

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

TATIELLY DE JESUS COSTA

**Microencapsulação de vitamina D₃ (Colecalciferol) em
biomassa de levedura cervejeira (*Saccharomyces pastorianus*)**

Pirassununga

2023

TATIELLY DE JESUS COSTA

**Microencapsulação de vitamina D₃ (Colecalciferol) em
biomassa de levedura cervejeira (*Saccharomyces pastorianus*)**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dra. Carmen Sílvia Fávaro-Trindade

Pirassununga

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C837m Costa, Tatielly de Jesus
Microencapsulação de vitamina D3 (Colecalciferol)
em biomassa de levedura cervejeira (*Saccharomyces
pastorianus*) / Tatielly de Jesus Costa ;
orientadora Carmen Sílvia Fávares Trindade. --
Pirassununga, 2023.
76 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade
de São Paulo.

1. Spray-drying. 2. Resíduo cervejeiro . 3.
Adsorção. 4. Estabilidade. I. Fávares Trindade,
Carmen Sílvia , orient. II. Título.

A minha mãe Doralice (in memoriam),

Dedico.

Agradecimentos

Primeiramente A Deus, por todas as bênçãos concedidas, por nunca me desamparar nos momentos de angústia, por Ele colocar pessoas tão maravilhosas ao longo da minha caminhada.

Ao meu pai Francisco pelos ensinamentos, cuidados e todo apoio que sempre me proporcionou.

A minha mãe Doralice (*in memoriam*) que não se faz presente fisicamente, mas é o meu motivo para prosseguir diariamente, tenho certeza que continua olhando por mim e torcendo por minhas conquistas.

A minha “irmã” Fátima por mesmo de longe se fazer presente, pelo incentivo, conselhos e risadas.

Ao meu noivo Uebert, pelo cuidado, motivação, paciência e apoio incondicional em todas as minhas decisões.

A minha orientadora Carmen, por ter aceito me orientar mesmo sem nos conhecermos, por transmitir conhecimento de forma tão leve e inspiradora, agradeço toda disponibilidade, preocupação e incentivo a pesquisa.

Ao técnico de laboratório Marcelo, pelo valioso suporte durante os experimentos, pela paciência, disponibilidade e ensinamentos compartilhados.

Aos amigos de jornada, Julia, Beatriz, Letícia, Jéssica, pela troca de experiências, risadas e momentos de descontração. De modo geral, a todos do laboratório LENALIS, onde, fui muito bem acolhida.

Ao apoio financeiro oferecido pelas agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Código de Financiamento 001) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2021/12730-0), que foi fundamental para desenvolvimento dessa pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos!

*Vivemos em uma sociedade extremamente dependente da ciência e da tecnologia, na qual
quase ninguém sabe nada sobre ciência e tecnologia.*

(Carl Sagan)

RESUMO

COSTA, T. J. **Microencapsulação de vitamina D₃ (Colecalciferol) em biomassa de levedura cervejeira (*Saccharomyces pastorianus*)**. 2023. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

O papel da vitamina D₃ (colecalfiferol) é crucial para manutenção da boa saúde humana, uma vez que está diretamente ligado ao metabolismo do cálcio e fosfato no organismo, além de atuar em numerosas funções do sistema imunológico e nervoso. Apesar de possuir fundamental importância, sua deficiência vem se tornando um problema de saúde global. Devido à hábitos (uso do protetor solar, roupas longas e reclusão) ou à região geográfica, a exposição solar, principal forma de obtenção da vitamina D₃, é prejudicada, tornando sua suplementação necessária. No entanto, a alta sensibilidade da vitamina D₃ a fatores ambientais dificulta sua aplicação direta na fortificação de alimentos. Uma estratégia para superar essas limitações é a utilização de uma matriz para proteger o colecalfiferol. A levedura residual cervejeira surge como uma opção economicamente viável, pois sua morfologia de cápsula pré-formada atende tecnologicamente os requisitos de envolver, armazenar, e proteger, sendo empregada na proteção de nutrientes e moléculas bioativas. Este trabalho teve como objetivo carregar a vitamina D₃ em células de levedura cervejeira residual (*Saccharomyces pastorianus*) por meio da técnica de biossorção, bem como avaliar os efeitos do pré-tratamento das células por meio do processo de plasmólise, com o intuito de promover uma maior impregnação. Para tanto, a biomassa foi dividida em duas porções: uma não submetida a tratamento, denominada levedura intacta (TLI), e outra submetida à plasmólise (TLP). Ambos os tratamentos passaram por caracterização e análise de composição centesimal. O estudo incluiu a análise da cinética de biossorção, visando obter um modelo cinético que melhor descrevesse o experimento. A concentração de vitamina utilizada na biossorção foi de 80 µg/mL, utilizando-se 70 mg de biomassa de levedura. Após a incorporação da vitamina na biomassa, o material foi seco em *spray dryer*. As micropartículas obtidas após secagem, foram caracterizadas quanto aspectos físico-químicos, morfológicos, por FT-IR e estabilidade da vitamina ao longo do armazenamento. O processo de biossorção foi melhor descrito pelo modelo de pseudo-segunda ordem. O uso da plasmólise como pré-tratamento na biomassa de levedura proporcionou uma melhora significativa na eficiência de encapsulamento e na capacidade de sorção da vitamina D₃. As análises morfológicas constataram alterações estruturais em decorrência da plasmólise. A técnica de biossorção da vitamina D₃ em células de levedura plasmolisadas, seguida pela secagem via *spray-drying* propiciou proteção efetiva e uma boa retenção da vitamina D₃ ao longo de um período de 60 dias de armazenamento.

Palavras-chave: *Spray-drying*; adsorção; resíduo cervejeiro; estabilidade.

ABSTRACT

COSTA, T. J. **Microencapsulation of vitamin D₃ (Colecalciferol) in Brewer's Yeast Biomass (*Saccharomyces pastorianus*)**. 2023. 76 p. Dissertation (Master's) - Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2023.

The role of vitamin D₃ (cholecalciferol) is crucial for maintaining good human health, as it is directly linked to the metabolism of calcium and phosphate in the body, as well as numerous functions in the immune and nervous systems. Despite its fundamental importance, vitamin D₃ deficiency has become a global health problem. Due to habits (such as sunscreen use, clothing, and reclusion) or geographical location, solar exposure, the main source of vitamin D₃, is compromised, necessitating its supplementation. However, the high sensitivity of vitamin D₃ to environmental factors hinders its direct application for food fortification. One strategy to overcome these limitations is the use of a matrix to protect the cholecalciferol. Brewer's spent yeast emerges as an economically viable option, as its pre-formed capsule morphology meets the technological requirements of encapsulation, storage, and protection, being employed in the protection of nutrients and bioactive molecules. This study aimed to impregnate vitamin D₃ in residual brewer's yeast cells (*Saccharomyces pastorianus*) using the biosorption technique, as well as to evaluate the effects of cell pre-treatment through the plasmolysis process to promote greater impregnation. For this purpose, the biomass was divided into two portions: one not subjected to any treatment, called intact yeast (TLI), and another subjected to plasmolysis (TLP). Both treatments underwent characterization and centesimal composition analysis. The study included the analysis of biosorption kinetics to obtain the kinetic model that best described the experiment. The concentration of vitamin used in biosorption was 80 µg/mL, using 70 mg of yeast biomass. After the incorporation of vitamin into the biomass, the material was dried using a spray dryer. The resulting microparticles from drying were characterized in terms of physicochemical and morphological aspects, FT-IR spectroscopy, and stability over the storage period. The biosorption process was best described by the pseudo-second-order model. The use of plasmolysis as a pre-treatment in yeast biomass significantly improved the encapsulation efficiency and sorption capacity of vitamin D₃. Morphological analyses confirmed the structural alterations resulting from plasmolysis. The biosorption technique of vitamin D₃ in plasmolyzed yeast cells, followed by spray-drying, provided effective protection and good retention of vitamin D₃ over a 60-day storage period.

Keywords: Spray-drying; adsorption; brewer's yeast residual; stability.

Lista de Figuras

Figura 1. Linha do tempo com as principais descobertas relacionadas a vitamina D.	17
Figura 2. Estrutura molecular do Ergocalciferol (vitamina D ₂) e Colecalciferol (vitamina D ₃)	18
Figura 3. Síntese resumida da vitamina D.....	19
Figura 4. Indicadores de suficiência de vitamina D para diferentes concentrações séricas de 25(OH)D no organismo humano.	22
Figura 5. Diferenças morfológicas entre microcápsulas e microesferas.....	27
Figura 6. Pré-tratamentos utilizados para melhorar a permeabilidade celular.....	32
Figura 7. Aparência da biomassa durante a etapa de lavagem.....	35
Figura 8. Dados experimentais e ajustes aos modelos cinéticos pseudo–primeira ordem (esquerda) e pseudo–segunda ordem (direita) da bio sorção de vitamina D ₃ em células de leveduras intactas (TLI) e plasmolisadas (TLP).	47
Figura 9. Capacidade de sorção obtida experimentalmente durante a bio sorção de vitamina D ₃ por células de levedura: (A) intactas e (B) plasmolisadas.....	48
Figura 10. Espectros de FT-IR das células de levedura controle: intactas (CTLI) e plasmolisadas (CTLP).	54
Figura 11. Espectros de FT-IR, de colecalciferol (D ₃), células plasmolisadas carregadas de colecalciferol (TLP), células intactas carregadas de colecalciferol (TLI), células plasmolisadas não carregadas (CTLP) e células intactas não carregadas (CTLI).	56
Figura 12. Microscopia ótica (100x) das células de <i>S. pastorianus</i> intactas (A), plasmolisadas (B), intactas carregadas de colecalciferol (C), plasmolisadas carregadas de colecalciferol (D).....	57
Figura 13. Micrografia eletrônica de varredura das células intactas (A), plasmolisadas (B), intactas carregadas de colecalciferol (C), plasmolisadas carregadas de colecalciferol (D).....	58
Figura 14. Imagens do microscópio confocal de varredura a laser da <i>S. pastorianus</i> : células intactas (A), células plasmolisadas (B), células intactas carregadas de colecalciferol (C), células plasmolisadas carregadas de colecalciferol (D). Na primeira coluna há micrografias nas quais as manifestações das cores induzidas pelos	

corantes calcofluor e vermelho Nilo são visíveis em um background que não evidencia um corante específico; na coluna central há um contraste que enfatiza o tom azul característico do corante calcofluor; na coluna a direita, a predominância da cor vermelha típica do corante vermelho Nilo é evidenciada.60

Figura 15. Estabilidade da vitamina D₃ impregnada em células de leveduras intactas (TLI) e plasmolisadas (TLP) armazenadas por 60 dias, expressa em mg de vitamina por grama de levedura e em % de retenção.63

Lista de Tabelas

Tabela 1. Diretrizes para ingestão de doses profiláticas de vitamina D.....	22
Tabela 2. Fatores de risco para deficiência de vitamina D	24
Tabela 3. Estudos relatando uso da levedura como bioissorvente, bioveículo ou transportador.....	31
Tabela 4. Composição centesimal da biomassa de levedura <i>S. pastorianus</i> (em base seca).	44
Tabela 5. Parâmetros cinéticos de adsorção de vitamina D ₃ em células de levedura nos modelos pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem.	46
Tabela 6. Eficiência (EE) e retenção de vitamina D ₃ nas células de levedura intactas e plasmolisadas.....	49
Tabela 7. Umidade, atividade de água e potencial ζ das partículas obtidas via spray-drying.	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	16
2.1 VITAMINA D.....	16
2.1.1 Aspectos históricos.....	16
2.1.2 Fisiologia	17
2.1.3 Funções no organismo	19
2.1.4 Diretrizes Nutricionais.....	20
2.1.5 Hipovitaminose D.....	23
2.2 FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS.....	25
2.3 MICROENCAPSULAÇÃO	26
2.4 BIOSSORÇÃO	28
2.5 LEVEDURAS COMO BIOSSORVENTE	29
2.5.1 Pré-tratamentos celulares.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 MATERIAIS	34
3.2 PREPARO DA BIOMASSA	34
3.3 PRÉ-TRATAMENTO.....	35
3.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA LEVEDURA.....	36
3.5 QUANTIFICAÇÃO DA VITAMINA D ₃	36
3.6 BIOSSORÇÃO	37
3.6.1 Cinética de biossorção.....	37
3.6.2 Ajuste do modelo cinético.....	38
3.7 BIOSSORÇÃO	38
3.7.1 Preparo das micropartículas	38
3.7.2 Secagem	39
3.7.3 Extração e retenção da vitamina nas micropartículas	39
3.8 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	40
3.8.1 Atividade de água.....	40
3.8.2 Teor de umidade.....	40
3.8.3 Morfologia das partículas.....	41
3.8.4 Microscopia confocal de varredura a laser.....	41
3.8.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).....	41
3.8.6 Potencial Zeta.....	42

3.9	ESTUDO DA ESTABILIDADE DA VITAMINA D_3 IMPREGNADA NAS CÉLULAS DE LEVEDURAS.....	42
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA BIOMASSA DE LEVEDURA.....	44
4.2	CINÉTICA DE BIODSORÇÃO	45
4.3	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E RETENÇÃO.....	49
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS DE LEVEDURAS QUANTO A UMIDADE, A_w E POTENCIAL ZETA (ζ).....	51
4.5	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)	53
4.6	MORFOLOGIA DAS MICROPARTÍCULAS.....	56
4.6.1	Microscopia confocal	59
4.7	ESTABILIDADE DA VITAMINA D_3 IMPREGNADA	62
5	CONCLUSÕES.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

A vitamina D é um micronutriente indispensável para boa saúde humana; sua importância para a homeostase do cálcio-fósforo e dos ossos é indiscutível (MATSUI, 2020). No entanto, nas últimas duas décadas, a vitamina D ganhou destaque, sendo reconhecida não apenas como a vitamina responsável pela saúde óssea, mas também por suas múltiplas funções no organismo (MUSCOGIURI, 2020).

Diversas pesquisas reportam o possível papel da vitamina D na prevenção de alguns tipos de cânceres (HENN *et al.*, 2022; SERAPHIN *et al.*, 2023), hipertensão (LIN *et al.*, 2019), diabetes tipo 2 (ZHANG *et al.*, 2020), doenças cardíacas (ZARZOUR *et al.*, 2023), imunológicas (BISHOP *et al.*, 2021), respiratórias (GAUDET *et al.*, 2022) e neurodegenerativas (MICLEA *et al.*, 2020). Baixos níveis de vitamina D também foram associados como um provável fator de risco para o desenvolvimento da forma grave da infecção causada pelo vírus SARS-CoV-2 (causador da COVID 19) (PAL *et al.*, 2022; BASIŃSKA-LEWANDOWSKA *et al.*, 2023).

A vitamina D é composta por um grupo de moléculas denominadas calciferóis. Nos alimentos, as suas formas predominantes são o ergocalciferol (vitamina D₂) e o colecalciferol (vitamina D₃). No entanto, a vitamina D₃ é única porque pode tanto ser sintetizada na pele, quanto ser absorvida por meio da dieta (BENDIK *et al.*, 2014; DADKHODAZADE *et al.*, 2018).

O colecalciferol é produzido majoritariamente a partir da provitamina D na pele humana, por exposição à luz ultravioleta (UV) (BENDIK *et al.*, 2014). Embora a luz solar seja uma fonte substancial de vitamina D₃, a deficiência dessa vitamina já é caracterizada como uma pandemia; fatores como estilo de vida, hábitos culturais e/ou região geográfica ocasionam uma exposição solar insuficiente, aliado ao fato de que poucas fontes alimentícias possuem esse micronutriente, culminando em uma alta prevalência de hipovitaminose D (PALACIOS, GONZALEZ, 2015; MCCOURT, O'SULLIVAN, 2022).

A fortificação de alimentos tem sido uma estratégia muito usada para aumentar a ingestão da vitamina D, principalmente, por países cuja incidência solar é reduzida (LUO *et al.*, 2012). Esse processo, todavia, vem sendo um desafio para indústria alimentícia em virtude de a vitamina D₃ possuir alta instabilidade, além de apresentar dificuldade de incorporação em determinadas matrizes alimentares, devido à sua

natureza lipofílica; além disso, a vitamina D₃ é suscetível à oxidação por luz, calor e oxigênio, o que pode afetar negativamente sua estrutura química, logo seus benefícios fisiológicos (PAUCAR *et al.*, 2016; DADKHODAZADE *et al.*, 2018).

A técnica de encapsulamento é uma opção viável para preservar as propriedades nutricionais de compostos sensíveis, como vitaminas, aromas e corantes (MADENE *et al.* 2006; SALARI *et al.*, 2015). Essa tecnologia propicia uma blindagem do composto de interesse em partículas, conferindo proteção e também facilitando sua liberação controlada. A encapsulação também pode proporcionar um sistema de entrega que resulta em maior biodisponibilidade da substância de interesse, maior dispersibilidade em água e pode facilitar a mistura ou homogeneidade do composto fortificante no alimento alvo, independentemente da complexidade da matriz alimentar (GUPTA *et al.*, 2019; MAURYA, AGGARWAL, 2019).

Dentre uma diversidade de revestimentos encapsulante, as células de levedura estão ganhando cada vez mais destaque como ótima opção de microveículo de substâncias bioativas e micronutrientes (DADKHODAZADE *et al.*, 2018). A utilização de leveduras como agente transportador tem se tornado uma alternativa economicamente atrativa, pois satisfaz tecnologicamente os requisitos de envolver, incorporar, armazenar, proteger e liberar, podendo ser empregada na proteção de nutrientes, moléculas bioativas, bem como de aditivos de interesse das mais diversas indústrias (FERREIRA *et al.*, 2010; PHAM-HOANG *et al.*, 2013; PARAMERA, KARATHANOS, KONTELES, 2014; JACH *et al.*, 2015; JACH, SEREFKO, 2018).

O gênero *Saccharomyces* engloba o grupo das espécies de leveduras com mais aplicações tecnológicas, principalmente, em processos fermentativos para produção de pães, vinho e cerveja (JACH, SEREFKO, 2018). Após o uso da levedura na fermentação, em particular na indústria de bebidas, obtém-se uma grande quantidade de biomassa de células de leveduras; sua aplicação na encapsulação seria uma forma de agregar valor a esse subproduto, uma vez que a viabilidade da levedura não é crucial para o encapsulamento (JACH *et al.*, 2015; CORADELLO, TIRELLI, 2021; DADKHODAZADE *et al.*, 2018).

O uso da levedura como bioveículo para encapsulação de vitaminas, especialmente no que se refere à vitamina D₃, é pouco documentado na literatura. Apenas um estudo foi encontrado, no qual os autores utilizaram a espécie *Saccharomyces cerevisiae* para encapsular essa vitamina (DADKHODAZADE *et al.*, 2018). Essa limitação evidencia a necessidade de uma maior investigação nessa área

de estudo, bem como a exploração de outras espécies de leveduras, como a *Saccharomyces pastorianus*, que é amplamente utilizada na indústria cervejeira, mas com poucos estudos explorando seu potencial na encapsulação de bioativos.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo encapsular a vitamina D₃ em células de levedura cervejeira residual (*Saccharomyces pastorianus*) por meio da técnica de biossorção, bem como avaliar os efeitos do pré-tratamento das células por meio do processo de plasmólise, com o intuito de promover uma maior impregnação.

O presente trabalho está estruturado em cinco partes. A segunda parte aborda uma revisão de literatura sobre alguns dos principais aspectos da vitamina D para a saúde humana. Também são apresentadas vantagens da aplicação da técnica de microencapsulação na proteção de nutrientes e bioativos, assim como a utilização da levedura como material biossorvente e/ou transportador. A metodologia empregada é descrita na terceira parte do trabalho. Os resultados obtidos com aplicação da metodologia são apresentados e discutidos na parte quatro. Por fim, são oferecidos os comentários finais e sugestões para pesquisas futuras.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 Vitamina D

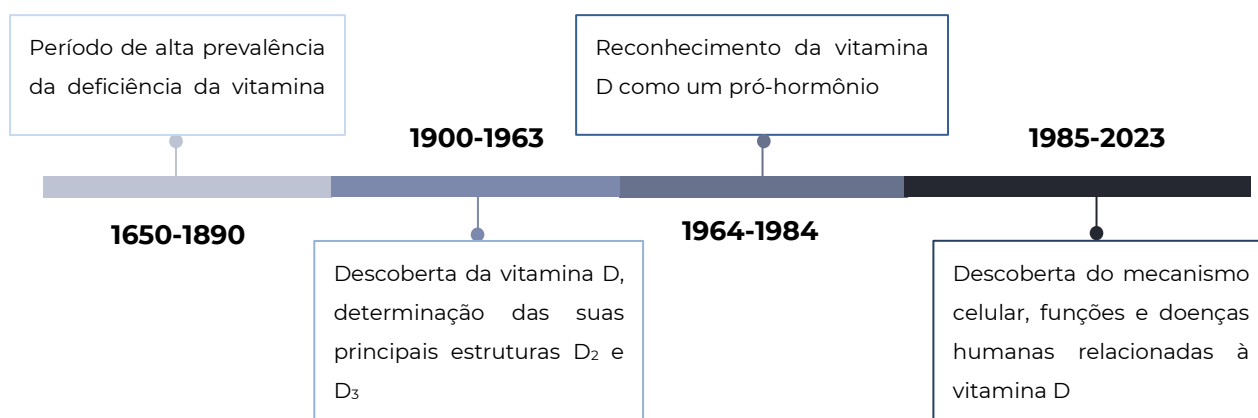
2.1.1 Aspectos históricos

A história da vitamina D data de desde os primórdios da evolução da vida como uma molécula produzida por meio de uma reação fotoquímica. Embora não haja um consenso sobre quando começou a ser produzida e qual era sua função, estudos sugerem que o fitoplâncton foi um dos primeiros organismos a fotossintetizar a vitamina D (HERNIGOU *et al.*, 2018; HERNIGOU *et al.*, 2019). Conseqüentemente, os peixes no decorrer do processo evolutivo obteriam a vitamina ingerindo tais organismos, podendo concentrar uma grande quantidade em sua dieta que seria armazenada em sua gordura corporal (HOLICK, 2003).

No que diz respeito à história humana, a vitamina D não era algo com que se preocupar até meados do século XVIII, foi quando devido a mudanças de estilo de vida advindos da Revolução industrial, o raquitismo acometeu milhares de crianças. Passaram-se mais dois séculos até que se descobrisse que o raquitismo era resultado da carência de um nutriente antirraquítico adquirido através da dieta ou da exposição ao sol (DELUCA, 2016; HERNIGOU *et al.*, 2019).

O início do século XX foi marcado pela descoberta da dupla origem da vitamina D: como um composto nutricional, encontrado principalmente no óleo do fígado de bacalhau, e foram descobertos os efeitos curativos da luz ultravioleta no tratamento do raquitismo (BOUILLON *et al.*, 2008; NORMAN, 2012). Além dessas descobertas, muitas outras foram realizadas ao longo do século, como evidenciado na Figura 1, que ilustra os principais avanços históricos relacionadas à vitamina D, relatadas por Norman (2012) e Jones (2022).

Figura 1. Linha do tempo com as principais descobertas relacionadas a vitamina D.



Própria autoria (2023)

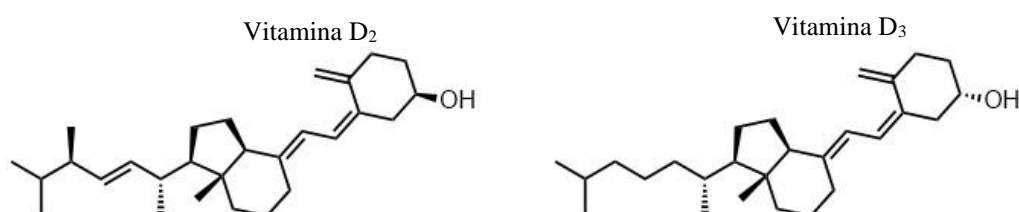
2.1.2 Fisiologia

As duas principais formas da vitamina D são, ergocalciferol (D₂) e o colecalciferol (D₃), sendo a primeira encontrada em fungos, e a segunda sintetizada em animais (KHOKHAR *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2016). A vitamina D₂ pode ser encontrada em cogumelos que são expostos ao sol e é produzida através da irradiação ultravioleta do ergosterol, um esteroide presente nas leveduras. Já a vitamina D₃ é sintetizada pelas células da pele a partir do 7-desidrocolesterol quando expostas à radiação ultravioleta. Além disso, ela também pode ser encontrada em peixes ricos em gordura (PAUCAR *et al.*, 2016; DADKHODAZADE *et al.*, 2018). Essas duas formas só diferem molecularmente pela presença de uma ligação dupla adicional e um grupo metil incorporados à cadeia alquílica lateral (vide Figura 2) (JORGE *et al.*, 2018).

Embora os metabólitos da vitamina D possam exibir atividades biológicas semelhantes, estudos indicam que a vitamina D₃ é consideravelmente mais potente, aproximadamente três vezes mais potente, do que a vitamina D₂ em seres humanos. Essa discrepância na eficácia entre as duas formas de vitamina D pode ser atribuída a diferenças na estrutura química e na afinidade pela proteína de ligação à vitamina D. Além disso, o ergocalciferol apresenta uma meia-vida plasmática mais curta, o que

pode contribuir para sua menor capacidade de manter os níveis séricos de 25(OH)D ao longo do tempo (RAMALHO *et al.*, 2017; SZYMCZAK-PAJOR *et al.*, 2022).

Figura 2. Estrutura molecular do Ergocalciferol (vitamina D₂) e Colecalciferol (vitamina D₃)

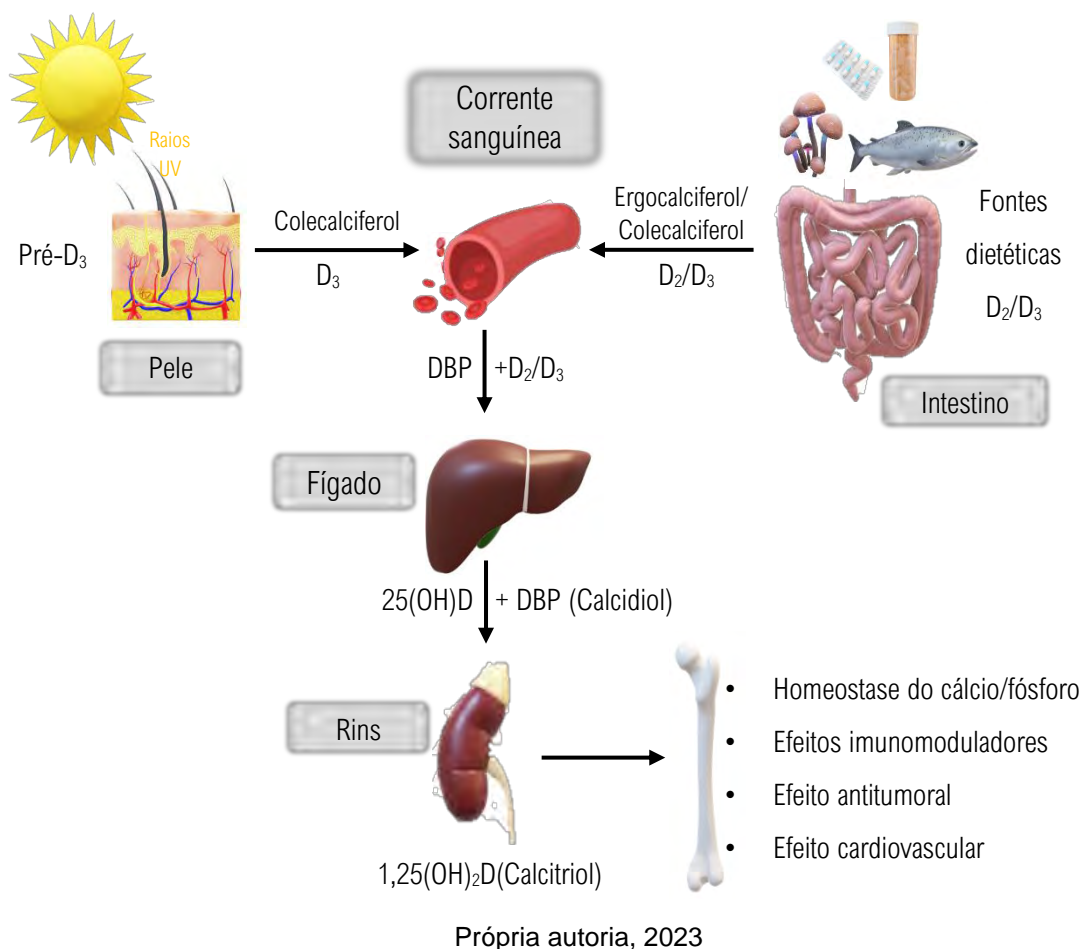


Própria autoria, 2023.

A síntese da vitamina D₃ se inicia quando a pele é exposta à radiação UVB, onde o 7-desidrocolesterol presente na epiderme sofre uma fotoisomerização não enzimática em pré-vitamina D₃. Esta pré-vitamina é instável termicamente e se isomeriza em colecalciferol, que se liga à proteína de ligação da vitamina D (DBP - *Vitamin D Binding Protein*) no sangue e é transportado para o fígado (DELUCA, 2004; KHOKHAR *et al.*, 2016). Na via de obtenção dietética, primeiro ocorre a absorção intestinal; depois disso, a vitamina entra na circulação, onde se ligam à DBP e às lipoproteínas. Após chegarem ao fígado, tanto a vitamina D da dieta quanto a de síntese da pele são hidroxiladas em calcidiol/calcifediol [25(OH)D₃]. Em seguida, o calcidiol alcança os tecidos-alvo, principalmente os rins, onde é metabolizado na forma biologicamente ativa da vitamina D, o calcitriol [1,25(OH)₂D₃] ou no metabólito inativo [24,25(OH)₂D] (HOLICK, 2006; DOMINGUEZ *et al.*, 2021; SZYMCZAK-PAJOR *et al.*, 2022).

A forma hormonal da vitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃] exerce suas várias funções através da ativação de um receptor nuclear. Essas funções incluem a absorção de cálcio e fosfato no intestino, a mobilização de cálcio nos ossos e a reabsorção de cálcio nos rins. Essa via hormonal é crucial para o metabolismo do cálcio e para manter a homeostase desse mineral essencial para a saúde óssea e imunológica (DELUCA, 2004). A síntese da vitamina D está esquematizada na Figura 3.

Figura 3. Síntese resumida da vitamina D.



Ainda que o calcidiol não seja a forma biologicamente ativa da vitamina D, a sua meia-vida é significativamente mais longa do que a do calcitriol, com duração de duas a três semanas, enquanto a do calcitriol é de apenas 8 horas. Por essa razão, o calcidiol é considerado a forma predominante de vitamina D circulante, sendo frequentemente utilizada como medida para avaliar o status de vitamina D de um indivíduo (KHOKHAR *et al.*, 2016; SZYMCZAK-PAJOR *et al.*, 2022).

2.1.3 Funções no organismo

A principal função da vitamina D é a regulação do metabolismo do cálcio e do fósforo, que são fundamentais para a mineralização adequada dos ossos. Ela age no intestino delgado, aumentando a absorção desses minerais, nos rins, diminuindo sua

excreção, e nos ossos, estimulando a síntese de proteínas que formam a matriz óssea. É o único hormônio conhecido por estimular as proteínas responsáveis pela absorção intestinal de cálcio e fósforo; nos ossos, ajuda a mineralização óssea, especialmente durante fases de crescimento (DELUCA, 2004).

De acordo Bouillon *et al.* (2008), aproximadamente 3% do genoma humano é regulado pelo sistema endócrino da vitamina D, sugerindo que esta vitamina pode ter funções além da saúde esquelética e da homeostase do cálcio. Pesquisas realizadas nas últimas décadas apontam que o papel da vitamina D no combate de enfermidades é mais amplo do que se pensava; ela atua na regulação da atividade do sistema imunológico e nervoso, apresenta efeitos benéficos sobre fragilidade óssea/dental, diabetes Mellitus, infecções bacterianas, doença cardiovascular, esclerose múltipla, hipertensão, doenças mentais, e alguns tipos de câncer (PODD, 2015; PAUCAR *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2016; DADKHODAZADE *et al.*, 2018; LALLY, GAUGHRAN, 2019). Estudos recentes, sugerem também a hipótese que baixos níveis de vitamina D podem estar relacionados a um fator de risco à contração da forma grave da infecção causada pelo vírus SARS-CoV-2 (causador do COVID 19), uma vez que essa vitamina regula componentes importantes relacionados ao sistema imunológico inato, adaptativo no controle da inflamação (BUI *et al.*, 2021; CRAFA *et al.*; 2021; BAE *et al.*, 2022; BASIŃSKA-LEWANDOWSKA *et al.*, 2023).

2.1.4 Diretrizes Nutricionais

Existem duas abordagens que são utilizadas para estabelecer diretrizes nutricionais para a ingestão de vitamina D. A primeira é baseada em ensaios clínicos randomizados, que buscam definir a eficácia e a segurança de diferentes doses de vitamina D em populações-alvo específicas, analisando diversos desfechos. A segunda estratégia se baseia nas concentrações séricas de 25(OH)D que estão associadas a resultados específicos de saúde ou doença em diferentes grupos populacionais (BOUILLON, 2017). Ambas as abordagens se complementam e são utilizadas para estabelecer as melhores diretrizes para a ingestão e suplementação de vitamina D.

A fim de garantir a saúde pública, comitês científicos patrocinados pelos governos em todo o mundo fornecem recomendações sobre a ingestão de vitamina

D, incluindo doses dietéticas recomendadas (RDA - *Recommended Dietary Allowances*) e ingestão adequada (AI - *Adequate Intake*) - variando de acordo com a organização (KIMBALL, HOLICK, 2020). Essas recomendações são baseadas em dados científicos robustos e têm como objetivo promover uma ingestão adequada de vitamina D para beneficiar a saúde da população em geral.

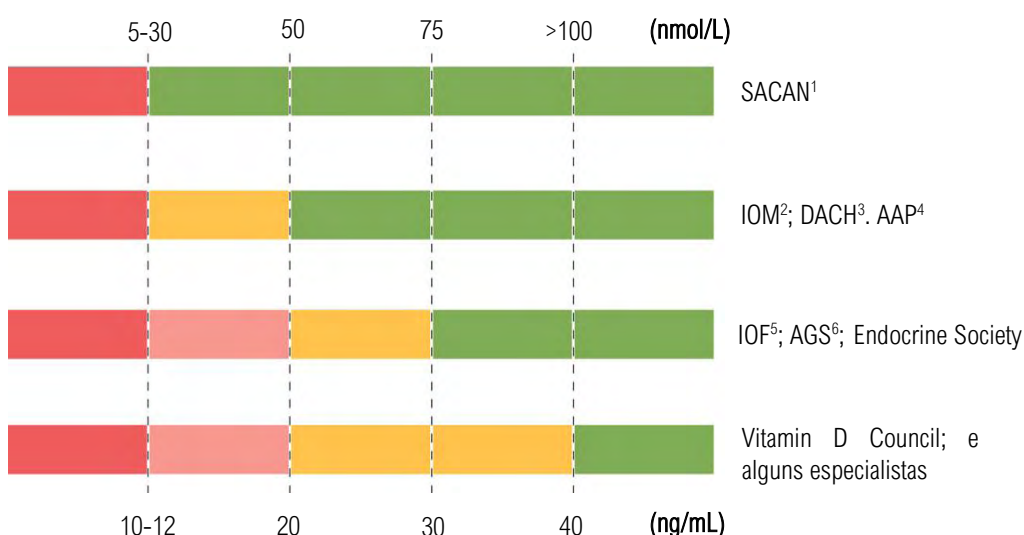
A ingestão diária recomendada pelo *Dietary Reference Intakes do Institute of Medicine*, dos Estados Unidos, é de 10-20 µg de vitamina D por dia, a depender da faixa etária do indivíduo (vide Tabela 1). No entanto, poucos são os alimentos que possuem níveis substanciais dessa vitamina, exceto por óleo de peixes de águas geladas e profundas como atum e salmão (IOM, 2011; DADKHODAZADE *et al.*, 2018). De todo modo, essa vitamina pode ser obtida pela exposição a luz solar, que tem sido relativamente baixa, devido à hábitos (protetor solar, roupas, reclusão) ou à região geográfica de habitação, porém desordens metabólicas como obesidade, problemas gastrointestinais e a baixa ingestão alimentar, podem desencadear e agravar os quadros de hipovitaminose D (PAUCAR *et al.*, 2016; DADKHODAZADE *et al.*, 2018).

Assim como a quota dietética recomenda, também não há um consenso sobre a concentração de 25(OH)D mais adequada para a saúde. Embora se acredite que haja um valor ideal para o status de vitamina D, isso é uma consideração complexa. Em geral, uma concentração sérica acima de 20 ng/mL é considerada ideal para a população em geral, enquanto para maiores de 65 anos, a concentração ideal é acima de 30 ng/mL (DOMINGUEZ *et al.*, 2021). A Figura 4 traz a categorização da vitamina D sérica aceita pela maioria das organizações internacionais.

Tabela 1. Diretrizes para ingestão de doses profiláticas de vitamina D.

Autoridade/país (ano)	Dose diária recomendada UI*/dia (µg/dia)					
	0-1 Anos	1-3 anos	4-18 Anos	18-70 anos	>70 anos	Gravidez
EFSA ¹ (2016)	400 (10)	600 (15)	600 (15)	600 (15)	600 (15)	600 (10)
DACH ² (2012)	400 (10)	800 (20)	800 (20)	800 (20)	800 (20)	800 (20)
IOM ³ (2011)	400 (10)	400 (10)	400 (10)	600 (15)	800 (20)	600 (15)
WHO-FAO ⁴ (2006)	200 (5)	200 (5)	200 (5)	200 (5)	600 (15)	200 (5)
ANVISA/MS ⁵ (2005)	200 (5)	200 (5)	200 (5)	200 (5)	200 (5)	200 (5)

Fonte: Adaptado de Bouillon (2017). ¹European Food Safety Authority; ²Deutschland (Germany) Austria and Confederation Helvetica (Switzerland); ³Institute of Medicine; ⁴Food and Agriculture Organization of the United Nations; ⁵Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005); *Unidades Internacionais.

Figura 4. Indicadores de suficiência de vitamina D para diferentes concentrações séricas de 25(OH)D no organismo humano.

Código das cores: vermelho denota um estado de deficiência, laranja um estado de insuficiência e verde um estado de suficiência. Fonte: Bouillon (2017). ¹Scientific Advisory Committee on Nutrition; ²Institute of Medicine; ³Deutschland (Germany), Austria and Confederation Helvetica (Switzerland); ⁴American Academy of Pediatrics; ⁵International Osteoporosis Foundation; ⁶American Geriatrics Society.

2.1.5 Hipovitaminose D

Estima-se que 1 bilhão de pessoas no mundo apresentem insuficiência de vitamina D, tendo uma predominância maior em regiões do Oriente Médio, China, Mongólia e Índia (HOLICK, 2007; SCHOOR, LIPS, 2017).

A hipovitaminose D é considerada por diversos autores como consequência do estilo de vida moderno. Esse estilo de vida é caracterizado pela prevalência da obesidade e pela crescente conscientização sobre os efeitos prejudiciais da radiação ultravioleta, o que resulta em uma maior ênfase na proteção solar; como resultado, muitas pessoas têm limitado sua exposição à luz solar, reduzindo assim a síntese natural de vitamina D (ADAMS, HEWISON, 2010; HOSSEIN-NEZHAD, HOLICK, 2013; RAMALHO *et al.*, 2017). Esse comportamento preventivo, embora benéfico para a proteção contra os danos causados pela exposição excessiva ao sol, contribuiu para a deficiência de vitamina D.

Alguns grupos possuem maior risco de deficiência de vitamina D, como mulheres grávidas, crianças, idosos, pessoas negras. Essas populações são mais propensas a ter baixos níveis de vitamina D devido a fatores como menor exposição solar, dificuldade na absorção e metabolismo da vitamina, menor consumo de alimentos ricos em vitamina D e outros fatores relacionados à idade, condições de saúde e estilo de vida (HOSSEIN-NEZHAD, HOLICK 2013). Os principais fatores de risco para prevalência da hipovitaminose D estão destacados na Tabela 2.

Uma ampla faixa da população de homens e mulheres americanos, canadenses e europeus (24% a 40%) tem deficiência de vitamina D (CASHMAN *et al.*, 2016; AMREIN *et al.*, 2020). Um estudo realizado no verão em três centros urbanos brasileiros revelou que a maioria dos participantes tinha deficiência (15,3%) ou insuficiência (50,7%) de vitamina D. Isso indica que, mesmo em um país com abundância de luz solar, a deficiência de vitamina D continua sendo um problema significativo, se assemelhando a países europeus; uma vez que, durante o inverno, é esperada uma queda ainda maior nos níveis de vitamina D (BORBA *et al.*, 2022).

Tabela 2. Fatores de risco para deficiência de vitamina D

Fator	Causa associada
Baixa exposição solar	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de protetor solar • Urbanização • Uso extenso de roupas
Fatores fisiológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Pigmentação da pele • Obesidade • Gravidez/amamentação • Insuficiência hepática/renal • Síndromes de má absorção • Envelhecimento
Fatores dietéticos	<ul style="list-style-type: none"> • Escolhas dietéticas limitadas • Falta de suplementação • Dietas vegetariana/veganas • Intolerância à lactose • Doença celíaca • Status socioeconômico
Fatores geográficos	<ul style="list-style-type: none"> • Localização de alta latitude • Inverno

A hipovitaminose D a curto prazo resulta em perda óssea, retardo no crescimento, osteoporose e fraturas (SCHOOR, LIPS, 2017; REHMAN *et al.*, 2021), e a longo prazo, pode ocasionar raquitismo e a osteomalácia (JAKOBSEN, KNUTHSEN, 2014). Além do comprometimento do metabolismo ósseo, pode acarretar em um aumento no risco da ocorrência de outras afecções, como doenças autoimunes, incluindo esclerose múltipla e diabetes tipo 1 (BOUILLON *et al.*, 2008; HOLICK *et al.*, 2011); doença cardiovascular; hipertensão (HOLICK, CHEN, 2008; DE LA GUÍA-GALIPIENSO *et al.*, 2021); doenças infecciosas, incluindo tuberculose e infecções respiratórias (GAUDET *et al.*, 2022); diabetes tipo 2; vários tipos de câncer; e o agravamento de quadros de depressão, esquizofrenia e determinadas alergias (FELDMAN *et al.*, 2014; WIMALAWANSA, 2018; ARGANO *et al.*, 2022; KHAN *et al.*, 2022).

2.2 Fortificação de Alimentos

A fortificação de alimentos é uma estratégia que envolve a adição de nutrientes essenciais, sejam eles naturalmente presentes ou não, com o objetivo de aumentar o seu valor nutricional e prevenir deficiências (BRASIL, 2022). Países industrializados têm adotado essa prática ao longo da história como forma de combater as deficiências de vitamina D na população. Exemplos de países que adotaram medidas de fortificação incluem Canadá, Estados Unidos, Polônia e Finlândia, os quais têm regulamentações que tornam obrigatória a adição de vitamina D em determinadas categorias de alimentos (CALVO *et al.*, 2004; BYRDWELL, 2009).

A eficácia da fortificação com vitamina D está diretamente relacionada à estabilidade da matriz de gordura nos alimentos, já que a vitamina D é solúvel em gordura (MAURYA *et al.*, 2020). No entanto, um desafio adicional enfrentado pela indústria alimentícia é a sensibilidade dessa vitamina aos métodos de processamento comumente utilizados. A vitamina D pode ser facilmente degradada ou perdida durante os processos de aquecimento, armazenamento prolongado e outros métodos industriais. Perdas significativas de vitamina D foram observadas em vários alimentos fortificados, como leite, queijo, iogurte e outros produtos lácteos. Essa degradação ocorre principalmente devido à oxidação e isomerização durante o processamento e armazenamento desses alimentos (GANESAN *et al.*, 2011; JAKOBSEN, KNUTHSEN 2014; MAURYA, AGGARWAI, 2017).

Uma estratégia aplicada para superar essas limitações é a incorporação da vitamina D₃ em microcápsulas. O encapsulamento de compostos bioativos e nutrientes lipofílicos tem sido amplamente utilizado pelas indústrias alimentícia e nutracêutica, por ser uma tecnologia capaz de constituir um meio apropriado de aumentar a estabilidade e preservar as propriedades promotoras da saúde durante o processamento e armazenamento (BALLARD *et al.*, 2007; HUANG, YU, RU, 2010). Outro benefício associado ao encapsulamento é a possibilidade de entrega alvo e liberação controlada, aumentando assim a bioatividade e diminuindo os efeitos colaterais da potencial hipervitaminose devido a altas doses de administração (LUO, TENG, WANG, 2012; VIEIRA, SOUZA, 2022).

2.3 Microencapsulação

A microencapsulação pode ser definida como um processo de empacotamento de uma substância ativa dentro de uma matriz ou revestimento. Essa técnica visa melhorar a estabilidade, proteção contra fatores ambientais adversos e controle da liberação do material encapsulado (MADENE *et al.*, 2006; DADKHODAZADE *et al.*, 2021).

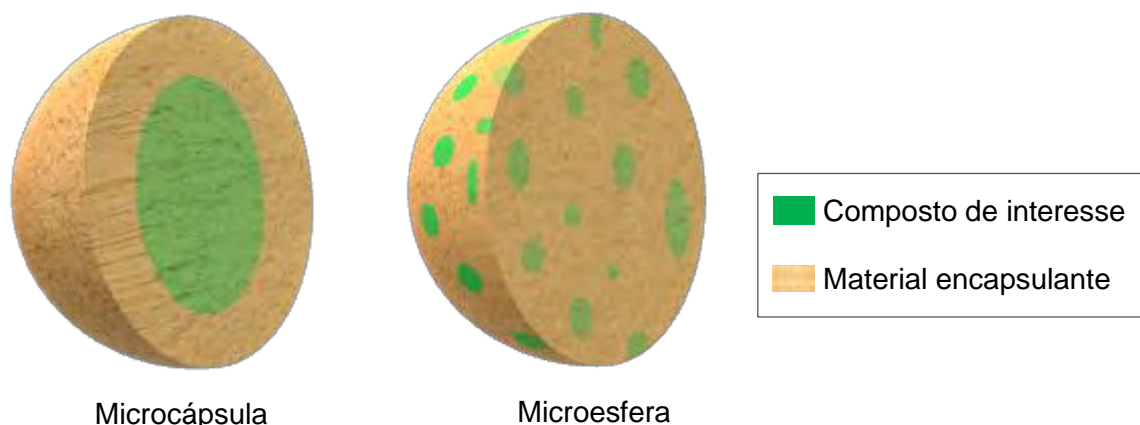
Essa tecnologia foi desenvolvida há aproximadamente 70 anos, e desde então, vem despertando interesse tanto do setor farmacêutico (especialmente para entrega de medicamentos e vacinas), como da indústria alimentícia, particularmente para o desenvolvimento, enriquecimento e fortificação de alimentos com nutrientes e compostos bioativos (DADKHODAZADE *et al.*, 2021). Esses compostos são geralmente instáveis a condições ambientais, como a presença de oxigênio, luz e agentes oxidantes; também podem reagir com outros componentes do alimento causando degradação e consequente perda de bioatividade (AUGUSTIN, SANGUANSRI, 2008). O encapsulamento é uma alternativa de proteção efetiva e melhora da estabilidade, propiciando seu uso como ingredientes alimentícios; além disso, pode proporcionar liberação controlada de substâncias essenciais na matriz ou ambiente desejado em um tempo específico, evitando a degradação espontânea (MADENE *et al.*, 2006; NEDOVIC *et al.*, 2011; BALLESTEROS *et al.*, 2017).

Durante o processo de microencapsulação, são produzidas micropartículas com diâmetros que variam de 1 a 1000 micrômetros (DIAS *et al.*, 2015). No que diz respeito à nomenclatura, a substância encapsulada é comumente referida como material de núcleo, núcleo ativo, composto de interesse ou fase interna. Essa substância é envolvida por uma fase externa, que pode ser denominada material de revestimento, agente encapsulante, transportador, invólucro, cápsula, membrana ou material de parede (EUN *et al.*, 2019).

A morfologia das micropartículas é determinada principalmente pelos materiais utilizados no núcleo e na camada de revestimento, bem como da técnica utilizada no processo, sendo as formas mais comuns as microcápsulas e as microesferas (vide Figura 5). Nas microcápsulas, o composto ativo é protegido por uma membrana, enquanto nas microesferas, o composto é disperso em todo o volume do material,

podendo estar inclusive em sua superfície (DIAS *et al.*, 2015; PAULO, SANTOS, 2017).

Figura 5. Diferenças morfológicas entre microcápsulas e microesferas.



Própria autoria, 2023

A proteção de agentes sensíveis à degradação através da encapsulação vem provando ser uma excelente ferramenta para a indústria de alimentos, propiciando o desenvolvimento de novas formulações com vitaminas, enzimas, aromas, sabores, antioxidantes, corantes, minerais e microrganismos (ABBAS *et al.*, 2012; PARAMERA, KARATHANOS, KONTELES, 2014; JILANI *et al.*, 2015; PAULO, SANTOS, 2017; NGUYEN *et al.*, 2018; YE, GEORGES, SELOMULYA, 2018; OZKAN *et al.*, 2019). Diante das características particulares dos alimentos e dos processos industriais, existe a necessidade de diversificação e avanços para satisfazer aspectos de funcionalidade do encapsulado no produto final, a compatibilidade do agente encapsulante com o alimento, estabilidade durante o processamento e armazenagem, concentração ótima de encapsulamento, tamanho e densidade das partículas, e o custo de produção (SHI *et al.*, 2008; PARAMERA, KONTELES, KARATHANOS, 2011; ABBAS *et al.*, 2012; JILANI *et al.*, 2015; YOUNG, DEA, NITIN, 2017; OZKAN *et al.*, 2019; YOUNG, NITIN, 2019).

2.4 Biossorção

A biossorção é definida como a remoção/ligação de uma substância de uma solução aquosa por intermédio de um material biológico, sendo que as substâncias utilizadas podem ser de origem inorgânica/orgânica, solúveis/insolúveis (GADD, 2009). O termo sorção é empregado tanto para absorção quanto para adsorção, termos semelhantes, mas com terminologias específicas. Enquanto que a absorção está relacionada a incorporação de uma substância de um estado por outra de estado diferente (por exemplo, gases sendo absorvidos pela água ou líquidos sendo absorvidos por um sólido); a adsorção se trata da aderência física ou ligação de íons e moléculas na superfície do material sólido, neste último caso, o material acumulado na interface é o adsorbato e a superfície sólida é o adsorvente (GADD, 2009; FOMINA, GADD, 2014).

Michalak *et al.* (2013), relata que a biossorção se enquadra em uma subcategoria de adsorção, enquanto Gadd (2009) expõe que a biossorção é um processo complexo, e inclui mecanismos como absorção, adsorção, troca iônica, complexação de superfície e precipitação.

A biossorção foi originalmente desenvolvida como método de tratamento alternativo para indústria de água e efluentes (FOMINA, GADD, 2014), por se tratar de um processo de ligação rápida e reversível de íons de soluções aquosas a grupos funcionais presentes na superfície da biomassa, independente do metabolismo celular (VOLESKY, 2007; MICHALAK *et al.*, 2013). A maioria dos estudos sobre biossorção tem sido direcionada ao tratamento de poluentes, como metais, corantes e produtos farmacêuticos em soluções (AKSU, 2005; CRINI, BADOT, 2008; WITEK-KROWIAK, 2011; KOUSHA *et al.*, 2012; SARAVANAN *et al.*, 2021). No entanto, além do uso da biossorção como método de remoção de compostos indesejáveis, tem havido um crescente interesse em sua aplicação para a retenção de compostos de interesse. O emprego de materiais biológicos como biossorventes para substâncias bioativas tem demonstrado grande potencial, e estudos recentes têm investigado o uso de bactérias e leveduras para a biossorção de antocianinas, carotenoides, flavonoides, ácidos fenólicos e vitaminas (DADKHODAZADE *et al.*, 2018; DE MEDEIROS *et al.*, 2019; RÚBIO *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2021; DE ANDRADE *et al.*, 2022; MAROLDI *et al.*, 2022; DA SILVA *et al.*, 2023). Essas pesquisas ressaltam as perspectivas

promissoras da biossorção como uma estratégia eficiente para a retenção de compostos bioativos, abrindo caminho para aplicações em diversos setores industriais.

2.5 Leveduras como biossorvente

As leveduras são fungos cujo estado vegetativo é comumente predominante com reprodução por brotamento e fissão das células unitárias. Tipicamente, as leveduras se reproduzem assexuadamente (duplicação rápida), mas podem também adotar a reprodução sexuada (KURTZMAN, FELL, BOEKHOUT, 2011; CORADELLO, TIRELLI, 2021). Trata-se de organismos eucarióticos uni/multicelulares, classificadas em dois grupos filogenéticos: leveduras ascomicetas e leveduras basidiomicéticas (JACH, SEREFKO, 2018). São organismos bastante adaptativos e evoluíram sua capacidade de desenvolvimento, ocorrendo tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas (CORADELLO, TIRELLI, 2021).

Possuem uma ampla importância tecnológica, têm sido usadas na produção de alimentos fermentados por milênios (JACH, SEREFKO, 2018), além das aplicações em rações, agricultura, biocombustíveis, indústrias médicas e químicas, bem como na proteção ambiental (PHAM-HOANG *et al.*, 2013; SALARI *et al.*, 2015). Entre as leveduras mais populares industrialmente, podemos citar a *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* (panificação, fabricação de cerveja), *Saccharomyces bayanus* (produção de vinho), *Candida kefir* (produto lácteo, aromas e síntese enzimática), *Cyberlindnera jadinii* (usada como aromatizante de alimentos) (GONZÁLEZ *et al.*, 2006; GÜNEŞER *et al.*, 2015; KIELISZEK *et al.*, 2017; BENITO, CALDERÓN, BENITO, 2019).

As leveduras *Saccharomyces sensu stricto* são as mais empregadas pela indústria cervejeira, pois além de serem seguras (*Generally Recognized As Safe* – pelo FDA), apresentam crescimento rápido, alta produção de etanol e resistência a estresses ambientais (FERREIRA *et al.*, 2010; LEÓN-GONZÁLEZ *et al.*, 2018). As cepas de *S. pastorianus* (também conhecida como *S. uvarum* ou *S. carlsbergensis*) e *S. cerevisiae* são amplamente utilizadas na fermentação de cervejas, sendo responsáveis pela produção de lagers (baixa fermentação) e ales (alta fermentação),

respectivamente (STEWART, 2014). Em contrapartida, a indústria cervejeira gera uma quantidade significativa de biomassa de levedura, representando aproximadamente 3% do volume fabricado (FERREIRA *et al.*, 2010). Embora a biomassa de levedura já seja utilizada em algumas aplicações alimentícias, ela possui um excelente potencial como bioveículo no processo de encapsulamento, oferecendo uma estratégia promissora para agregar valor a esse subproduto industrial (CORADELLO, TIRELLI, 2021).

As células de levedura são microrecipientes naturais que possuem um tamanho médio de 5 a 10 μm , apresentando coloração neutra e sabor suave (CORADELLO, TIRELLI, 2021). A estrutura celular das leveduras proporciona a interação e incorporação de moléculas com diversas estabilidades e solubilidades. A presença da rede de β -glucana, juntamente com a pequena quantidade de quitina e a camada de manoproteína, permite a complexação eficiente de moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas. Além disso, a membrana plasmática atua como lipossoma permitindo a encapsulação de moléculas com diferentes lipoafinidades (SHANK, 1977; CIAMPONI *et al.*, 2012; PHAM-HOANG *et al.*, 2013; SALARI *et al.*, 2015; DADKHODAZADE *et al.*, 2018).

A *S. cerevisiae* é amplamente utilizada como biossorvente devido à sua disponibilidade comercial. No entanto, a *S. pastorianus*, embora menos explorada nesse contexto, apresenta características distintas que a tornam uma opção interessante. Em comparação com a *S. cerevisiae*, a *S. pastorianus* possui uma menor quantidade de β -glucana e uma maior presença de manoproteínas em sua estrutura celular, o que confere uma maior hidrofiliabilidade à célula (BASTOS *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2015; MESSIAS, 2016). Essas diferenças estruturais entre as leveduras podem influenciar suas propriedades de biossorção e encapsulação e abrir novas possibilidades no campo dessas técnicas. Na literatura científica, os estudos que investigam o uso da levedura *S. pastorianus* como biossorvente ou bioveículo para compostos alimentícios são escassos. A maioria dos estudos recentes (últimos 6 anos), conforme apresentado na Tabela 3, tem se concentrado no uso da espécie *S. cerevisiae* como biossorvente ou bioveículo/transportador. No entanto, há uma lacuna de pesquisa em relação à utilização da *S. pastorianus* nessa área, o que representa uma oportunidade promissora para investigações.

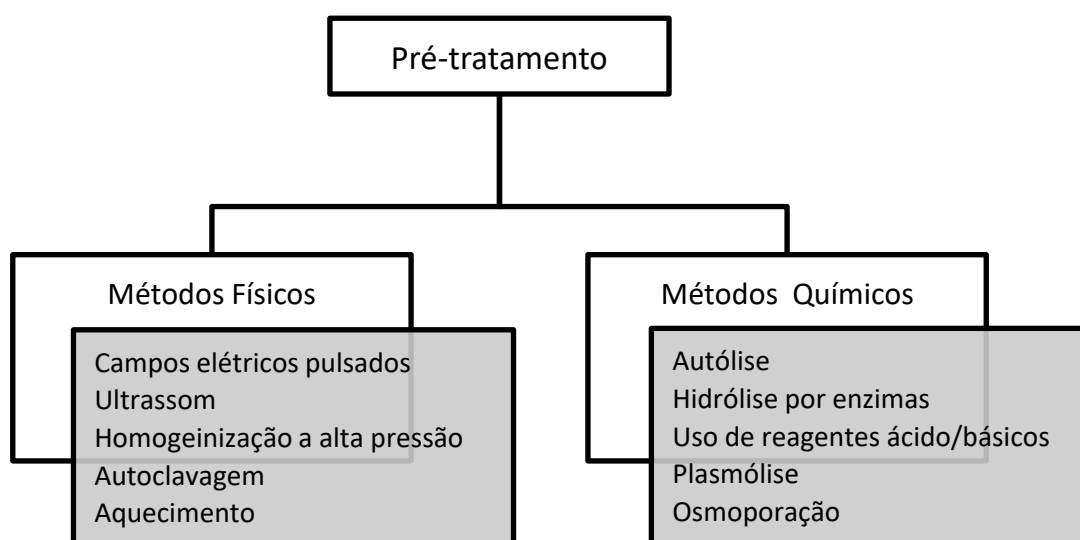
Tabela 3. Estudos relatando uso da levedura como bioissorvente, bioveículo ou transportador.

Levedura utilizada	Composto incorporado	Método de incorporação	Referência	
<i>S. pastorianus</i>	Antocianinas	Bioissorção	(KUREK <i>et al.</i> , 2023)	
	Curcumina e fisetina	Ultrassom	(DE ANDRADE <i>et al.</i> , 2022)	
	Taxifolina	Ultrassom	(KALININA <i>et al.</i> , 2022)	
	Carotenóides da casca de abóbora	Ultrassom/ <i>Spray-drying</i>	(RÚBIO <i>et al.</i> , 2022)	
	Ácido gálico	Bioissorção	(KARAMAN, 2021)	
	Óleo essência de orégano	Emulsão	(DIMOPOULOS <i>et al.</i> , 2021)	
	Compostos fenólicos de chás branco e verde	Bioissorção	(RIBEIRO <i>et al.</i> , 2021)	
	<i>S. cerevisiae</i>	Limoneno	<i>Spray-drying</i>	(ERRENST <i>et al.</i> , 2021)
		Compostos fenólicos do bagaço de uva	<i>Spray-drying</i>	(RÚBIO <i>et al.</i> , 2020)
		Óleo da semente de cominho preto	Emulsão	(KARAMAN, 2020)
Polifenóis do chá verde, preto e folhas de oliveira		Bioissorção	(JILANI <i>et al.</i> , 2020)	
Compostos fenólicos da polpa e semente de açaí		Bioissorção	(ROSSETTO <i>et al.</i> , 2020)	
	Curcumina	Osmoporação	(DE MEDEIROS <i>et al.</i> , 2019)	
	Colecalciferol	Bioissorção	(DADKHODAZADE <i>et al.</i> , 2018)	

2.5.1 Pré-tratamentos celulares

O emprego das células de levedura como biossorvente dispõe de muitos benefícios, como mencionado anteriormente. Embora a parede celular da levedura apresente considerável porosidade, o uso adequado de tratamentos prévios pode aumentar a permeabilidade da estrutura da célula, e por consequência, afetar a eficiência do encapsulamento. Segundo Dimopoulos *et al.* (2021), a aplicação de pré-tratamentos celulares que aumentam a permeabilidade das estruturas celulares antes do encapsulamento é uma prática comum, uma vez que, normalmente aceleraram a cinética de biossorção. As principais técnicas que têm sido utilizadas para o aumento da permeabilidade celular são mostradas na Figura 6 (CZERNIAK *et al.*, 2015; DADKHODAZADE *et al.*, 2021).

Figura 6. Pré-tratamentos utilizados para melhorar a permeabilidade celular.



Própria autoria, 2023.

O uso de pré-tratamentos celulares, de modo geral, tem demonstrado aumentar a eficiência da biossorção (KAVOSI *et al.*, 2017; RÚBIO *et al.*, 2018; KARAMAN, 2020; DADKHODAZADE *et al.*, 2021). Entre os métodos químicos disponíveis, a plasmólise se destaca como uma abordagem de fácil aplicação e alta eficácia. Esse processo induz a contração e o descolamento da membrana plasmática em relação à parede

celular por meio do uso de substâncias plasmolizantes, tais como NaCl ou acetato de etila. Como resultado, ocorre um aumento significativo na permeabilidade celular (DIMOPOULOS *et al.*, 2021). De acordo com Czerniak *et al.* (2015), a plasmólise promove a remoção da maior parte do material citoplasmático que ocupa as células; o uso desse pré-tratamento antes do processo de encapsulamento impacta positivamente a “capacidade” da célula e melhora o rendimento geral da operação. Estudos mostraram que o uso da plasmólise como pré-tratamento teve efeitos positivos na eficiência do biossorção de diferentes compostos, como ácido clorogênico (SHI *et al.*, 2007), óleo de semente de beldroegas (KAVOSI *et al.*, 2017), óleo de semente de cominho preto (KARAMAN, 2020) e colecalciferol (DADKHODAZADE *et al.*, 2018). Esses resultados reforçam que a plasmólise é um método eficaz no aumento a permeabilidade celular e consequente melhora na eficiência do processo de encapsulamento de nutrientes e bioativos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

Para preparação das micropartículas utilizou-se como bioissorvente a biomassa residual de levedura cervejeira (*Saccharomyces pastorianus*) em seu estado úmido, que foi fornecida pela Cervejaria Hausen Bier (Araras, São Paulo, Brasil) e vitamina D₃ 98 % de pureza (Sigma-Aldrich, EUA).

Nas determinações analíticas foram usados metanol grau cromatográfico (Panreac, Barcelona/ Espanha), acetonitrila grau cromatográfico (Panreac, Barcelona/Espanha), etanol absoluto grau analítico (Synth, Brasil) e água ultrapura (Merck Millipore, Direct-Q3).

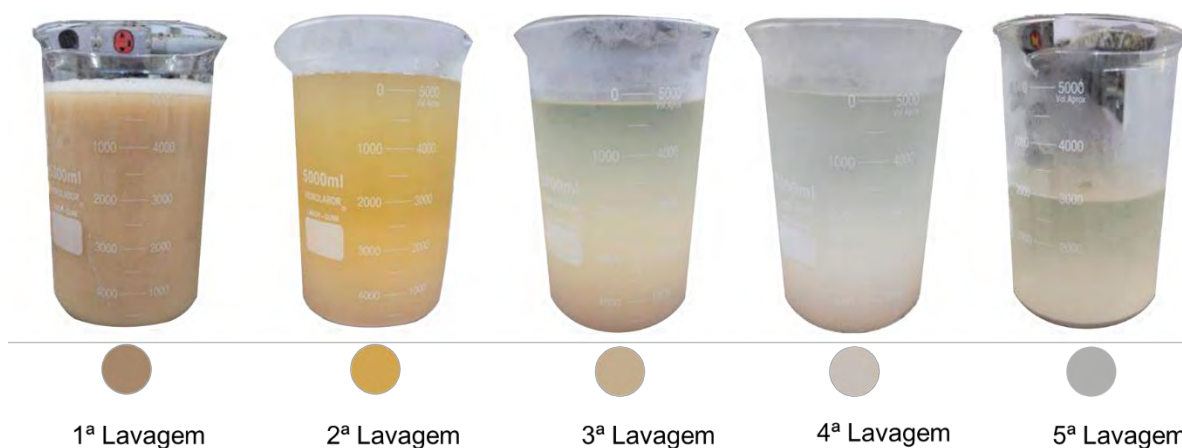
3.2 Preparo da biomassa

Para viabilizar o uso dessa biomassa, foi necessária uma etapa inicial de purificação, com base no método descrito por Rúbio *et al.* (2018), com algumas adaptações. O processo envolveu lavagens sucessivas com água destilada até a eliminação completa de todos os resíduos em suspensão e separação do sobrenadante por decantação. O número de lavagens foi determinado com base na observação visual do nível de turbidez da água empregada na lavagem (conforme ilustrado na Figura 7), resultando em um total de cinco ciclos de lavagem, com substituição da água a cada intervalo de 24 horas.

Posteriormente, a levedura lavada foi desidratada conforme Rúbio *et al.* (2020), com modificações. O material foi diluído em água destilada na proporção de 1:3 (massa:volume) e mantido sob agitação magnética à temperatura ambiente (24-26 °C) durante o procedimento de secagem para evitar decantação. As leveduras foram seca em *spray-dryer* de bancada (modelo MSD 1.0, Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, Brasil), utilizando bico de 1,2 mm de diâmetro, temperatura de entrada do ar e pressão do compressor de 140 ± 5 °C e 0,39 MPa, respectivamente, temperatura de

saída de 100 ± 5 °C, taxa de alimentação de 0,8 L/h, fluxo de ar de secagem de 2,5 m/s, vazão do compressor de 40 L/min. A levedura seca foi coletada em frasco Schott e armazenada a -20°C .

Figura 7. Aparência da biomassa durante a etapa de lavagem.



Própria autoria, 2023.

3.3 Pré-tratamento

Antes do processo de bioissorção o material seco foi dividido em duas porções, uma delas não passou por tratamento algum e foi denominada como levedura intacta (TLI) e a segunda foi submetida à plasmólise, conforme metodologia descrita a seguir, e foi chamada de levedura plasmolisada (TLP).

Para produção das células de levedura plasmolisadas, o material seco foi suspenso em erlenmeyers contendo uma solução de cloreto de sódio (NaCl) (100 g/L) a 10%; em seguida, os frascos foram colocados em um agitador orbital (Marconi, MA420, Brasil) a 55 °C e 180 rpm por 48 horas. Após esse período, as células foram separadas por centrifugação (Eppendorf, 5430R, Alemanha) 6000 rpm, 10 min e lavadas cinco vezes com água destilada, visando a remoção do NaCl e quaisquer materiais citoplasmáticos liberados no processo (KAVOSI *et al.*, 2017). Após a lavagem, a levedura foi seca em *spray dryer* adotando-se todos os parâmetros de secagem citados no item 3.2.

3.4 Caracterização química da levedura

Visando determinar as possíveis alterações da composição química na biomassa de levedura após o pré-tratamento, foi realizada sua caracterização química antes e depois do pré-tratamento. Sendo analisado conteúdo de água (AOAC), cinzas (AOAC), teor de proteína (AOAC) e lipídeos totais (*Soxhlet*).

3.5 Quantificação da vitamina D₃

A quantificação da vitamina D₃ foi realizada conforme adaptação dos procedimentos descritos por Paucar *et al.* (2016). Foi empregado o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, Prominence, Japão) controlado pelo software LC Solution (Versão 1.25). O sistema incluiu uma bomba de fase móvel quaternária, um injetor automático, um compartimento termostaticado para a coluna e um detector de arranjo de diodos. A coluna analítica utilizada foi a EVO C18 (150 x 4,6 mm, partículas de 5 micrômetros) mantida a uma temperatura constante de 30 °C. A separação cromatográfica foi realizada utilizando metanol e acetonitrila como fase móvel na proporção de 9:1 (v/v), com um fluxo constante de 0,60 mL/min. Uma injeção de 30 µL das amostras foi realizada, e a detecção ocorreu em 265 nm, utilizando um tempo total de corrida de 8 minutos. A identificação da vitamina D₃ foi feita por meio da comparação do tempo de retenção (5,30 minutos) com o tempo de retenção da substância padrão de vitamina D₃. Para a quantificação da vitamina D₃, foi empregada padronização externa por meio das áreas obtidas de análises em triplicata de 6 níveis de concentração da vitamina D₃ preparadas entre 15 e 90 µg/mL. A obtenção da equação de regressão linear foi realizada com o auxílio do *software* Excel (Microsoft, EUA).

3.6 Bioissorção

3.6.1 Cinética de bioissorção

Para esse procedimento foram pesados 70 mg de biomassa de levedura (TLI e TLP) e adicionados a um tubo tipo Falcon de 15 mL, juntamente com 9,8 mL de água. Em seguida, adicionou-se à suspensão 0,2 mL de uma solução etanólica de vitamina D₃ (1 mg/mL). O experimento foi conduzido em agitador (Heidolph, Multi Reax) a 1500 rpm e 25°C. As suspensões foram agitadas por diferentes períodos de tempo, incluindo 24 horas, 15 horas, 12 horas, 9 horas, 6 horas, 4 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos, 15 minutos, 10 minutos, 5 minutos e 1 minuto. Ao final de cada período, as amostras foram retiradas simultaneamente. Posteriormente, foram submetidas a uma centrifugação (Eppendorf, 5430R, Alemanha) a 6000 rpm por 5 minutos a 25°C, e o sobrenadante resultante foi utilizado para quantificar as concentrações finais de vitamina em cada amostra. Também foi utilizada uma amostra controle (AMC), que constituía da solução de vitamina D₃ (0,2 mL) diluída no mesmo volume de água utilizado na suspensão de levedura, a qual foi submetida aos mesmos parâmetros das demais amostras, a fim de determinar as possíveis perdas da vitamina ao longo do processo (RÚBIO *et al.*, 2018). Todo o experimento foi realizado em triplicata com os dois tratamentos da levedura.

A quantidade de vitamina bioissorvida pelas células de levedura (mg/g de levedura seca) e a eficiência do processo de bioissorção foram determinadas utilizando a Equação 1 e a Equação 2, respectivamente.

$$q = \frac{C_0 - C_f}{m} \cdot v \quad (1)$$

$$E = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde: q = capacidade de sorção (mg de vitamina bioissorvida/g de levedura); C_0 = concentração inicial de vitamina D₃ antes da bioissorção (mg/mL); C_f = concentração final de vitamina D₃ no sobrenadante (mg/mL); v = volume da fase aquosa (mL); m = massa de levedura (g) E = eficiência da bioissorção (%).

3.6.2 Ajuste do modelo cinético

Os modelos matemáticos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem (HO; MCKAY, 1999), representados pelas Equações 3 e 4, respectivamente, foram empregados para realizar o ajuste dos dados experimentais de biossorção.

$$\ln(q_e - q) = \ln q_e - K_1 t \quad (3)$$

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{(K_2 q_e^2)} + \frac{t}{q_e} \quad (4)$$

Nestas equações, q representa a capacidade de sorção (mg de vitamina biossorvida /g de levedura) no tempo t (minutos); q_e a capacidade de sorção (mg/g) no equilíbrio; e K_1 e K_2 são constantes de velocidade.

Para determinar o melhor modelo, foram realizadas comparações entre os coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir do ajuste linear, bem como entre os valores experimentais e teóricos das capacidades de sorção.

3.7 Biossorção

3.7.1 Preparo das micropartículas

Após realizados os estudos de cinética de biossorção, estabeleceu-se o tempo de equilíbrio para ambos os tratamentos de levedura (6 horas de agitação). A partir desse parâmetro, realizou-se o carregamento das células de *S. pastorianus* com a vitamina D₃ pelo método de biossorção. As amostras foram preparadas conforme procedimento descrito no item 3.6.1, utilizando-se um tempo de agitação de 6 horas e uma concentração de vitamina de 80 µg/mL. Após esse período, o material foi separado por centrifugação (6000 rpm, 25°C por 5 minutos) e congelado a -20°C para posterior atomização.

3.7.2 Secagem

A secagem por atomização foi realizada com base no método descrito por Rocha, Fávaro-Trindade e Grosso (2012), com adaptações. Inicialmente, o material foi diluído em água destilada na proporção 1:2 (massa:volume) e colocado sob agitação magnética para evitar decantação. Então, foi bombeado até o bico atomizador para nebulização das partículas em *spray dryer* (modelo MSD 1.0, Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, Brasil). Foram adotados os seguintes parâmetros de secagem: temperatura de entrada do ar e pressão do compressor de 120 ± 5 °C e 0,39 MPa, respectivamente, temperatura de saída de 90 ± 5 °C, taxa de alimentação de 0,8 L/h, fluxo de ar de secagem de 2,5 m/s, vazão do compressor de 40 L/min, bico atomizador de 1,2 mm de diâmetro. Após a atomização as micropartículas foram coletadas em embalagem de vidro e armazenada a -20°C para as análises de caracterização.

3.7.3 Extração e retenção da vitamina nas micropartículas

A vitamina impregnada foi extraída das células de levedura por lavagem das micropartículas conforme metodologia descrita por Paucar *et al.* (2016) com algumas modificações. Triplicatas de 70 mg da amostra foram pesadas em tubos de centrífuga de 15 mL. Em seguida, 5 mL de metanol foram adicionados aos tubos, que foram agitados em agitador (Heidolph, Multi Reax) por 2 minutos e mantidos em um banho ultrassônico (Unique, Ultracleaner 1400, Brasil) a 25°C por 5 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados (Eppendorf, 5430R, Alemanha) por 5 minutos a 6000 rpm (25°C), e o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico. Esse processo foi repetido uma segunda vez para garantir a extração máxima da vitamina D₃. O sobrenadante obtido foi utilizado para a quantificação da vitamina D₃ via CLAE, conforme descrito na seção 3.5. Para determinar a retenção da vitamina nas células de levedura, foram determinadas as concentrações de vitamina D₃ pré-secagem (na forma de suspensão de levedura) e a concentração de vitamina nas micropartículas resultantes (Equação 5). O rendimento (*EY*) e a eficiência (*EE%*) da

microencapsulação foram analisados respectivamente seguindo as Equações 6 e 7, conforme descrito por Czerniak *et al.* (2015).

$$\text{Retenção} = \frac{\text{Concentração vit } D_3 \text{ nas micropartículas}}{\text{Concentração vit } D_3 \text{ na suspensão de levedura}} \cdot 100 \quad (5)$$

$$EE(\%) = \frac{\text{Massa de vitamina encapsulada}}{\text{Massa inicial de vitamina}} \cdot 100 \quad (6)$$

$$EY(\text{mg/g}) = \frac{\text{Massa inicial de vitamina} - \text{massa de vitamina superficial}}{\text{Massa do material encapsulante}} \quad (7)$$

3.8 Caracterização das micropartículas

A caracterização foi realizada com as micropartículas dos dois tratamentos de levedura, TLI e TLP, carregadas com vitamina D₃, e com a levedura de ambos tratamentos sem a incorporação da vitamina, denominada levedura controle: Controle Tratamento Levedura íntegra (CTLI) e Controle Tratamento Levedura Plasmolisada (CTLP).

3.8.1 Atividade de água

A determinação da atividade de água (A_w) dos pós constituídos por biomassa de leveduras carregada com a vitamina D₃ foi realizada em triplicata, utilizando o equipamento Aqualab Series 3TE (Decagon Devices, EUA), a uma temperatura de 25°C.

3.8.2 Teor de umidade

O teor de umidade dos pós foi medido em um analisador de umidade (MB25 Halogen, Ohaus, Suíça) utilizando radiação infravermelha e uma lâmpada de aquecimento de halogênio. Os resultados foram expressos em percentual.

3.8.3 Morfologia das partículas

A morfologia das micropartículas foi avaliada via microscopia óptica (Leica Microsystems, Alemanha) utilizando uma objetiva de imersão (100x). Além disso, as amostras foram analisadas por microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Tabletop Microscope, Hitachi TM300). Para a preparação das amostras, estas foram fixadas em stubs de alumínio utilizando fita adesiva condutiva de dupla face de carbono. O MEV foi operado a uma tensão de 15 kV.

3.8.4 Microscopia confocal de varredura a laser

As amostras foram preparadas de acordo com o procedimento descrito por Rúbio *et al.* (2020). Primeiramente, as amostras foram imersas em uma solução de Calcofluor White M2R, na concentração de 1 µg/mL. Em seguida, as células de levedura foram lavadas três vezes com água destilada e imersas em uma solução de vermelho Nilo, também na concentração de 1 µg/mL. Esses corantes foram utilizados para corar as paredes celulares e os corpos lipídicos das células, respectivamente. A análise das células de levedura foi realizada utilizando o microscópio confocal Leica (TCS SP5, Leica Microsystems, Alemanha). Para a detecção do Calcofluor, foi utilizado um comprimento de onda de excitação de 405 nm, e a luz emitida foi registrada entre 430 e 480 nm. Já para o vermelho Nilo, o comprimento de onda de excitação foi de 488 nm, e os comprimentos de onda de emissão foram registrados entre 515 e 645 nm.

3.8.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

As amostras foram submetidas à caracterização por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) na região do infravermelho médio. Os espectros foram obtidos utilizando um espectrômetro Perkin Elmer (modelo Spectrum ONE FT-IR) com o acessório de amostragem Universal ATR. A faixa de medição compreendeu os valores de 4000 a 550 cm⁻¹, sendo realizadas 16 varreduras com uma resolução de 4 cm⁻¹.

3.8.6 Potencial Zeta

Os potenciais Zeta de todas as amostras (CTLI, CTLP, TLI, TLP) foram determinados usando um analisador de potencial Zeta (Zetasizer ZS 3600, Malvern Instruments, Reino Unido), em um ângulo de detecção de 173° e comprimento de onda de 633 nm. As medições foram realizadas em triplicata a 25°C.

3.9 Estudo da estabilidade da vitamina D₃ impregnada nas células de leveduras

As micropartículas foram armazenadas a 25°C ± 2°C em frascos de vidro hermeticamente fechados (sem proteção contra luz). Os frascos continham uma solução saturada de cloreto de magnésio (MgCl₂) para que fosse estabelecida uma umidade relativa de aproximadamente 34,8%.

Nos períodos de 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias foram coletadas amostras que foram submetidas à extração do encapsulado conforme metodologia descrita no item 3.7.3. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da vitamina encapsulada foi obtido pelas Equações 8 e 9 (RÚBIO *et al.*, 2020).

$$-\ln \frac{C_t}{C_0} = k \cdot t \quad (8)$$

$$t_{1/2} = -\frac{\ln 2}{k} \quad (9)$$

Onde k é a constante de velocidade da reação, C_0 é o conteúdo de vitamina D₃ inicial e C_t é o conteúdo de vitamina no tempo t de reação (dias).

3.10 Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi realizado pelo software SAS (Statistical Analysis System) versão 9.4. Os dados foram analisados estatisticamente ao nível 5% de significância, por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição centesimal da biomassa de levedura

Os resultados da composição centesimal da biomassa de levedura *S. pastorianus*, com e sem o tratamento de plasmólise, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Composição centesimal da biomassa de levedura *S. pastorianus* (em base seca).

Componente (%)	Tratamento	
	Intacta	Plasmolisada
Umidade	4,98 ^a ± 0,61	3,59 ^a ± 0,01
Cinzas	2,54 ^a ± 0,11	2,06 ^b ± 0,02
Proteína bruta	54,65 ^a ± 0,07	22,10 ^b ± 0,0
Extrato etéreo	**	**
Fibras insolúveis	0,31 ^a ± 0,01	0,13 ^b ± 0,01

Média ± desvio padrão, **não foram obtidos teores mensuráveis. Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre amostras ($p > 0,05$).

Verifica-se que a biomassa de levedura utilizada para a realização desse trabalho é boa fonte de proteína e que a aplicação do pré-tratamento da plasmólise resultou em uma diminuição significativa do conteúdo proteico. A redução observada pode ser atribuída à remoção das proteínas hidrossolúveis, uma vez que o processo de plasmólise envolve a desidratação intracelular, levando à extração de componentes solúveis em água, tais como proteínas solúveis em água, ácidos nucleicos, carboidratos e algumas enzimas.

O conteúdo de cinzas da biomassa de levedura plasmolisada também foi estatisticamente menor em relação a intacta (2,06% e 2,54%, respectivamente), fato que pode ser atribuído à remoção de parte dos minerais por lixiviação, durante o processo de plasmólise. De fato, as cinzas são resíduos inorgânicos, compostos principalmente por minerais e sais minerais; como a água é solvente para alguns

desses componentes, pode ter promovido sua remoção durante a plasmólise, o que resultou no valor determinado.

Com relação ao teor de umidade, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

Segundo Mathias *et al.* (2015), a composição da biomassa de levedura cervejeira é bastante variável, sendo influenciada pela fase de fermentação/maturação em que é coletada e pelo número de reutilizações. Os valores de umidade (4,98%) e proteína (54,65%) obtidos neste estudo estão dentro da faixa relatada na literatura para a biomassa de levedura cervejeira, que varia de 34,40% a 54,58% para proteína e de 5,87% a 7,05% para umidade. No entanto, foi observado um valor menor para o teor de cinzas (2,54%) em comparação com a faixa descrita na literatura, que varia de 3,7% a 8,3%. Além disso, não foram encontrados teores mensuráveis de extrato etéreo, enquanto a literatura relata valores de 0,96% a 6,27% para esse componente (PINTO, 2011; COSTA *et al.*, 2012; MATHIAS *et al.*, 2015; MARSON *et al.*, 2019; TAKALLO *et al.*, 2020).

4.2 Cinética de bioissorção

O estudo da cinética de bioissorção desempenha um papel crucial na compreensão dos processos de adsorção. Através do estudo da cinética de bioissorção, podemos determinar a velocidade de adsorção, a taxa de remoção do sorbato de interesse e o tempo necessário para atingir o equilíbrio de adsorção (WANG, CHEN, 2006). A Tabela 5 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos obtidos ao ajustar os dados de bioissorção aos modelos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem para os tratamentos contendo a biomassa de levedura intacta (TLI) e de levedura plasmolisada (TLP).

Tabela 5. Parâmetros cinéticos de adsorção de vitamina D₃ em células de levedura nos modelos pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem.

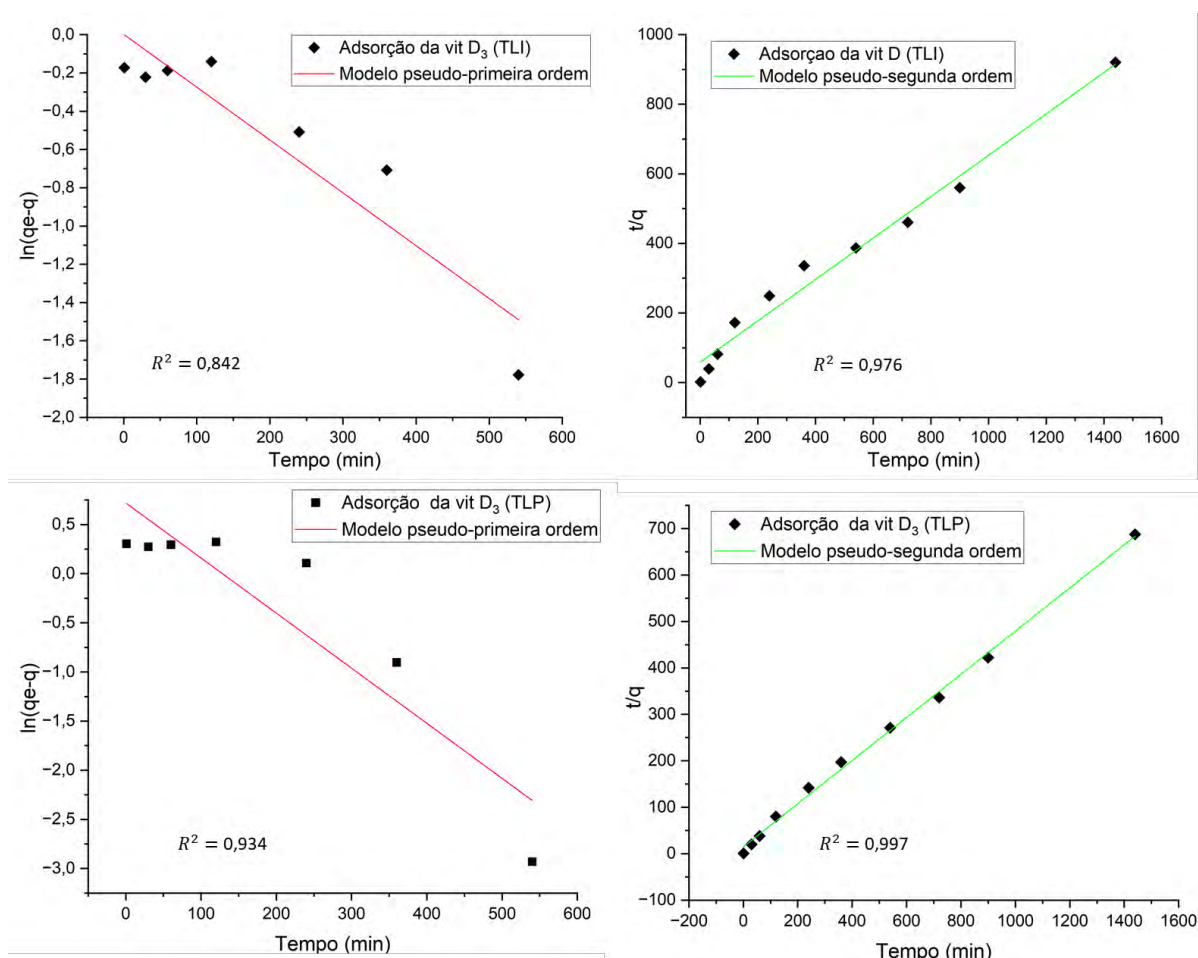
Parâmetros cinéticos	Tratamento	
	Levedura intacta	Levedura plasmolisada
	Pseudo-primeira ordem	
$q_{e \text{ exp}}$ (mg/g)	1,616	2,142
q_e (mg/g)	1,002	0,759
K_1 (/min) $\times 10^3$	2,76	2,71
Coeficiente de determinação	0,842	0,934
Tempo de equilíbrio (min.)	900	720
	Pseudo-segunda ordem	
$q_{e \text{ exp}}$ (mg/g)	1,616	2,142
q_e (mg/g)	1,680	2,152
K_2 (g /mg/min) $\times 10^3$	6,06	14,66
Coeficiente de determinação	0,952	0,997
Tempo de equilíbrio (min.)	900	720

q_e é a capacidade de sorção no equilíbrio, experimental e obtida pelo modelo; K_1 e K_2 são constantes de velocidade dos respectivos modelos.

Para ambos os tratamentos, o modelo de pseudo-segunda ordem foi considerado o mais adequado para descrever a biossorção da vitamina D₃ pelas células de levedura. Isso é evidenciado pelos coeficientes de determinação (R^2) elevados e pela maior proximidade entre a q_e calculada pelo modelo e a $q_{e \text{ exp}}$ obtida experimentalmente. Embora o modelo de pseudo-primeira ordem tenha alcançado valores de coeficientes de determinação razoáveis, não houve coerência entre os valores q_e (calculada pelo modelo e a experimental).

A Figura 8 apresenta os gráficos resultantes dos dados experimentais e dos ajustes dos modelos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem (ambos linearizados) para o estudo em questão.

Figura 8. Dados experimentais e ajustes aos modelos cinéticos pseudo-primeira ordem (esquerda) e pseudo-segunda ordem (direita) da bioadsorção de vitamina D₃ em células de leveduras intactas (TLI) e plasmolisadas (TLP).



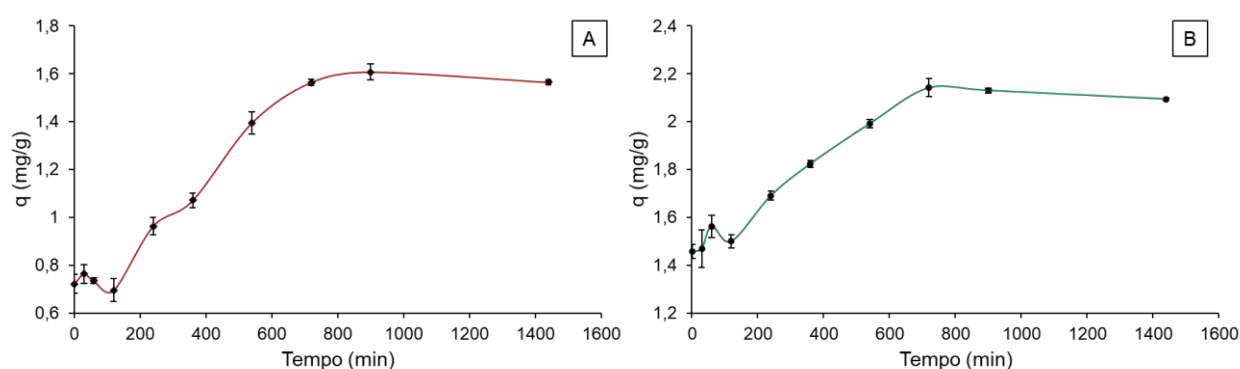
A aplicabilidade do modelo de cinética de pseudo-segunda ordem na bioadsorção da vitamina D₃ pela levedura sugere que o processo de adsorção é influenciado, em grande parte, por interações químicas entre o sorbato (vitamina D₃) e o bioadsorvente (levedura). Segundo Khakpour *et al.* (2014), o modelo de pseudo-segunda ordem considera a ocorrência de duas reações durante o processo de bioadsorção. A primeira reação é rápida e atinge o equilíbrio de forma rápida, enquanto a segunda reação é mais lenta e ocorre ao longo de um período prolongado. Essas reações podem ocorrer tanto em série quanto em paralelo, dependendo das condições específicas do sistema.

Nos testes cinéticos realizados, observou-se um comportamento distinto na bioadsorção da vitamina D₃ pelas células de levedura intactas em comparação com as células de levedura plasmolisadas. Para as células de levedura intactas, o teor de

vitamina D₃ bioissorvida aumentou gradualmente ao longo do tempo, até atingir um estado de equilíbrio. No entanto, para as células de levedura plasmolisadas, houve um aumento mais rápido na bioissorção da vitamina D₃ nos primeiros 30 minutos, seguido de um aumento proporcional ao tempo (vide Figura 9). Esse comportamento sugere que o tratamento de plasmólise teve um impacto positivo na capacidade de adsorção da vitamina D₃ pelas células de levedura. A plasmólise, ao remover o conteúdo celular da levedura, contribuiu para aumentar a porosidade da parede celular, o que, por sua vez, pode ter aumentado a disponibilidade de sítios ativos para a sorção da vitamina D₃. Esse aumento na porosidade da parede celular pode ter facilitado a penetração da vitamina D₃ no interior da célula de levedura, resultando em uma capacidade de sorção maior para as células plasmolisadas (2,14 mg/g) em comparação com as células intactas (1,61 mg/g).

O uso de pré-tratamentos na levedura é relatado na literatura como um fator benéfico no aumento da capacidade de sorção de diversos compostos, como, aromas, óleos, compostos fenólicos e vitaminas (NORMAND *et al.*, 2005; KAVOSI *et al.*, 2017; RÚBIO *et al.*, 2018; DADKHODAZADE *et al.*, 2018; KARAMAN, 2020; DIMOPOULOS *et al.*, 2021).

Figura 9. Capacidade de sorção obtida experimentalmente durante a bioissorção de vitamina D₃ por células de levedura: (A) intactas e (B) plasmolisadas.



Os tempos de equilíbrio alcançados neste estudo foram de 12 e 15 horas, para os tratamentos TLP e TLI, respectivamente. Kurek *et al.* (2023) encontraram um tempo de equilíbrio de 6 horas ao estudar a bioissorção de antocianinas de *chokeberry* utilizando *S. pastorianus*. Rúbio *et al.* (2018) alcançaram o mesmo tempo de equilíbrio

ao investigar a bioadsorção de compostos fenólicos do bagaço de uva em *S. cerevisiae*. Jilani *et al.* (2015) e Jilani *et al.* (2016) obtiveram tempos de equilíbrio de 3 horas em seus estudos, ao analisar a bioadsorção de compostos fenólicos de chá preto e verde e folhas de oliveira em *S. cerevisiae*, respectivamente. Um tempo de equilíbrio mais longo pode sugerir a existência de mecanismos complexos de adsorção, como processos de difusão em várias etapas ou competição entre diferentes espécies no meio de adsorção. Concordando com Rúbio *et al.* (2018), que relatam que em tempos mais longos, a bioadsorção segue um processo que envolve a migração dos compostos da solução para a camada limite, a difusão através da superfície da biomassa de levedura na camada limite, a difusão intrapartícula nos poros da biomassa e a adsorção dos compostos nos sítios ativos dentro e fora da célula.

4.3 Eficiência de encapsulação e retenção

A Tabela 6 apresenta os dados da eficiência e retenção da vitamina nas células de levedura intactas e plasmolisadas após passarem pela secagem por atomização.

Tabela 6. Eficiência (EE) e retenção de vitamina D₃ nas células de levedura intactas e plasmolisadas.

Tratamento	EE (%)	Retenção (%)
Levedura íntegra	44,89 ^b ± 0,63	40,89
Levedura plasmolisada	80,83 ^a ± 0,26	53,19

*Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre tratamentos ($p > 0,05$).

A eficiência de encapsulamento da vitamina D₃ variou de 44,89% a 80,83% entre os tratamentos. Notoriamente, as células de levedura intactas apresentaram uma menor eficiência de encapsulamento, o que pode ser atribuído ao seu menor

espaço intracelular disponível para acomodar a vitamina D₃ durante o processo de encapsulamento.

Os resultados obtidos neste estudo estão em consonância com os apresentados por Dadkhodazade *et al.* (2018), que encapsularam vitamina D₃ em células de levedura *S. cerevisiae* plasmolisadas e não plasmolisadas. Eles observaram que a plasmólise aumentou significativamente a eficiência de encapsulamento de 31,2% para 76,1%. Além disso, outras pesquisas relataram resultados semelhantes ao investigar substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas carregadas em células de levedura. Por exemplo, Kavosi *et al.* (2017) constataram um aumento na eficiência de encapsulamento do óleo da semente de beldroega de 52,9% para 60,3% ao aplicar o pré-tratamento de plasmólise. Da mesma forma, Shi *et al.* (2007) e Kurek *et al.* (2023) observaram um aumento na eficiência de encapsulamento do ácido clorogênico (6,2% para 12,6%) e antocianinas (15,6% para 53,9%), respectivamente. Tais resultados sugerem que a plasmólise seja uma estratégia eficaz para aumentar a eficiência de encapsulamento de substâncias em células de levedura.

A retenção da vitamina D₃ nas células de levedura plasmolisadas também foi maior em comparação com as células intactas. Esse resultado sugere que a levedura plasmolisada ofereceu uma maior proteção à vitamina D₃ durante a etapa de atomização a 120°C. É possível que, na levedura plasmolisada, a vitamina tenha ficado em sua maioria retida no interior da célula, enquanto que nas células intactas, a vitamina pode ter aderido mais à superfície, o que pode ter levado a uma maior degradação durante o processo de secagem. Ainda, os valores de retenção obtidos sugerem que o processo e/ou as condições de secagem empregados talvez não tenha sido os mais eficazes para a desidratação de biomassa de levedura carregada com vitamina D₃. É possível que condições operacionais e/ou técnicas de secagem que empreguem condições mais brandas de processo resultem em maiores valores de retenção.

4.4 Caracterização das biomassas de leveduras quanto a umidade, A_w e potencial zeta (ζ)

A Tabela 7 apresenta os dados da umidade, atividade de água e potencial ζ das biomassas de leveduras. Tanto as biomassas carregadas com vitamina, quanto os seus respectivos controles foram analisados.

Tabela 7. Umidade, atividade de água e potencial ζ das partículas obtidas via *spray-drying*.

Tratamento*	Umidade (%)	A_w	Potencial ζ (mV)
CTLI	6,75 ^b ± 0,11	0,43 ^a ± 0,01	-12,0 ^b ± 0,57
CTLP	6,89 ^b ± 0,09	0,44 ^a ± 0,01	-18,2 ^a ± 0,67
TLI	8,39 ^a ± 0,81	0,45 ^a ± 0,02	-12,8 ^b ± 0,17
TLP	8,58 ^a ± 2,23	0,46 ^a ± 0,03	-19,4 ^a ± 0,55

*CLTI: controle biomassa de levedura intacta; CTLP: controle biomassa de levedura plasmolisada; TLI: biomassa de levedura intacta carregada de vitamina; TLP: biomassa de levedura plasmolisada carregada de vitamina.

**Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre tratamentos ($p > 0,05$).

A umidade e a atividade de água são parâmetros fundamentais na caracterização e conservação dos alimentos e ingredientes alimentícios. A umidade refere-se ao conteúdo total de água presente no alimento, enquanto a atividade de água indica o teor de água livre ou a disponibilidade dessa água para atuar em reações de deterioração, enzimáticas e microbiológicas.

O teor de umidade variou de 6,75% a 6,89% nas amostras de levedura controle (CTLI e CTLP) e de 8,39% a 8,58% nas leveduras carregadas com vitamina (TLI e TLP). Tais valores são esperados para pós obtidos por *spray-drying* e estão similares aos resultados relatados por Sultana *et al.* (2017) e Rúbio *et al.* (2020), que observaram uma faixa de umidade de 5,1% a 9,2% ao utilizar leveduras *S. cerevisiae* para encapsulação de aromas e pigmentos, respectivamente. Em geral, é desejável manter baixos teores de umidade em pós, uma vez que o aumento da umidade pode

resultar na aglomeração das micropartículas do pó, formação de grumos e até o processo de *caking*, comprometendo a estrutura do pó, bem como a estabilidade do composto encapsulado.

A atividade de água variou de 0,43 a 0,46, não apresentando variação estatisticamente significativa entre os tratamentos. Valores de atividade de água abaixo de 0,6 estão dentro do limite recomendado para garantir a estabilidade microbiológica adequada dos pós e sua capacidade de armazenamento prolongado, desde que sejam mantidas condições adequadas de embalagem e armazenamento (DA ROSA *et al.*, 2019).

Por sua vez, para caracterizar a estabilidade das micropartículas obtidas, o potencial ζ das suspensões foi medido (Tabela 7). O potencial ζ , também chamado de potencial eletrocinético, é uma medida das cargas na superfície de partículas dispersas em um meio líquido. Seu valor reflete na intensidade da atração ou repulsão eletrostática entre as partículas, desempenhando um papel crucial na determinação da estabilidade das partículas em suspensão (ROGOWSKA *et al.*, 2018; MENDES *et al.*, 2021).

Os valores de potencial ζ obtidos para biomassa de levedura intacta (-12 e $-12,8$ mV para CTLI e TLI, respectivamente) estão próximos aos relatados na literatura, que variam entre -5 a -12 mV (BOWEN *et al.*, 1994; SCHWEGMANN *et al.*, 2010).

De modo geral, a incorporação da vitamina D₃ não influenciou significativamente nos valores de potencial ζ , uma vez que os valores obtidos para as biomassas carregadas foram similares aos dos seus respectivos controles, variando de -12 a $-12,8$ mV para as biomassas intactas (CTLI e TLI) e de -18 a $-19,4$ mV para as plasmolisadas (CTLP e TLP), respectivamente.

Por outro lado, os valores consideravelmente superiores obtidos para os tratamentos onde a plasmólise foi empregada (CTLP e TLP), indicam que esse processo causou alterações nas cargas superficiais das células, ocasionando o aumento da sua eletronegatividade; este fato está associado às mudanças na parede celular da levedura decorrentes da plasmólise, que devem ter resultado na exposição de grupamentos eletronegativos, como possivelmente a desnaturação de proteínas, com decorrente exposição de resíduos de aminoácidos carregados negativamente. De fato, Wang *et al.* (2022) reportaram que valores de potencial ζ mais negativos estão relacionados a danos na parede celular da levedura. A composição da parede celular

inclui manoproteínas, β -(1,6)-glucana, β -(1,3)-glucana e grupos fosfóricos (MENDES *et al.*, 2021). Ainda, a plasmólise foi realizada utilizando NaCl, um composto químico que possui cargas capazes de influenciar a eletronegatividade da superfície celular.

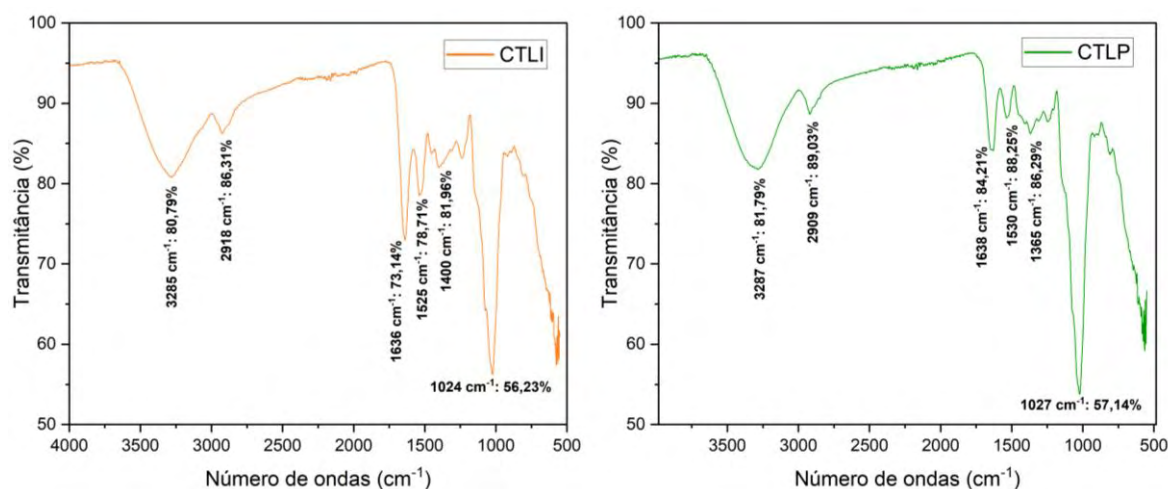
Segundo Rogowska *et al.* (2018), um valor de potencial ζ igual ou superior a ± 20 mV é indicativo de estabilidade na dispersão do sistema. Dessa forma, é possível inferir que a utilização da plasmólise favoreceu a estabilidade, contribuindo para repulsão eletrostática entre as células de leveduras em suspensão.

4.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia FT-IR é conhecida como a “técnica analítica de impressão digital” para a identificação estrutural de compostos, fornecendo informações valiosas sobre a estrutura química e composição molecular de substâncias. Essa técnica envolve a absorção de radiação infravermelha pelas amostras, resultando em um espectro que reflete as vibrações moleculares características das ligações químicas presentes. Essas vibrações incluem os modos de alongamento, flexão e torção das ligações químicas, sendo que cada substância possui um espectro FT-IR único devido às suas propriedades moleculares distintas (DURAZZO *et al.*, 2018; VALAND *et al.*, 2020).

A técnica de FT-IR foi empregada para investigar se a plasmólise causou alterações estruturais na composição da levedura e se a interação da vitamina D₃ com as células de levedura resultou em mudanças na intensidade das bandas de absorção e nas características espectrais. A Figura 10 exhibe os espectros de absorção das células de levedura não carregadas (intactas e plasmolisadas).

Figura 10. Espectros de FT-IR das células de levedura controle: intactas (CTLI) e plasmolisadas (CTLP).



Observa-se uma banda larga entre 3650-3000 cm^{-1} , indicativa da existência de grupos hidroxila ($-\text{OH}$), amina ($-\text{NH}$) e hidrocarbonetos (C-H), que estão presentes nas proteínas e na β -glucana. A região 2980-2750 cm^{-1} está associada a presença dos grupos que compõem a estrutura lipídica das células de levedura, como ácidos carboxílicos, grupos metil, presença de ligações duplas ou triplas. Não foram observadas mudanças de intensidade significativas entre os tratamentos CTLI e CTLP nessas regiões; possivelmente, a plasmólise não acarretou em alterações expressivas dos grupos presentes nas estruturas celulares.

Os efeitos da plasmólise se mostraram mais evidentes nos picos de absorção na faixa de 1630-1360 cm^{-1} . Essa região é caracterizada pelas bandas amida I e amida II de proteínas e peptídeos (GALICHET *et al.*, 2001). O tratamento CTLP demonstrou uma frequência de vibração mais baixa nessa faixa de absorção em comparação com o tratamento CTLI, indicando possíveis alterações estruturais das proteínas devido à plasmólise. Esses resultados estão em concordância com os estudos de Burattini *et al.* (2008) e Salari *et al.* (2013), que constataram por meio de espectros FT-IR que a plasmólise causa desorganização na membrana plasmática das células, resultando na desnaturação de proteínas tanto na membrana quanto na parede celular da levedura.

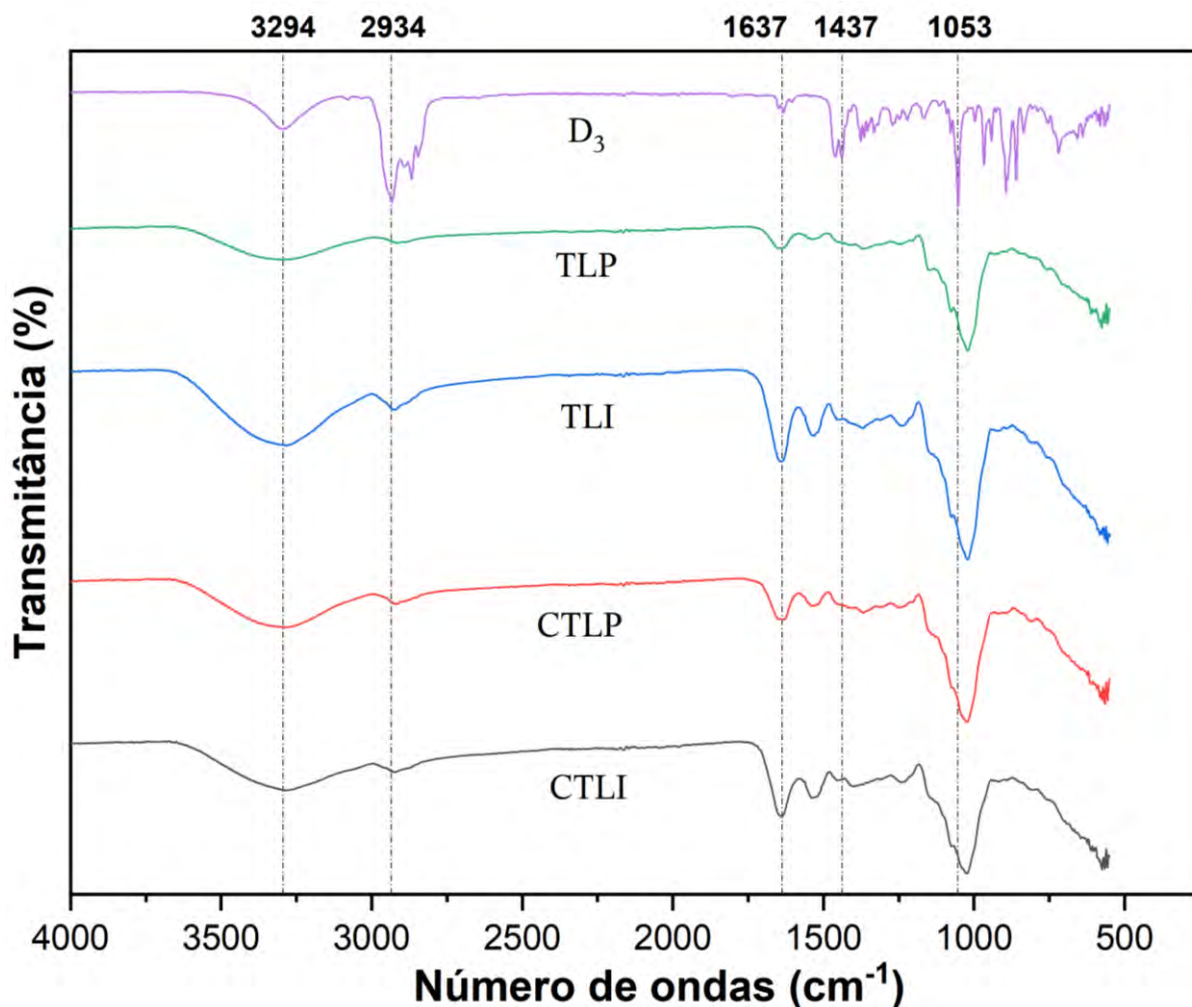
A Figura 11 ilustra os espectros da vitamina D_3 , células de levedura controle e das biomassas carregadas com vitamina. Nota-se que a região 4000-1440 cm^{-1} do espectro das biomassas (TLI e TLP) foi quase uma sobreposição dos espectros da

vitamina D₃ e das células de levedura controle (CTLI e CTLP). No espectro de absorção de colecalciferol as bandas foram identificadas em 3294 cm⁻¹ e 2934 cm⁻¹, correspondentes às vibrações de estiramento O-H e C-H, respectivamente. Além disso, foram observadas bandas em 1637 cm⁻¹ e 1437 cm⁻¹, associadas às vibrações de estiramento C=C, e em 1053 cm⁻¹, relacionadas às vibrações de dobramento C-C.

Quando comparados os espectros da vitamina D₃ com os tratamentos TLI e TLP, observa-se que nas bandas de absorção características da vitamina, curiosamente, o tratamento TLI alcançou maiores intensidades de absorção. Fato interessante, uma vez que na quantificação da vitamina via CLAE, esse foi o tratamento que reteve as menores concentrações de vitamina. Contudo, segundo Galichet *et al.* (2001) o feixe infra vermelho do espectrômetro (FT-IR) penetra apenas cerca de 3 µm na célula de levedura, dando assim uma boa indicação da composição de sua parede celular. Considerado esse fato, supõe-se que a vitamina D₃ obteve uma melhor afinidade pela parede celular da levedura intacta (TLI), observada principalmente nas bandas de absorção na faixa de 3294 cm⁻¹ e 2934 cm⁻¹; por se tratar de uma área referente a composição lipídica da levedura, é possível que a vitamina tenha interagido com os lipídeos da membrana celular da levedura, uma vez que se trata de uma substância apolar. Observação semelhante foi encontrada por Dadkhodazade *et al.* (2018) que utilizou a *S. cerevisiae* como micro veículo para encapsulação de colecalciferol.

Ainda, no caso do tratamento TLP, em virtude de a plasmólise ter possivelmente esvaziado parte do conteúdo celular da levedura, a vitamina pode ter adentrado melhor na célula de levedura, se ligado a organelas intracelulares o que reduziu o tamanho das bandas nas faixas de 3294 cm⁻¹ e 2934 cm⁻¹. Essa observação é evidenciada pela maior eficiência de encapsulamento da levedura plasmolisada em comparação ao tratamento não plasmolisado.

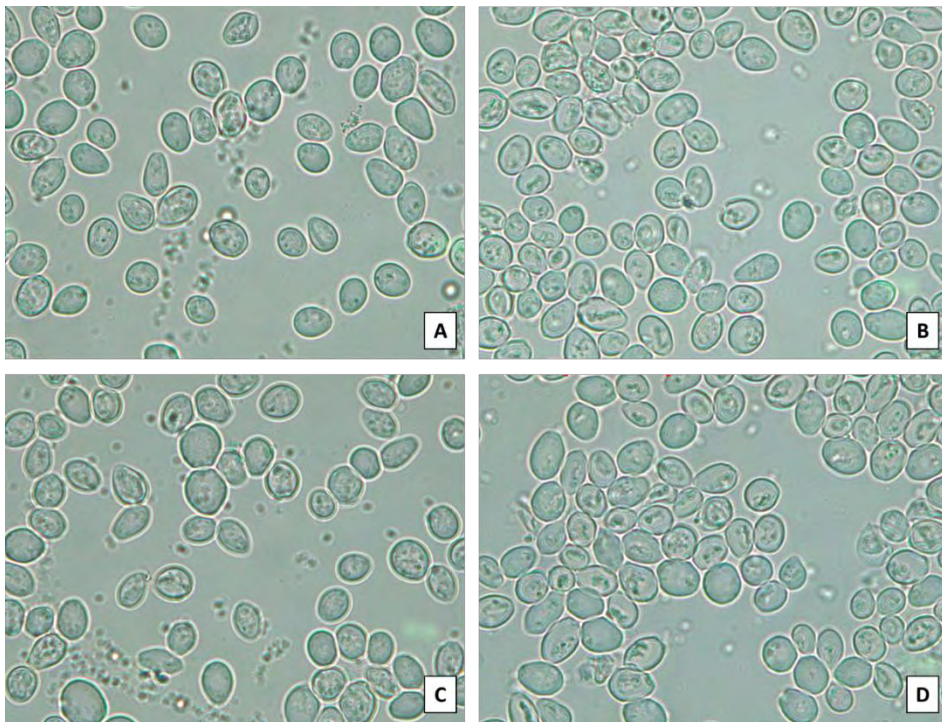
Figura 11. Espectros de FT-IR, de colecalciferol (D_3), células plasmolisadas carregadas de colecalciferol (TLP), células intactas carregadas de colecalciferol (TLI), células plasmolisadas não carregadas (CTLP) e células intactas não carregadas (CTLI).



4.6 Morfologia das micropartículas

As microscopias ótica (com objetiva de imersão 100x) e a eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas para verificar possíveis alterações na superfície e morfologia das células de levedura antes e após o carregamento da vitamina D_3 . A Figura 12 (A, B, C e D) exibe as imagens obtidas por microscopia ótica (objetiva de imersão de 100x) das células de levedura intactas e plasmolisadas, antes e após o processo de carregamento da vitamina D_3 .

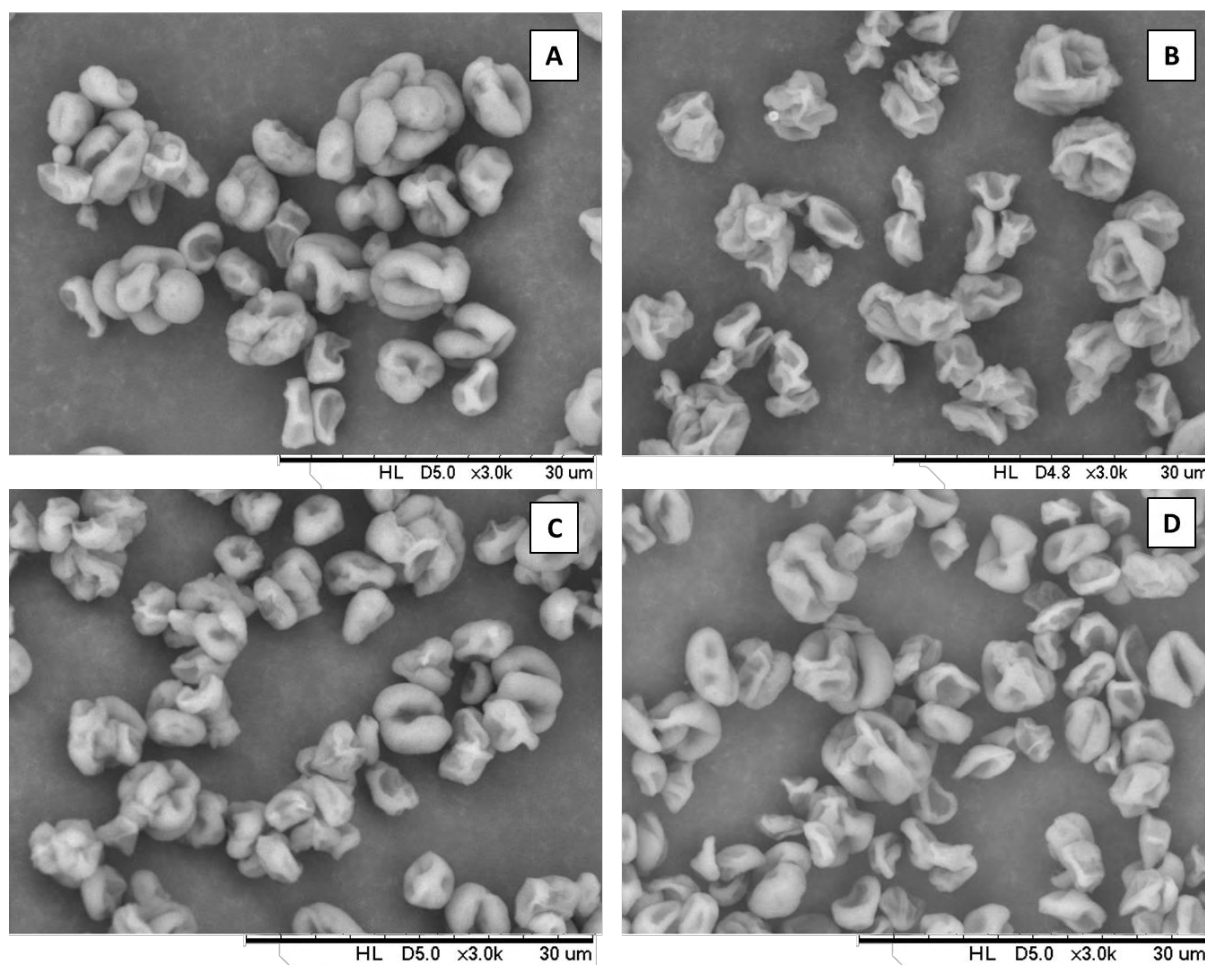
Figura 12. Microscopia ótica (100x) das células de *S. pastorianus* intactas (A), plasmolisadas (B), intactas carregadas de colecalciferol (C), plasmolisadas carregadas de colecalciferol (D).



As células de levedura carregadas ou não com vitaminas, de ambos os tratamentos, exibiram o formato elíptico característico, sendo que por meio da microscopia ótica, não foram notadas alterações que a plasmólise causou às células, talvez pelo fato delas terem sido reidratadas para essa análise. No entanto, ao examinar as células carregadas com vitamina em comparação com as células de controle, notou-se uma predominância de células com aspecto levemente túrgido e uma forma mais arredondada. Um possível indício que a incorporação da vitamina na célula de levedura pode ter influenciado sua morfologia, resultando em células com aspecto mais inchado e forma alterada.

A Figura 13 (A, B, C e D) apresenta as micrografias das células de levedura intactas e plasmolisadas, antes e após o carregamento com a vitamina D₃, respectivamente.

Figura 13. Micrografia eletrônica de varredura das células intactas (A), plasmolisadas (B), intactas carregadas de colecalciferol (C), plasmolisadas carregadas de colecalciferol (D).



Todas as células de leveduras exibiram concavidades e encolhimento, que podem ser atribuídos ao processo de secagem por atomização. Segundo Fávaro-Trindade *et al.* (2010), a secagem por *spray dryer* pode resultar em micropartículas com superfícies mais irregulares e encolhidas devido à rápida evaporação da fase líquida durante o processo, o que resulta em uma superfície côncava.

Aparentemente, as células que foram plasmolisadas ficaram ligeiramente mais encolhidas, fenômeno que se esperava ser até mais evidente, em razão do processo de plasmólise ter promovido redução do teor proteico celular (Tabela 4).

Também se observou menor quantidade de aglomerados nas amostras que passaram pelo tratamento de plasmólise, o que pode ser atribuído ao fato dessas

células estarem mais negativamente carregadas (Tabela 7), logo com maior repulsão entre elas.

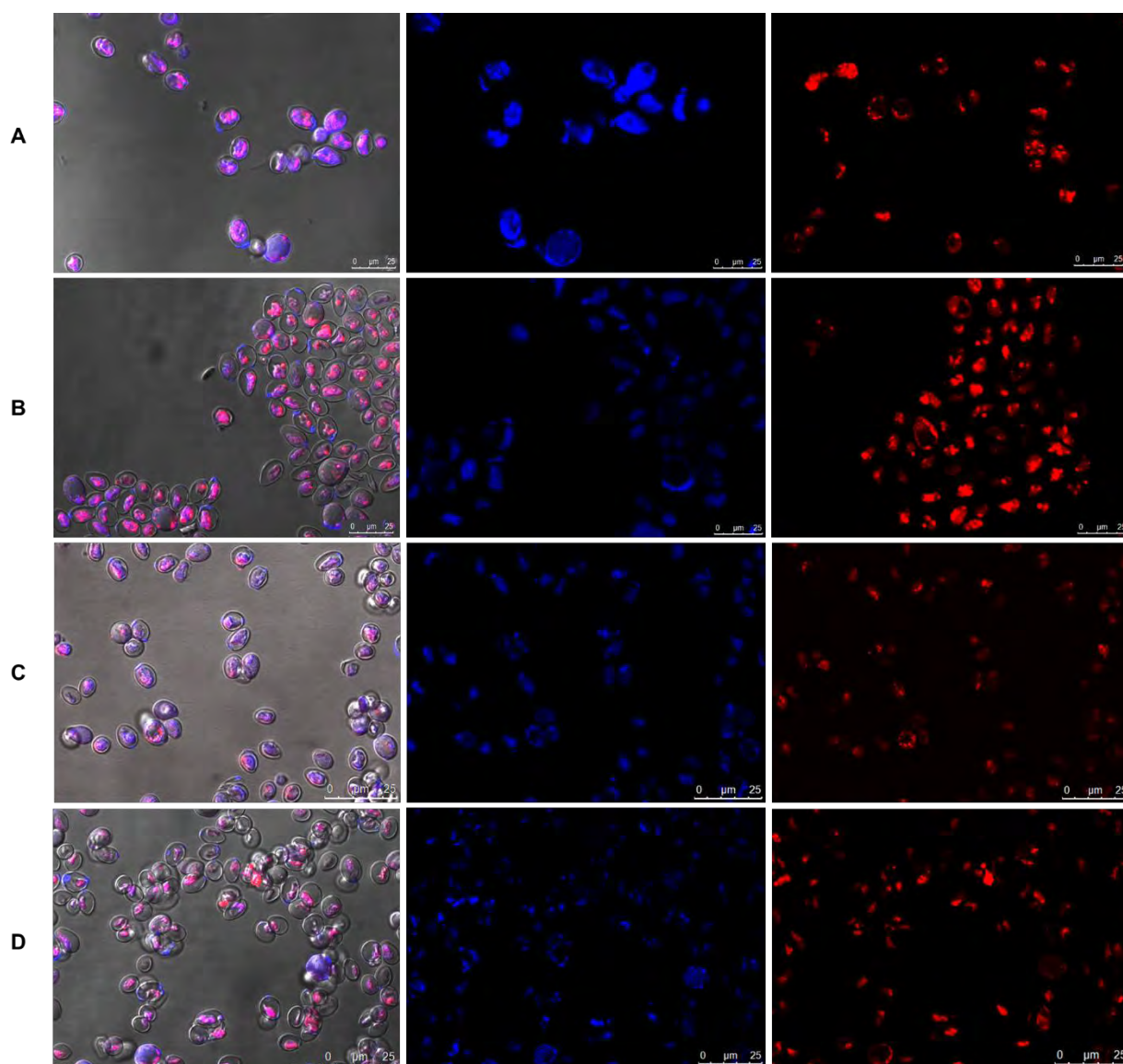
Imagens morfológicas semelhantes para células de levedura plasmolisadas também foram relatadas por Karaman (2021) e Kurek *et al.* (2023). Essas alterações na morfologia são causadas pela perda de água e pela contração da célula devido à remoção do solvente hipertônico, resultando no aspecto enrugado e murcho da célula.

Na análise das micrografias das células de levedura carregadas com vitamina D₃, observou-se que as células intactas carregadas não exibiram alterações morfológicas tão evidentes em comparação com as células intactas não carregadas. Por outro lado, nas células plasmolisadas carregadas, notou-se uma aparência mais preenchida em relação às células plasmolisadas não carregadas. Essa observação sugere que a presença da carga de vitamina no interior da estrutura celular pode ser responsável por esse efeito. Importante destacar que não foram visualizados cristais de vitamina na superfície das células em ambos os tratamentos, indicando a solubilização do colecalciferol na matriz de revestimento. Essa constatação está em concordância com os resultados de Dadkhodazade *et al.* (2018), que também observaram a distribuição amorfa da vitamina na célula.

4.6.1 Microscopia confocal

Todas as amostras foram submetidas à análise por meio da técnica de microscopia confocal de varredura a laser visando a investigação da morfologia, organização interna e distribuição de componentes nas células de levedura. As imagens resultantes dessa análise estão apresentadas na Figura 14.

Figura 14. Imagens do microscópio confocal de varredura a laser da *S. pastorianus*: células intactas (A), células plasmolisadas (B), células intactas carregadas de colecalciferol (C), células plasmolisadas carregadas de colecalciferol (D). Na primeira coluna há micrografias nas quais as manifestações das cores induzidas pelos corantes calcofluor e vermelho Nilo são visíveis em um background que não evidencia um corante específico; na coluna central há um contraste que enfatiza o tom azul característico do corante calcofluor; na coluna a direita, a predominância da cor vermelha típica do corante vermelho Nilo é evidenciada.



No que diz respeito à morfologia externa, as células dos diferentes tratamentos mantiveram um formato oval e exibiram um certo grau de aglomeração das organelas celulares. As células plasmolisadas apresentaram um maior encolhimento, resultando em um aumento do espaço intracelular, devido à desidratação osmótica induzida pela

plasmólise. Esse comportamento é esperado e está de acordo com estudos anteriores realizados por Kavosi *et al.* (2017), Dadkhodazade *et al.* (2018), Karaman (2021), Kurek *et al.* (2023) que aplicaram a plasmólise como pré-tratamento nas células de levedura utilizada para encapsulação de bioativos.

O calcofluor é responsável pela coloração de β -1,6-glucanos e quitina, principais componentes da parede celular da levedura, enquanto o corante vermelho Nilo cora em contato com componentes hidrofóbicos (RÚBIO *et al.*, 2020). Sob excitação com calcofluor, as células de levedura exibiram fluorescência na tonalidade azul. Notoriamente, as células de levedura intactas exibiram uma intensidade de coloração azul mais pronunciada, indicando uma parede celular visivelmente melhor definida. Em contraste, as células de levedura plasmolisadas apresentaram uma menor intensidade de fluorescência, acompanhada por um aspecto mais fragmentado. Esses resultados sugerem que a plasmólise foi efetiva em modificar a estrutura da parede celular da levedura, resultando em menor fluorescência.

Durante a excitação com o corante vermelho Nilo, foram observadas estruturas vermelhas que provavelmente correspondem a corpos lipídicos, a exemplo de organelas intracelulares. Essas estruturas foram identificadas tanto nas células de levedura intactas quanto nas plasmolisadas. Nas células de levedura intactas, a coloração vermelha aparece de forma mais dispersa e concentrada principalmente na região da parede celular. Já nas células plasmolisadas, a coloração vermelha apresentou uma maior intensidade. Essas diferenças na distribuição e intensidade da coloração vermelha entre as células intactas e plasmolisadas estão associadas à desorganização da membrana plasmática ocasionada pela plasmólise, o que pode ter levando a uma concentração dos componentes lipídicos e possivelmente a uma maior associação entre esses componentes e as estruturas celulares. De acordo Paramera, Konteles e Karathanos (2011) a perda de água ocasionada pela plasmólise, força a aproximação de fosfolipídios, levando a um aumento das interações de Van der Waals entre as cadeias de ácidos graxos na estrutura da levedura.

As amostras de levedura carregadas com vitamina D₃ mostraram semelhanças nas observações em comparação às não carregadas. As células intactas carregadas apresentaram maior fluorescência com o corante calcofluor, indicando uma maior presença de componentes da parede celular, como β -glucanas e quitina. Por outro lado, nas células plasmolisadas carregadas, a maior intensidade de coloração foi observada com o corante vermelho Nilo, sugerindo uma possível interação entre a

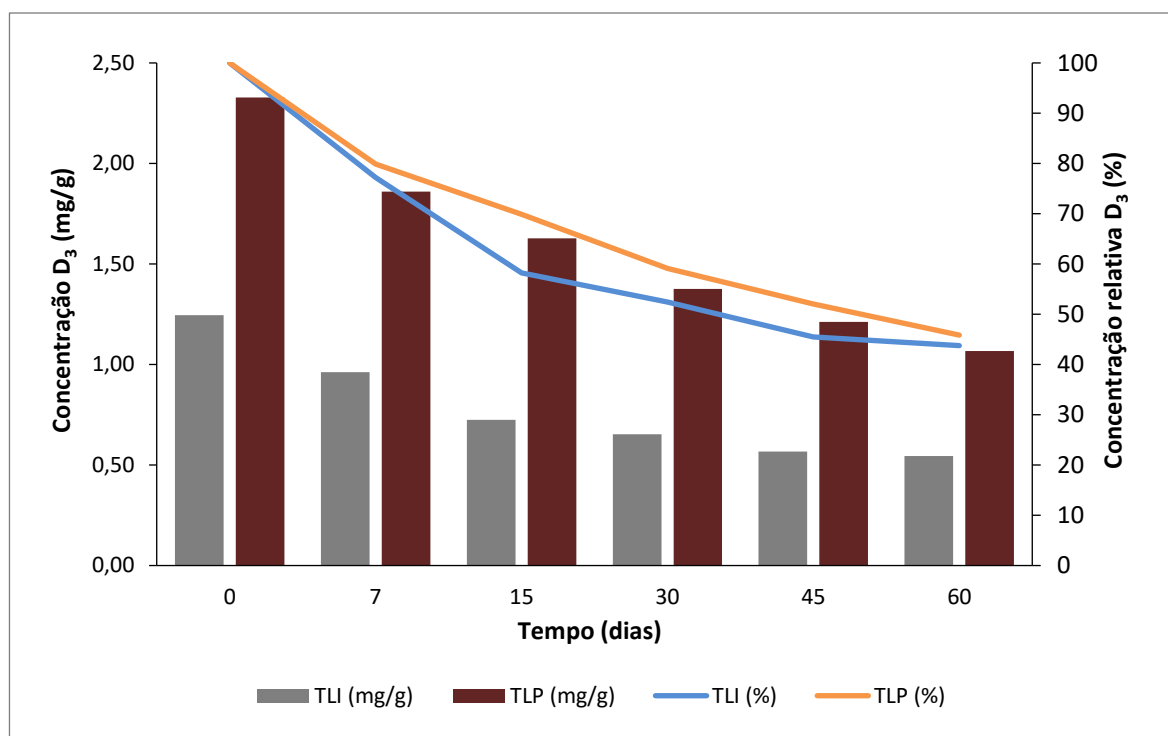
vitamina D₃ e os corpos lipídicos das células; uma vez que, compostos lipofílicos têm a capacidade de se dissolver nas bicamadas lipídicas das células de levedura, e assim serem transportados para o espaço citoplasmático (KAVOSI *et al.*, 2017). Nas células intactas, a distribuição da coloração vermelha foi menos intensa, enquanto nas células plasmolisadas, houve uma distribuição maior e com pontos de intensidade espalhados na célula. Essas diferenças indicam que a plasmólise desencadeou alterações na organização celular, possivelmente aumentando a capacidade da célula de reter a vitamina D₃ promovendo a redistribuição dos componentes lipídicos em resposta à presença dessa vitamina.

4.7 Estabilidade da vitamina D₃ impregnada

Os pós obtidos pela atomização e contendo as leveduras intactas e plasmolisadas carregadas com vitamina D₃ foram armazenados a temperatura de ± 25 °C em atmosfera com oxigênio e periodicamente se determinou o teor dessa vitamina com intuito de avaliar sua estabilidade. Os dados de estabilidade estão representados na Figura 15.

Durante o período de 60 dias de armazenamento, em ambos os tratamentos, foi observada uma diminuição gradual na retenção da vitamina D₃. A concentração da vitamina D₃ variou de 2,3 a 1,1 mg/g na biomassa de levedura plasmolisada e de 1,3 a 0,5 mg/g na biomassa de levedura intacta. Essa redução pode ser atribuída à degradação da vitamina que possivelmente estava livre ou adsorvida na superfície das células, portanto bastante susceptível a degradação, e também a porosidade da membrana celular da levedura, que permitiria trocas com ambiente externo. Embora tenha ocorrido uma redução significativa da concentração de vitamina na levedura, o conteúdo remanescente após o período de armazenagem ainda representa uma quantidade acima da ingestão diária recomendada (10-20 µg/dia).

Figura 15. Estabilidade da vitamina D₃ impregnada em células de leveduras intactas (TLI) e plasmolisadas (TLP) armazenadas por 60 dias, expressa em mg de vitamina por grama de levedura e em % de retenção.



A estabilidade da vitamina D₃ está sujeita a fatores como temperatura, exposição ao oxigênio e à luz. De acordo com Nareswara *et al.* (2020), vitaminas lipofílicas podem se degradar completamente em até duas semanas de armazenamento. Em estudos de Abbasi *et al.* (2014) e Nareswara *et al.* (2020), realizados ao longo de sete dias de armazenamento, foram obtidos valores de retenção de vitamina D₃ na faixa de 16% a 34%. No entanto, esses estudos utilizaram matrizes diferentes, proteína do soro de leite e α -lactalbumina, respectivamente.

Em um estudo realizado por Paucar *et al.* (2016), a vitamina D₃ foi encapsulada pela técnica de *spray-chilling* em diferentes matrizes lipídicas, resultando em valores de retenção variando entre 68% e 86% após 65 dias de armazenamento. Maiores valores de retenção estão associados à proteção estabelecida pelo material de parede no decorrer da armazenagem.

No presente estudo, após 60 dias de armazenamento, 43,73% e 45,85% da vitamina permaneceu retida nas células de levedura intactas e plasmolisadas, resultando em tempos de meia-vida de 50,32 e 53,33 dias, respectivamente. No entanto, é importante ressaltar que embora ocorra degradação, o efeito protetor da

levedura sobre a vitamina não pode ser descartado. A incorporação da vitamina D₃ na célula de levedura ainda confere um significativo efeito de proteção a vitamina em comparação a outros materiais de revestimento.

Portanto, mesmo com a perda gradual da vitamina D₃ ao longo do período de estocagem, a biossorção em células de leveduras de descarte da indústria cervejeira, seguida da atomização, ainda apresenta vantagens em termos de estabilidade e proteção do composto encapsulado.

5 CONCLUSÕES

O uso da plasmólise como pré-tratamento na biomassa de levedura de descarte de cervejaria proporcionou uma melhora significativa na eficiência de encapsulamento da vitamina D₃. Além disso, o rendimento do encapsulamento e a capacidade de sorção também foram maiores para o tratamento da levedura plasmolisada em comparação com o da levedura intacta.

A presença da vitamina D₃ nos pós constituídos pelas células de levedura foi confirmada por meio de análises cromatográficas, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e microscopia confocal, embora não tenha sido possível estabelecer exatamente onde a vitamina estava localizada na célula, se no seu interior, na superfície ou em ambos.

Considerando a instabilidade da vitamina D₃, o uso da biomassa de descarte de *Saccharomyces pastorianus* tratada com plasmólise como agente encapsulante, o processo de biossorção seguido da secagem por atomização propiciou proteção efetiva e uma boa retenção da vitamina ao longo de um período de 60 dias de armazenamento.

Para trabalhos futuros, sugere-se a realização de estudos mais aprofundados para investigar a porosidade e, principalmente a permeabilidade das paredes celulares de levedura de forma abrangente, a fim de compreender o mecanismo de liberação da vitamina D₃ retida nas microcápsulas de levedura. Além disso, seria interessante realizar ensaios que avaliem o tamanho médio das células, para confirmar o encolhimento promovido pela plasmólise, bem como estudos que avaliem outras técnicas mais brandas de secagem, visando preservar maior conteúdo da vitamina. Ainda, estudos a fim de determinar a biodisponibilidade e a bioacessibilidade da vitamina encapsulada, visando prever sua capacidade de ser absorvida pelo organismo. Essas investigações ajudariam a fornecer uma compreensão mais completa dos processos envolvidos na entrega da vitamina encapsulada, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de formulação mais eficazes e direcionadas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S. et al. Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends—A Review. **Food Reviews International**, v. 2, p.343-374, 2012.
- ABBASI, A. et al. Stability of vitamin D3 encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate. **Food chemistry**, v. 143, p. 379-383, 2014.
- ADAMS, J. S; HEWISON, M. Update in Vitamin D. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, p. 471-478, 2010.
- AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 997-1026, 2005.
- AMREIN, K. et al. Vitamin D deficiency 2.0: an update on the current status worldwide. **Eur J Clin Nutr.**, v. 74, p. 1498-1513, 2020.
- ARGANO, C. et al. An Overview of Systematic Reviews of the Role of Vitamin D on Inflammation in Patients with Diabetes and the Potentiality of Its Application on Diabetic Patients with COVID-19. **International journal of molecular sciences**, v. 23, 2022.
- AUGUSTIN, M.A., SANGUANSRI, L. Encapsulation of Bioactives. In: **Food Materials Science**. Springer, 2008. New York, NY, p. 577-601.
- BAE, J. H. et al. Association of vitamin D status with COVID-19 and its severity: Vitamin D and COVID-19: a narrative review. **Rev. Endocr Metab Disord.**, p. 1-21, 2022.
- BALLESTEROS, L. F. et al. Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. **Food Chemistry**, v. 237, p. 623-631, 2017.
- BALLARD, J. M. et al. Degradation of vitamin D3 in a stressed formulation: The identification of esters of vitamin D3 formed by a transesterification with triglycerides **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 142 – 150, 2007.
- BASIŃSKA-LEWANDOWSKA, M. et al. Frequency of COVID-19 Infection as a Function of Vitamin D Levels. **Nutrients**, v. 15, 2023.
- BASTOS, R. et al. Modifications of *Saccharomyces pastorianus* cell wall polysaccharides with brewing process. **Carbohydrate polymers**, v. 124, p. 322-330, 2015.
- BENDIK, I. et al. Vitamin D: a critical and essential micronutrient for human health. **Front Physiol**, v.5, 2014.
- BENITO, Á.; CALDERÓN, F.; BENITO, S. Mixed alcoholic fermentation of *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* and its influence on mannose-containing polysaccharides wine composition. **AMB Express**, v. 9, p 1-8 2019.
- BISHOP, E. L. et al. Vitamin D and Immune Regulation: Antibacterial, Antiviral, Anti-Inflammatory. **JBMR Plus**, v. 5, 2021.

- BORBA, V. Z. C. et al. Epidemiology of Vitamin D (EpiVida)-A Study of Vitamin D Status Among Healthy Adults in Brazil. **J Endocr Soc.**, v. 7, 2022.
- BOUILLON, R. et al. Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. **Endocrine Reviews**, v. 29(6), p. 726-776, 2008.
- BOUILLON, R. Comparative analysis of nutritional guidelines for vitamin D. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, p. 466-479, 2017.
- BOWEN, W. R. et al. Aspects of yeast flocculation. Size distribution and zeta-potential. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 100, n. 3, p. 167-172, 1994.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 de setembro de 2005, p. 372.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 714, de 1º de julho de 2022. Dispõe sobre os requisitos sanitários para enriquecimento e restauração de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 6 de julho de 2022, p. 184-185.
- BUI, L. et al. Vitamin D regulation of the immune system and its implications for COVID-19: A mini review. **SAGE Open Med.**, v. 9, p. 1-8, 2021.
- BURATTINI, E. et al. A FTIR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Vibrational Spectroscopy**, v. 47, p. 139-147, 2008.
- BYRDWELL, W.C. Comparison of analysis of vitamin D3 in foods using ultraviolet and mass spectrometric detection. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 2135-2146, 2009.
- CALVO, M. S. et al. Vitamin D fortification in the United States and Canada: Current status and data needs. **J. Clin. Nutr.**, v. 80, p. 1710– 1716, 2004.
- CASHMAN, K. D. et al. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? **Am J Clin Nutr.**, v.103, p.1033-1044, 2016.
- CIAMPONI, F.; et al. Yeast cells as microcapsules. Analytical tools and process variables in the encapsulation of hydrophobes in *S. cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 6, p. 1445–1456, 13 set. 2012.
- CORADELLO, G., TIRELLI, N. Yeast Cells in Microencapsulation. General Features and Controlling Factors of the Encapsulation Process. **Molecules**, v. 26, p. 1-20, 2021.
- COSTA, A. G. et al. Obtenção e caracterização de manoproteínas da parede celular de leveduras de descarte em cervejaria. **Acta Scientiarum**, v. 34, p. 77-84, 2012.
- CRAFA, A. et al. Influence of 25-hydroxy-cholecalciferol levels on SARS-CoV-2 infection and COVID-19 severity: A systematic review and meta-analysis. **EClinicalMedicine**, v. 37, p. 1-14, 2021.
- CRINI, G., BADOT, P. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. **Progress in Polymer Science**, v. 33, p. 399-447, 2008.

- CZERNIAK, A. et al. Improvement of oxidative stability of menhaden fish oil by microencapsulation within biocapsules formed of yeast cells. **Journal of Food Engineering**, v. 167, p. 2–11, 2015.
- DA ROSA, J. R. et al. Microencapsulation of anthocyanin compounds extracted from blueberry (*Vaccinium* spp.) by spray drying: Characterization, stability and simulated gastrointestinal conditions. **Food hydrocolloids**, v. 89, p. 742-748, 2019.
- DA SILVA, M. P. et al. Vacuum-assisted biosorption for developing combined delivery formulations of live probiotics and plant-phenolic compounds and their in-vitro evaluation. **Food Bioscience**, p. 102732, 2023.
- DACH - GERMAN NUTRITION SOCIETY. New reference values for vitamin D. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 60, p. 241-246, 2012.
- DADKHODAZADE, E. et al. Yeast Cell Microcapsules as a Novel Carrier for Cholecalciferol Encapsulation: Development, Characterization and Release Properties. **Food Biophysics**, v. 13, p. 404–411, 2018.
- DADKHODAZADE, E. et al. Yeast cells for encapsulation of bioactive compounds in food products: A review. **Biotechnol Progress**, v. 37, p. 1-12, 2021.
- DE ANDRADE, E.W.V. et al. Sonoprocessing is an effective strategy to encapsulate fisetin into *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 106, p.7461-7475, 2022.
- DE LA GUÍA-GALIPIENSO, F. et al. “Vitamin D and cardiovascular health.” **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 40, p. 2946-2957, 2021.
- DE MEDEIROS, F. G. et al. Efficient stabilisation of curcumin microencapsulated into yeast cells via osmoporation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 9659–9672, 2019.
- DELUCA, H. F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 1689S-1696S, 2004.
- DELUCA, H. F. (2016). Vitamin D: Historical Overview. **Vitamins & Hormones**, v. 100, p. 1-20, 2016.
- DIAS, M. I. et al. Microencapsulation of bioactives for food applications. **Food & Function**, v. 6, p. 1035-1052, 2015.
- DIMOPOULOS, G. et al. Cell permeabilization processes for improved encapsulation of oregano essential oil in yeast cells. **Journal of Food Engineering**, v. 294, p. 1-13, 2021.
- DOMINGUEZ, L. J. et al. Vitamin D Sources, Metabolism, and Deficiency: Available Compounds and Guidelines for Its Treatment. **Metabolites**, v.11, 2021.
- DURAZZO, A. et al. Qualitative Analysis of Traditional Italian Dishes: FTIR Approach. **Sustainability**, v. 10, 2018.
- EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). Scientific opinion on dietary reference values for vitamin D. **EFSA Journal**, v.14, p 145 pp. 2016.

- ERRENT, C. et al. Encapsulation of limonene in yeast cells using the concentrated powder form technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 168, p. 105076, 2021.
- EUN, J. B. et al. A review of encapsulation of carotenoids using spray drying and freeze drying. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, p. 3547-3572, 2019.
- FÁVARO-TRINDADE, C. S. et al. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food hydrocolloids**, v. 24, p. 336-340, 2010.
- FELDMAN, D. et al. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. **Nat Rev Cancer**, v. 14, p. 342-357, 2014.
- FERREIRA, I. M. P. L. V. O. et al. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 2, p. 77-84, 2010.
- FOMINA, M., GADD, G. M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 3-14, 2014.
- GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 13-28, 2009.
- GALICHET, A. et al. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. **FEMS Microbiology Letters**, v. 197, p. 179-186, 2001.
- GANESAN, B. et al. Fortification of Cheddar cheese with vitamin D does not alter cheese flavor perception. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 7, p. 3708-3714, 2011.
- GAUDET, M. et al. Recent advances in vitamin D implications in chronic respiratory diseases. **Respir Res.**, v. 23, 2022.
- GONZÁLEZ, S.S. et al. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. **FEMS Yeast Res**, v. 6, p. 1221-1234, 2006.
- GÜNEŞER, O. et al. Bioflavour production from tomato and pepper pomaces by *Kluyveromyces marxianus* and *Debaryomyces hansenii*. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 38, p.1143-1155, 2015.
- GUPTA, R. et al. Recent Advances in Formulation Strategies for Efficient Delivery of Vitamin D. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, 2019.
- HOSSEIN-NEZHAD, A.; HOLICK, M. F. Vitamin D for health: a global perspective. **Mayo Clin Proc.**, v 88, p. 720-55, 2013.
- HENN. M. et al. Vitamin D in Cancer Prevention: Gaps in Current Knowledge and Room for Hope. **Nutrients**, v. 14(21), 2022.
- HERNIGOU, P., AUREGAN, J.C., DUBORY, A. Vitamin D: part I; from plankton and calcified skeletons (500 million years ago) to rickets. **Int Orthop**, v. 42(9), p. 2273–2285, 2018.

- HERNIGOU, P., AUREGAN, J.C., DUBORY, A. Vitamin D: part II; cod liver oil, ultraviolet radiation, and eradication of rickets. **International Orthopaedics (SICOT)**, v. 43, p. 735–749, 2019.
- HO, Y; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. **Process biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 451-465, 1999.
- HOLICK, M. F. Vitamin D: A millenium perspective. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88(2), p. 296-307, 2003.
- HOLICK, M. F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. **J Clin Invest.** v.116(8), p. 2062-2072, 2006.
- HOLICK, M.F. Vitamin D deficiency. **N Engl J Med.**, v. 357. P. 266-281, 2007.
- HOLICK, M. F.; CHEN, T. C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p.1080-1086. 2008.
- HOLICK, M. F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, p. 1911-1930, 2011.
- HUANG, Q. R.; YU, H. L.; RU, Q. M. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **J. Food Science.**, v. 75, p, 50-57, 2010.
- IOM - INSTITUTE OF MEDICINE. Report Release: **Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D**, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56056/>>. Acesso em 02 de maio 2023.
- JACH, A. et al. Dietary supplements based on the yeast biomass. **Current Topics in Nutraceutical Research.** v.13, p. 83-88, 2015.
- JACH, M. E.; SEREFKO, A. Nutritional Yeast Biomass: Characterization and Application. In: **Diet, Microbiome and Health.** [s.l.] Elsevier, 2018. p. 237-270.
- JAKOBSEN, J.; KNUTHSEN, P. Stability of vitamin D in foodstuffs during cooking **Food Chem.**, v. 148, p. 170-175, 2014.
- JILANI, H. et al. Biosorption of green and black tea polyphenols into *Saccharomyces cerevisiae* improvestheir bioaccessibility. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 11-21, ago. 2015.
- JILANI, H. et al. Improved bioaccessibility and antioxidant capacity of olive leaf (*Olea europaea* L.) polyphenols through biosorption on *Saccharomyces cerevisiae*. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 131-138, 2016.
- JILANI, H. et al. Antiproliferative activity of green, black tea and olive leaves polyphenols subjected to biosorption and in vitro gastrointestinal digestion in Caco-2 cells. **Food Research International**, v. 136, p. 109317, 2020.
- JONES, G. 100 YEARS OF VITAMIN D: Historical aspects of vitamin D. **Endocrine Connections**, v. 11. P. 1-11, 2022.
- JORGE, A. J. L. et al. Vitamin D Deficiency and Cardiovascular Diseases. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v.31, p. 422-432, 2018.

- KALININA, I. et al. Increasing the Efficiency of Taxifolin Encapsulation in *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cells Based on Ultrasonic Microstructuring. **Fermentation**, v. 8, p. 378, 2022.
- KARAMAN, K. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* based microcarriers for encapsulation of black cumin seed oil: Stability of thymoquinone and bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 313, p. 126-129, 2020.
- KARAMAN, K. Fabrication of gallic acid loaded yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) microcapsules: Effect of plasmolysis treatment and solvent type on bioactivity and release kinetics. **LWT**, v. 148, p. 111640, 2021.
- KAVOSI, M. et al. Characterization and oxidative stability of purslane seed oil microencapsulated in yeast cells biocapsules. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 98, p. 2490-2497, 2017.
- KHAKPOUR, H. et al. Two-stage biosorption of selenium from aqueous solution using dried biomass of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 532-542, 2014.
- KHAN, B. et al. Vitamin D status and its correlation to depression. **Annals of general psychiatry**, v. 21, 2022.
- KHOKHAR, A. et al. Genetic Disorders of Vitamin D Metabolism: Case Series and Literature Review. **Clin Pediatr (Phila)**, v. 55, p. 404-14, 2016.
- KIELISZEK, M. et al. A. Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. **Fungal Biol. Rev.**, v. 31, p.185-198, 2017.
- KIMBALL, S.M., HOLICK, M.F. Official recommendations for vitamin D through the life stages in developed countries. **Eur J Clin Nutr**, v. 74, p. 1514-1518, 2020.
- KOUSHA, M. et al. Adsorption of acid orange II dye by raw and chemically modified brown macroalga *Stoechospermum marginatum*. **Chemical Engineering Journal**. v 192, p. 67-76, 2012.
- KUREK, M. A. et al. Encapsulation of anthocyanins from chokeberry (*Aronia melanocarpa*) with plasmolyzed yeast cells of different species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 137, p. 84-92, 2023.
- KURTZMAN, C.P.; FEL, J.W.; BOEKHOUT, T. (Eds.) Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In **The Yeasts, a Taxonomic Study**; Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, 2011, p. 3-5.
- LALLY, J.; GAUGHRAN, F. Vitamin D in schizophrenia and depression: a clinical review. **BJPsych Advances**, v. 25, p. 240-248, 2019.
- LEÓN-GONZÁLEZ, M. E. et al. Residual brewing yeast as a source of polyphenols: Extraction, identification and quantification by chromatographic and chemometric tools. **Food Chemistry**, v. 267, p. 246-254, 2018.
- LIN, L. et al. Vitamin D and Vitamin D Receptor: New Insights in the Treatment of Hypertension. **Current Protein and Peptide Science**, v. 20, p. 984-995, 2019.
- LUO, Y.; TENG, Z.; WANG, Q. Development of Zein Nanoparticles Coated with Carboxymethyl Chitosan for Encapsulation and Controlled Release of Vitamin D3. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 836-846, 2012.

- MADENE, A. et al. Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1-2, 2006.
- MAROLDI, W. V. et al. Biosorption of phenolic compounds from *Plinia cauliflora* seeds in residual yeast: Kinetic, equilibrium, and bioaccessibility studies. **Journal of Food Processing and Preservation**, p. e17156, 2022.
- MARSON, G. V. et al. Sequential hydrolysis of spent brewer's yeast improved its physico-chemical characteristics and antioxidant properties: A strategy to transform waste into added-value biomolecules. **Process biochemistry**, v. 84, p. 91-102, 2019.
- MATHIAS, T. R. S. et al. Characterization and determination of brewer's solid wastes composition. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 3, p. 400-404, 2015.
- MATSUI, M.S. Vitamin D Update. **Curr Derm Rep**. v. 9, p. 323–330, 2020.
- MAURYA, V. K.; AGGARWAL, M. Impact of aqueous/ethanolic goji berry (*Lycium barbarum*) fruit extract supplementation on vitamin D stability in yoghurt. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci**, v. 6, p. 2016-2029, 2017.
- MAURYA, V. K., AGGARWAL, M. A phase inversion based nanoemulsion fabrication process to encapsulate vitamin D3 for food applications. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 190, p. 88-98, 2019.
- MAURYA, V. K. et al. Vitamin D microencapsulation and fortification: Trends and technologies. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 196, p. 105489, 2020.
- MCCOURT, A., O'SULLIVAN, A. Using food fortification to improve vitamin D bioaccessibility and intakes. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 81(1), p. 99-107, 2022.
- MESSIAS, S. I. S. **Caracterização dos polissacarídeos da parede celular das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade de Aveiro, Aveiro, 2016.
- MENDES, C.R. et al. Zeta Potential Mechanisms Applied to Cellular Immobilization: A Study with *Saccharomyces cerevisiae* on Dye Adsorption. **J Polym Environ**, v. 29, p. 2214-2226, 2021.
- MICHALAK, I. et al. State of the art for the biosorption process - A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p.1389-1416, 2013.
- MICLEA, A. et al. A Brief Review of the Effects of Vitamin D on Multiple Sclerosis. **Front. Immunol**, v.11:781, 2020.
- MUSCOGIURI, G. Introduction to Vitamin D: current evidence and future directions. **Eur J Clin Nutr**, v. 74, p. 1491–1492, 2020.
- NARESWARA, A. R. et al. Encapsulation efficiency of vitamin D3 in α -lactalbumin during storage. **Food Research 4 (Suppl. 3)**: p. 141-146, 2020.
- NEDOVIC, V. et al. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**.v.1, p.1806-1815, 2011.

- NORMAN, A. W. The History of the Discovery of Vitamin D and Its Daughter Steroid Hormone. **Ann Nutr Metab**, v. 61, p. 199-206, 2012.
- NORMAND, V. et al. Flavor encapsulation in yeasts: limonene used as a model system for characterization of the release mechanism. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 19, p. 7532-7543, 2005.
- NGUYEN, T. T. et al. Encapsulation of Hibiscus sabdariffa L. anthocyanins as natural colours in yeast. **Food Research International**, v. 107, n. September 2017, p. 275-280, 2018.
- OZKAN, G. et al. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. **Food Chemistry**, v. 272, p. 494-506, 2019.
- PAL, R. et al. Vitamin D supplementation and clinical outcomes in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **J Endocrinol Invest**, v. 45(1), p. 53-68, 2022.
- PALACIOS, C., GONZALEZ, L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v 144, p. 1-17, 2015.
- PARAMERA, E. I.; KONTELES, S. J.; KARATHANOS, V. T. Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyclodextrin and modified starch. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p.913-922, 2011.
- PARAMERA, E. I.; KARATHANOS, V. T.; KONTELES, S. J. Yeast Cells and Yeast-Based Materials for Microencapsulation. **Microencapsulation in the Food Industry**, p. 267-281, 2014.
- PAUCAR, O. C. et al. Production by spray chilling and characterization of solid lipid microparticles loaded with vitamin D3. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 344-350, 2016.
- PAULO, F.; SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 77, p. 1327-1340, 2017.
- PHAM-HOANG, B. N. et al. Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: Yeast cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 6635-6645, 2013.
- PINTO, L. C. **Aproveitamento de produtos derivados de levedura (*Saccharomyces spp.*) para o enriquecimento nutricional de alimentos à base de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*)**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2011.
- PINTO, M. et al. Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: A structural characterization approach. **Carbohydrate polymers**, v. 116, p. 215-222, 2015.
- PODD, D. Hypovitaminosis D. **Journal of the American Academy of Physician Assistants**, v. 28, p. 20–26, 2015.
- RAMALHO, M. J. et al. Nanoparticles for Delivery of Vitamin D: Challenges and Opportunities. In: S. Gowder, Ed., **A Critical Evaluation of Vitamin D - Clinical Overview**. Arábia Saudita: InTech, 2017.

REHMAN, R. et al. Editorial: Vitamin D Deficiency and Sufficiency in Reproduction and Bone Metabolism. **Front. Endocrinol.**, v. 12, 2021.

RIBEIRO, V. R. et al. Biosorption of biocompounds from white and green tea in *Saccharomyces cerevisiae* waste: Study of the secondary metabolites by UPLC-QToF-MS and simulated in vitro gastrointestinal digestion. **Food Bioscience**, p. 101001, 2021.

ROCHA, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. **Food and bioproducts processing**, v. 90, n. 1, p. 37-42, 2012.

ROGOWSKA, A. et al. The influence of different pH on the electrophoretic behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* modified by calcium ions. **Sci Rep.**, v. 8, 2018.

ROSSETTO, R. et al. Acai pulp and seeds as emerging sources of phenolic compounds for enrichment of residual yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) through biosorption process. **LWT - Food Science and Technology**, v. 128, p. 109447, 2020.

RÚBIO, F. T. V. et al. Enrichment of waste yeast with bioactive compounds from grape pomace as an innovative and emerging technology: Kinetics, isotherms and bioaccessibility. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, p. 18-28, 2018.

RÚBIO, F. T. V. et al. Utilization of grape pomaces and brewery waste *Saccharomyces cerevisiae* for the production of bio-based microencapsulated pigments. **Food research international**, v. 136, 2020.

RÚBIO, F. T. V. et al. Investigation on brewer's spent yeast as a bio-vehicle for encapsulation of natural colorants from pumpkin (*Cucurbita moschata*) peels. **Food Funct.**, v.13, p. 10096-10109, 2022.

SALARI, R. et al. New aspects of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel carrier for berberine. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 1-8, 2013.

SALARI, R. et al. Characterization of Encapsulated Berberine in Yeast Cells of *Saccharomyces Cerevisiae*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.14, p. 1247-1256, 2015.

SARAVANAN, P. et al. A comprehensive analysis of biosorptive removal of basic dyes by different biosorbents. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 16, p. 1-8, 2021.

SCHWEGMANN, H. et al. Influence of the zeta potential on the sorption and toxicity of iron oxide nanoparticles on *S. cerevisiae* and *E. coli*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 347, p. 43-48, 2010.

SERAPHIN, G. et al. The impact of vitamin D on cancer: A mini review. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 231, 2023.

SHANK, J. L. **Encapsulation process utilizing microorganisms and products produced thereby**. 1977. US4001480.

- SHI, G. et al. Microencapsulação baseada em células de levedura de ácido clorogênico como um antioxidante solúvel em água. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 1060-1067, 2007.
- SHI, G. et al. Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, n. 1-2, p. 83-93, 2008.
- SCHOOR, N. V.; LIPS, P. Global Overview of Vitamin D Status. **Endocrinol Metab Clin N Am**, v. 46, p. 845–870, 2017.
- SOUZA, C. L. et al. Vitamin D and Diabetes Mellitus: A Review. **Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases**, v. 06, p. 1–7, 2016.
- STEWART, G. (2014) SACCHAROMYCES | Brewer's yeast in **Encyclopedia of Food Microbiology** (Batt, C.A., Ed.), p. 302-308, Academic press.
- SULTANA, A. et al. Microencapsulation of flavors by spray drying using *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Food Engineering**, v. 199, p. 36-41, 2017.
- SZYMCZAK-PAJOR, I. et al. The Action of Vitamin D in Adipose Tissue: Is There the Link between Vitamin D Deficiency and Adipose Tissue-Related Metabolic Disorders? **International Journal of Molecular Sciences**, v; 23, 2022.
- TAKALLOO, Z. et al. Autolysis, plasmolysis and enzymatic hydrolysis of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): a comparative study. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 36, 2020.
- VALAND, R. et al. A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 37, p. 19-38, 2020.
- VIEIRA, E. F.; SOUZA, S. Formulation Strategies for Improving the Stability and Bioavailability of Vitamin D-Fortified Beverages: A Review. **Foods**, v. 11, p. 847, 2022.
- VOLESKY, B. Biosorption and me. **Water Research**, v. 41, p. 4017-4029, out. 2007.
- WANG, J.; CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 427-451, 2006.
- WANG, Y. et al. Effects of Inhibitors Generated by Dilute Phosphoric Acid Plus Steam-Exploded Poplar on *Saccharomyces cerevisiae* Growth. **Microorganisms**, v. 10, n. 7, p. 1456, 2022.
- WITEK-KROWIAK, A. Analysis of influence of process conditions on kinetics of malachite green biosorption onto beech sawdust. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, n. 3, p. 976–985, 2011.
- WHO - FAO (World Health Organization/Food and Agricultural Organization of the United Nations) (2006) **Guidelines on food fortification with micronutrients**. Disponível em: < <https://www.who.int/publications/i/item/9241594012>>. Acesso em 08 de maio de 2023.
- WIMALAWANSA, S. J. Non-musculoskeletal benefits of vitamin D. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 175, p. 60-81, 2018.

YE, Q.; GEORGES, N.; SELOMULYA, C. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 167- 179, 2018.

YOUNG, S.; DEA, S.; NITIN, N. Vacuum facilitated infusion of bioactives into yeast microcarriers: Evaluation of a novel encapsulation approach. **Food Research International**, v. 100, p. 100-112, 2017.

YOUNG, S.; NITIN, N. Thermal and oxidative stability of curcumin encapsulated in yeast microcarriers. **Food Chemistry**, v. 275, p. 1-7, 2019.

ZARZOUR, F. et al. Cardiovascular Impact of Calcium and Vitamin D Supplements: A Narrative Review. **Endocrinol Metab (Seoul)**, v.38(1), p. 56-68, 2023.

ZHANG, Y. et al. Effects of Vitamin D Supplementation on Prevention of Type 2 Diabetes in Patients With Prediabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. **Diabetes Care**, v.43 (7), p. 1650–1658, 2020.