pm 0,0010
0,090	45,20 \pm 0,92	0,0168 \pm 0,0047

A solução de vitamina B₂ na concentração 0,090 mg.mL⁻¹ na dispersão de nanopartículas, mostrou uma melhor eficiência de encapsulação de 45 \pm 0,92% comparando-se com as demais. Couto *et al.* (2016) encontrou uma eficiência de encapsulação de 12 \pm 0,03% no estudo de encapsulação de vitamina B₂ em nanopartículas lipídicas sólidas com CO₂ supercrítico e ele também verificou que a eficiência da encapsulação da vitamina B₂ é proporcional a quantidade da substância presente no meio, assim, como observado na Tabela 2. Azevedo *et al.* (2014) apontou uma eficiência de 55,9 \pm 5,6% para a encapsulação de vitamina B₂ em nanoestruturas de alginato/quitosano. Analisando esses dados da literatura, pode-se perceber que valores distintos foram encontrados para a eficiência de encapsulação da vitamina. Isso pode ser justificado pela característica que cada composto encapsulante apresenta com relação as suas hidrofobicidades.

Outro teste realizado foi o de estabilidade, onde foi possível analisar o comportamento das nanopartículas durante um intervalo de tempo de 120 dias. Os valores encontrados para o tamanho das nanoestruturas durante esse tempo são mostrados no gráfico da Figura 1.

Figura 1 – Comportamento do tamanho das nanoestruturas durante 120 dias – Teste Estabilidade. Fonte: Autor.



A nanoestrutura de α -lactoalbumina não foi estável, uma vez que no primeiro dia diminuiu de tamanho. O estudo de Graveland-Bikker (2005) mostrou estabilidade das nanoestruturas de α -lactoalbumina em outras condições ambientais. O autor sugere a utilização da enzima (transglutaminase) para manter a estabilidade dessas nanoestruturas, pois ela pode ser capaz de fazer ligações covalentes entre as proteínas e os peptídeos. Portanto, maiores estudos deverão ser realizados, a fim de estabilizar essa nanoestrutura.

4. CONCLUSÃO

Nanoestrutura de α -lactalbumina foi obtida na presença de 10 mM de NaCl sob tratamento térmico e agitação controlados. Essa nanoestrutura mostrou-se eficiente na encapsulação da vitamina B₂, apresentando mais de 45% de eficiência. Observou-se com o teste de estabilidade que a nanoestrutura de α -lactalbumina apresentou instabilidade num período de 120 dias. Os resultados encontrados são aceitáveis para possíveis aplicações na indústria de alimentos, visto que moléculas bioativas encapsuladas em nanoestrutura de α -lactalbumina agregam maior valor nutricional e funcional ao produto.

5. REFERÊNCIAS

- ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S., Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: A review. *International Journal of Dairy Technology*. Dairy Department, National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt, v. 65, n. 1, 2012.
- ALAHADAD, Z.; RAMEZANI, R.; AMINLARI, M., Preparation and properties of dextran sulfate-lysozyme conjugate. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, Shiraz, Iran, v.57, 6449-6454, 2009.
- ANTUNES, A. J., Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino. Editora Manole Ltda, 2003.
- AUGUSTIN, M. A.; SANGUANSRI, L., Encapsulation of bioactive. *Food Material Science*, Verlag, S., Ed. New York, p. 577-601, 2007.
- AZEVEDO, M. A.; BOURBON, A. I.; VICENTE, A. A.; CERQUEIRA, M. A., Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B₂. *International journal of biological macromolecules*, Braga, Portugal, v. 71, 141-146, 2014.
- BEN-HASSAN, R. M.; GHALY, A. E., Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Halifax, Nova Scotia, Canadá, 47, 89-104, 1994.
- BENSHITRIT, R. C.; LEVI, C. S.; TAL, S. L.; SHIMONI, E.; LESMES, U., Development of oral food-grade delivery systems: Current knowledge and future challenges. *Food & Function*, Haifa, Israel v.3, n.1, 10-21, 2012.
- COSTA, C. M.; et., al. Soro do leite e os danos causados ao meio ambiente. *X Encontro Brasileiro sobre adsorção*, 2014 Guarujá – SP, 2014. Disponível em: <<https://www2.cead.ufv.br/sgal/files/apoio/saibaMais/saibaMais2.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2016.
- COUTO, R.; ALVAREZ, V.; TEMELLI, F. Encapsulation of Vitamin B2 in Solid Lipid Nanoparticles Using Supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, Edmonton, Alberta, Canada, 2016.

- DE KRUIF, C. G., Milk nanotubes: technology and potential applications. *Nanotechnology in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries*, Huang, Q., Ed. Woodhead Publishing, p 398-412, 2012.
- F. GIBBS, SELIM KERMASHA, INTEAZ ALLI, CATHERINE N. MULLIGAN, Bernard. Encapsulation in the food industry: a review. *International journal of food sciences and nutrition*, Quebec, Canadá, v. 50, n. 3, p. 213-224, 1999.
- GRAVELAND-BIKKER, J. F. Self-assembly of hydrolysed α -lactalbumin into nanotubes. Utrecht University, Utrecht, Reino dos Países Baixos, 2005.
- LIVNEY, Y. D., Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Haifa, Israel 15 (1-2), 73-83, 2010.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.
- PEDERSEN, L.; MOLLERUP, J.; HANSEN, E.; JUNGBAUER, A., Whey Proteins as a Model System for Chromatographic Separation of Proteins. *Journal of Chromatography*, Lyngby, Denmark, 790 (1), 161-173, 2003.
- ROJAS, E. E. G.; DOS REIS COIMBRA, J. S.; MINIM, L. A.; ZUNIGA, A. D. G.; SARAIVA, S. H.; MINIM, V. P. R., Size-exclusion chromatography applied to the purification of whey proteins from the polymeric and saline phases of aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, Viçosa, 39 (11), 1751-1759, 2004.
- SOUZA, A. C. S. D., FERREIRA, C. V., JUCÁ, M. B., AOYAMA, H., CAVAGIS, A. D. M., & PEPPELENBOSCH, M. P. Riboflavin: a multifunctional vitamin. *Química Nova*, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 887-891, 2005.
- YADAV, M. P.; PARRIS, N.; JOHNSTON, D. B.; ONWULATA, C. I.; HICKS, K. B., Corn fiber gum and milk protein conjugate with improved emulsion stability. *Carbohydrate Polymers*, Wyndmoor, EUA 81, 476-483, 2010.