

Microencapsulation à base de pectine : un moyen efficace pour moduler les fonctionnalités de molécules fragiles

Thi Binh An NGUYEN, Tihanac BARIC, Emilie RUFFIN, Tiffany SCHMIT, Pascale WINCKLER, Yves

WACHE et **Odile CHAMBIN**

Université Bourgogne Franche-Comté

UMR A02-102 PAM – Equipe PAPC, UFR des Sciences de Santé, 7 bd Jeanne d’arc, 21000 DIJON

Tel : +33 380 39 3215 - odile.chambin@u-bourgogne.fr

Mots clés : *microencapsulation, billes de pectinate, vitamine A, curcumine, protection, pouvoir anti-oxydant, biodisponibilité.*

Introduction :

L’encapsulation de molécules d’intérêt est un sujet d’actualité, notamment lorsque ces molécules sont fragiles comme les huiles et en particulier les oméga-3, les vitamines (vitamine A, C et E), les anti-oxydants (polyphénols, resvératrol, thiols ...), les colorants, les arômes, les huiles essentielles, les enzymes, les cellules vivantes telles que les probiotiques, les levures

Souvent, l’encapsulation est utilisée pour protéger ces molécules des stress engendrés lors du procédé de fabrication ou encore lors du stockage [10].

Il est, cependant, impossible d’avoir une technique d’encapsulation qui s’adapte à toutes ces molécules car elles présentent des propriétés complètement différentes (consistance (liquide, solide), stabilité, état physique, solubilité, point de fusion ...).

Aussi de nombreux procédés sont décrits dans la littérature [12].

Un procédé très fréquemment retrouvé est le *prilling* ou la gélification ionique. Ce procédé est basé sur l'utilisation de polysaccharides qui sont capables de former instantanément un gel en présence de cations divalents comme le calcium [2],[5]. Les billes formées sont de taille variée. Elles peuvent être conservées humides en suspension dans un milieu ou être séchées.

L'objectif de cette étude est d'examiner l'influence de différents paramètres de ce procédé d'encapsulation sur les propriétés de 2 types de molécules lipophiles : la vitamine A et la curcumine, afin de les protéger et de maintenir leurs fonctionnalités (libération, pouvoir anti-oxydant).

Matériels et Méthodes :

Des billes de pectinate de calcium sont obtenues pour encapsuler la vitamine A et la curcumine après gélification à froid d'une émulsion contenant dans la phase aqueuse de la pectine faiblement méthoxylée ou LM (Unipectine 305 C[®], Cargill) et dans la phase huileuse, la substance active. Différents tensioactifs sont additionnés pour stabiliser l'émulsion comme des tensioactifs à chaîne courte (Solutol HS15[®]- BASF, Transcutol[®] - Gattefossé) mais aussi des tensioactifs protéiques (Caséinate de sodium – Amor protéines, bêta-lactoglobuline Bipro[®] - Davisco). Des caractérisations seront réalisées sur l'émulsion (taille des gouttelettes dispersées, études calorimétriques ...). Chaque émulsion est ajoutée goutte à goutte à une solution de chlorure de calcium (10% m/v) sous agitation, pour l'obtention de billes humides de 1 à 2 mm qui seront lavées, filtrées puis séchées en plateau à l'étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Ces billes seront caractérisées par leur taille, leur taux d'encapsulation et d'autres propriétés physico-chimiques (comportement thermique par calorimétrie différentielle, étude du temps de vie de fluorescence (FLIM)) afin de mieux comprendre leur structuration. Puis les profils de dissolution *in vitro* seront obtenus avec un appareil à palettes dans des conditions *sink* pour chaque molécule (tampons pH 1,2 puis pH 7,4 additionnés d'un tensioactif, 37°C, 50 rpm).

Enfin le pouvoir anti-oxydant sera évalué pour les billes de curcumine par un test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) dans 2 conditions différentes : test réalisé après extraction totale de la curcumine des billes et test réalisé sur les milieux de dissolution après 330 min à 37°C. Le DPPH est un radical stable de couleur bleue-violette qui devient jaune lorsqu'il est sous forme réduite. L'évaluation de l'activité anti-oxydante est obtenue par détermination de la réduction relative du radical DPPH à un temps de référence, en suivant son absorption à 515 nm [6]. Cela permet de calculer le pourcentage d'inhibition du pouvoir piègeur du DPPH par l'anti-oxydant qui définit ainsi son activité.

Résultats – Discussion :

- Cas de la vitamine A

Les billes formées sont à base de pectine et de bêta-lactoglobuline avec ou sans traitement thermique (70°C ou 80°C – 30 minutes). Le traitement thermique induit une dénaturation de la bêta-lactoglobuline en fonction de la durée et de l'intensité du chauffage [9]. Par analyse calorimétrique, cette dénaturation est clairement quantifiée (figure 1). Elle induit des propriétés différentes à la bêta-lactoglobuline, notamment cette protéine se déplie et couvre mieux les gouttelettes de l'émulsion. Les propriétés tensioactives sont ainsi plus développées. Ainsi, les

gouttelettes de l'émulsion sont plus fines (18,8 μm au lieu de 35,7 μm en utilisant la protéine native), l'émulsion est plus stable dans le temps et les billes formées ont également des propriétés différentes. Le rendement de fabrication et la taille des billes sont comparables. Cependant, la forme des billes est plus sphérique lorsque la bêta-lactoglobuline est complètement dénaturée. La différence majeure se situe surtout au niveau de la stabilité qui est inférieure à 50%, après un mois à 40°C et 75% d'humidité relative mais supérieure à 70% après dénaturation [11].

Enfin, l'impact de la dénaturation thermique a également été évalué sur les cinétiques de dissolution *in vitro* obtenues à partir des billes en utilisant un tampon phosphate à pH 6,8 avec 1% d'octoxynol [4]. Les billes obtenues à base de bêta-globuline dénaturée n'ont pas du tout le même comportement que celles à base de protéine native. Ainsi, elles libèrent de façon très contrôlée la vitamine A, et sont beaucoup moins sensibles au changement de pH rencontré au cours du tractus gastro-digestif (figure 2). Cela permet ainsi un meilleur contrôle de la stabilité de la vitamine A et de sa libération lors de son utilisation [11].

- **Cas de la curcumine**

Des études ont également été réalisées avec un anti-oxydant très utilisé aujourd'hui : la curcumine. La curcumine possède des propriétés thérapeutiques très intéressantes [7] mais c'est une molécule lipophile (solubilité aqueuse de 11 ng/L) avec une faible biodisponibilité. Aussi, des billes ont été préparées à base de pectine et de différents tensioactifs. Les tensioactifs ont été sélectionnés par des études de solubilité : ils augmentent tous la solubilité aqueuse de la curcumine [3].

Lorsqu'on vérifie l'impact de la formulation sur les cinétiques de libération, on trouve des profils différents selon les tensioactifs utilisés (figure 3), mais il est difficile de relier le classement obtenu à une propriété spécifique comme la solubilité aqueuse de la curcumine, les cinétiques de gonflement des billes en milieu aqueux, l'état physique (amorphe ou cristallin) de la curcumine ... De façon plus originale, la répartition entre les différentes formes tautomériques de la curcumine (énol / céto) ont été recherchées par une méthode d'imagerie du temps de vie de fluorescence (FLIM). Les billes de caséinate de sodium, qui ont la vitesse de libération la plus lente, présentent aussi les temps de vie de fluorescence de la curcumine les plus grands et plus de forme céto que de forme énol [8].

Suite à ces résultats, nous nous sommes demandé s'il pouvait être fait un lien avec le pouvoir anti-oxydant de la curcumine libérée. L'encapsulation diminue le pouvoir anti-oxydant par rapport à de la curcumine poudre, non encapsulée sauf dans le cas du Solutol® où la différence n'est pas significative. Lors des essais de dissolution (figure 4), la curcumine libérée est de nouveau moins anti-oxydante [1]. Cet effet est marqué lorsque la curcumine est encapsulée seule. Lorsque la bêta-lactoglobuline est ajoutée, elle semble protéger l'activité de la curcumine libérée. De plus, il n'y a pas de perte du pouvoir anti-oxydant lorsque le Solutol® est présent dans les billes de pectine.

Conclusion :

L'encapsulation à base de pectine permet d'obtenir des microparticules, adaptées à un usage en tant que complément alimentaire (taille et forme) avec un bon rendement et une stabilité

accrue. De plus la formulation permet de moduler les propriétés des molécules d'intérêt encapsulées en contrôlant leur libération mais aussi leur activité.

Aussi il est très important de contrôler les interactions mises en place au cours de l'encapsulation pour expliquer au mieux les résultats obtenus et maîtriser les fonctionnalités.

Microencapsulation based on pectinate gel: a real means to modulate the functionalities of fragile drugs

Thi Binh An NGUYEN, Tihanac BARIC, Emilie RUFFIN, Pascale WINCKLER, Yves WACHE and **Odile**

CHAMBIN

Université Bourgogne Franche-Comté

UMR A02-102 PAM – Food Processing and Physical-Chemistry Lab, 1 esplanade Erasme,

21000 DIJON - Tel : +33 380 39 3215 - odile.chambin@u-bourgogne.fr

Keywords: microencapsulation, pectinate beads, vitamin A, curcumin, protection, bioavailability, antioxidative activities.

Introduction:

The encapsulation of active molecules is a hot topic, especially when these are considered to be fragile molecules such as oils and in particular omega-3, vitamins (vitamin A, C and E), antioxidants (polyphenols, resveratrol, thiols ...), aroma, essential oils, enzymes, living cells such as probiotics, yeasts

Often, encapsulation is used to protect these molecules from stress generated during the manufacturing process or during storage [10].

However, it is impossible to have an encapsulation technique that could be applied to all of these molecules because they have completely different properties (consistency (liquid or solid), stability, physical state, solubility, melting point, ...).

Also numerous methods are described in the literature [12].

One process usually described is prilling or ionic gelation. This method is based on the use of polysaccharides, which are able to form a gel instantaneously in the presence of divalent cations such as calcium [2],[5]. The obtained beads often vary in size. They can be stored in suspension or they could be dried to obtain dry microparticles.

The objective of this study is to examine the influence of various parameters of encapsulation process on the properties of two types of lipophilic molecules: vitamin A and curcumin, in order to protect and maintain their functionality (release, antioxidative properties).

Materials and methods:

Calcium pectinate beads were obtained in order to encapsulate vitamin A and curcumin. Encapsulation was the result of cold set emulsion gelation by divalent cations. Emulsions contained Low Methoxylated pectin (Unipectine 3054 C, Cargill) in aqueous phase and active substance in oily phase. Various surfactants are added to stabilize the emulsion as short chain surfactants (Solutol HS15® - BASF, Transcutol - Gattefossé) but also protein surfactants (Sodium caseinate - Amor proteins, beta-lactoglobulin Bipro® - Davisco). Characterizations were performed on the emulsion (size of droplets, calorimetric studies ...). Each emulsion was added dropwise to a calcium chloride solution (10% w / v) under stirring, to obtain wet beads (1 to 2 mm) which be washed, filtered and then dried in an oven at 37°C for 24 to 48 hours.

These beads are characterized by their size, their drug loading and encapsulation efficiency and other physicochemical characterizations (DSC, Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM)) to better understand their structure. Then *in vitro* dissolution profiles were determined using a paddle apparatus in *sink* conditions for each molecule (pH 1.2 or pH 7.4 buffers added with surfactant, 37°C, 50 rpm).

Finally, antioxidative properties were assessed for the curcumin beads by a DPPH test (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) in two different conditions: measure carried out after total extraction of curcumin beads and test performed on media dissolution after 330 minutes at 37°C. The DPPH is a stable radical with a deep violet color in solution. It becomes yellow or colorless when reduced. Assessment of antioxidative activity was carried out by following the change in optical absorption at 515 nm [6]. Then, antioxidative activity of curcumin is expressed as percentage of radical scavenging (inhibition) which represents difference between control and sample after 2 hours.

Results – Discussion:

- Case of vitamin A

The beads are based on pectin and beta-lactoglobulin, native or pre-heated (70°C or 80°C - 30 minutes). The thermal treatment induced denaturation of the beta-lactoglobulin in an extent depending on the duration and the intensity of pre-heating [9]. By scanning calorimetry, this denaturation was clearly quantified (Figure 1). Denaturation caused changes in different properties of beta-lactoglobulin, related to protein unfolding with subsequent increase in

molecule flexibility, therefore improving emulsion stability. The surfactant properties are optimized. Thus, the droplets of the emulsion were smaller (18.8 μm instead of 35.7 μm with the native protein), the emulsion was more stable over time and the produced beads also had different properties. The manufacturing yield and the beads size were similar. However the bead shape was more spherical when beta-lactoglobulin was completely denatured. The major difference lied mainly in terms of stability: that was less than 50% after one month at 40°C and 75% relative humidity but greater than 70% after beta-lactoglobulin denaturation [11].

Finally, the impact of the pre-heating treatment was also assessed on the *in vitro* dissolution kinetics obtained from the different kinds of beads into phosphate buffer (pH 6.8) added with 1% octoxynol [4]. The beads based on denatured beta-lactoglobulin did not show the same behaviour as those based on native protein. They exhibited a sustained release of vitamin A, and they were less sensitive to pH change during the gastrointestinal digestive tract (Figure 2). Thus this strategy enables better control of the vitamin A stability and release during use [11].

- Case of curcumin

Studies were also carried out with an antioxidant widely used today: curcumin. Curcumin has very interesting therapeutic properties [7] but at the same time, it is a lipophilic molecule (solubility in water = 11 ng/L) with low bioavailability. Also, beads were prepared based on pectin and various surfactants. Surfactants were selected according to solubility studies: they all increase the aqueous solubility of curcumin [3].

When checking the impact of formulation on the kinetics release, different profiles were noted depending on surfactants used (Figure 3) but it is difficult to connect the release rate obtained

with a specific property as aqueous solubility of curcumin, the swelling kinetics of the beads in aqueous medium, the physical state (amorphous or crystalline) of curcumin ... Furthermore, the ratio between the both tautomeric forms of curcumin (enol / keto) were investigated by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM). Beads based on sodium caseinate had the slowest release rate, and also the longest curcumin fluorescence lifetime with a greater part of keto form than enol form [8].

Following these results, we wondered if kind of curcumin released could be related to the antioxidative properties of curcumin. Encapsulation reduced the antioxidant capacity in comparison to curcumin powder except for Solutol® where the difference was not significant. During dissolution tests (Figure 4), the curcumin released was again less powerful against oxidation [1]. This effect was marked when curcumin was encapsulated alone. When beta-lactoglobulin was added, it seemed that the protein protect the antioxidative properties of curcumin released and there was no loss of antioxidant power when the pectin beads contained Solutol®.

Conclusion:

The pectin-based encapsulation provides microparticles, suitable for use as a dietary supplement (size and shape) with a good yield and an increased stability. In addition the choice in formulation enables to modulate the properties of the encapsulated active molecules by controlling their release but also their activity.

Also it is very important to control the interactions established during the encapsulation for better explanation of results and control of microparticles features.

References

- [1] Baric Tihana, Curcumin encapsulation by ionotropic gelation in pectin matrix with different surfactants, *Graduate thesis*, Zagreb, july 2015.
- [2] Chambin O., Dupuis G., Champion D., Voilley A. and Pourcelot Y., Colon-specific drug delivery: influence of solution reticulation properties upon pectin beads performance. *International Journal of Pharmaceutics*, 321, 86-93, 2006.
- [3] Chambin O., Nguyen T.B.A., Roudaut G., Winckler P., Wache Y. and Subirade M., Optimisation de l'utilisation de la curcumine par encapsulation. *Industries Alimentaires et Agricoles*, janv/fév : 13-15, 2015.
- [4] Davydova N., Stippler E., Jin P. and Giancaspro G., Development and validation of a dissolution test method for vitamin A in dietary supplement tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53, 295–301, 2010.
- [5] Jantrawut P., Assifaoui A. and Chambin O., Influence of low methoxyl pectin gel textures and in vitro release of rutin from calcium pectinate beads, *Carbohydrate Polymers*, vol 97, 2, 335-342, 2013.
- [6] Li B. and Pratt D.A., Methods for determining the efficacy of radical-trapping antioxidants, *Free Radical Biology and Medicine*, 82, 187–202, 2015.
- [7] Maheshwari R. K., Singh A. K., Gaddipati J. and Srimal R. C., Multiple biological activities of curcumin: A short review, *Life Sciences*, 78: 2081-2087, 2006.

- [8] Nguyen A. Thi-B., Winckler P., Loison P., Wache Y. and Chambin O., Physico-chemical state influences in vitro release profile of curcumin from pectin beads, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 290-298, 2014.
- [9] Nicorescu I., Loisel C., Riaublanc A., Vial C., Djelveh G., Cuvelier G., et al., Effect of dynamic heat treatment on the physical properties of whey protein foams, *Food Hydrocolloids*, 23, 1209–1219, 2009.
- [10] Risch, S.J. Encapsulation: Overview of Uses and techniques. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients* [online] (Risch, S.J., Reineccius, G.A., edit.), American Chemical Society, Minnesota, pp. 2-7, 1995.
- [11] Ruffin E., Schmit T., Lafitte G., Dollat J.M. and Chambin O., The impact of whey protein pre-heating on the emulsion gel bead properties, *Food Chemistry*, 151, 324-332, 2014
- [12] Vandamme T., Poncelet D. and Subra-Paternault P., *Microencapsulation. Des sciences aux technologies*, Editions Tec & Doc, Lavoisier, 2007.

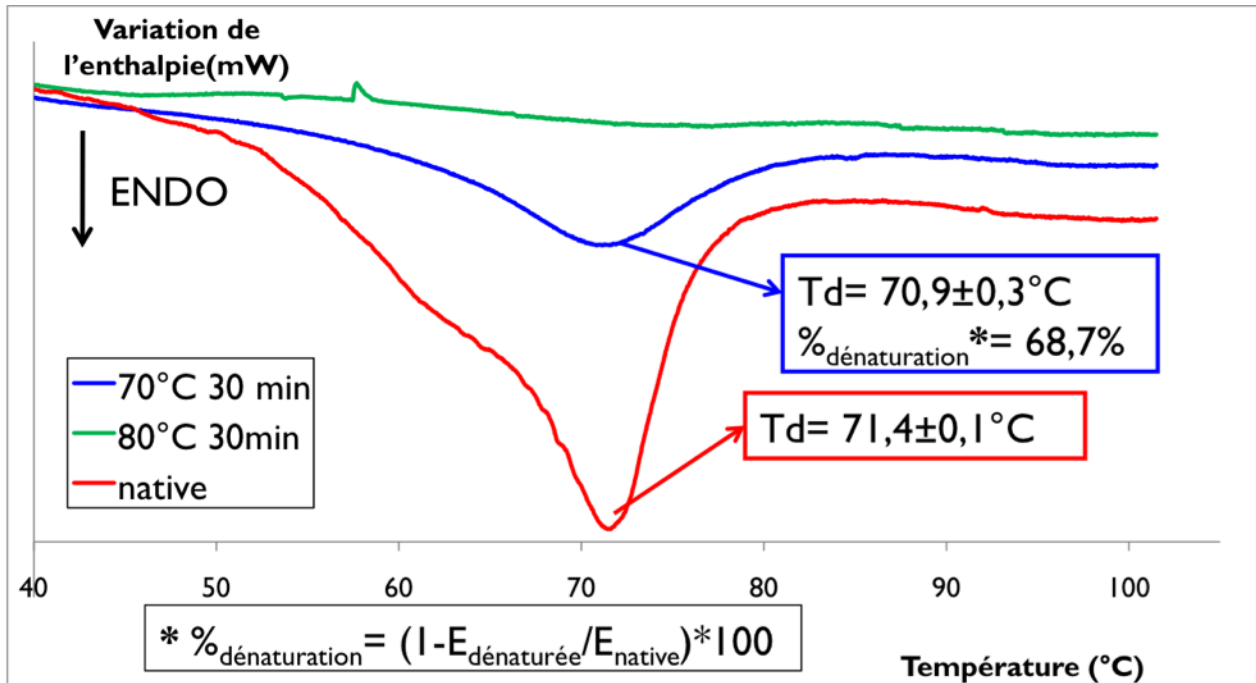


Figure 1: DSC thermograms obtained with native or pre-heated betalactoglobulin dispersions

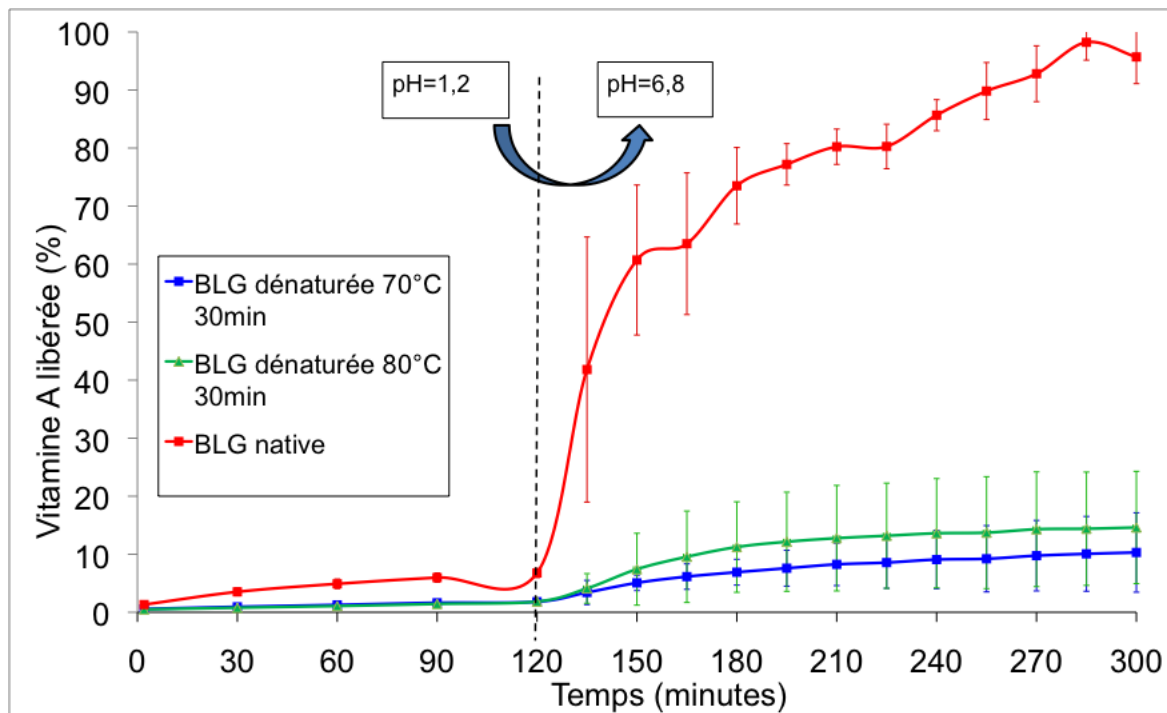


Figure 2: Vitamin A release from pectinate gel beads made of native or pre-heated betalactoglobulin in simulated digestive media

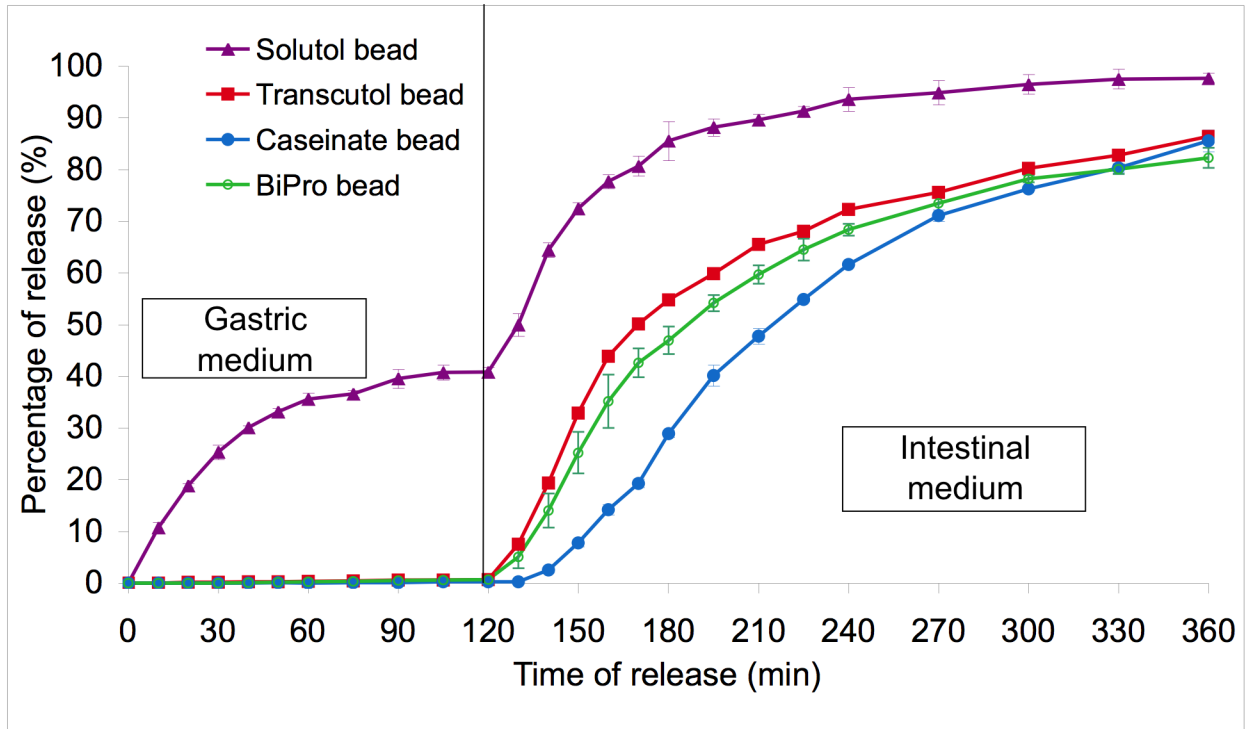


Figure 3: Curcumin release from pectinate gel beads in simulated digestive media

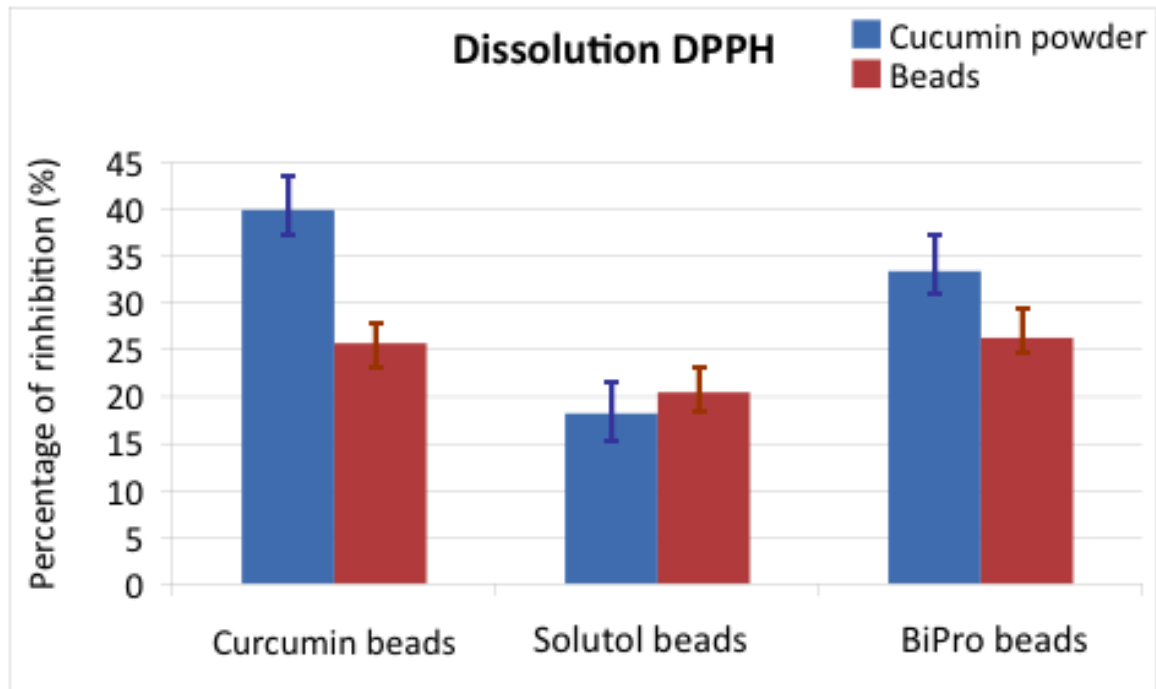


Figure 4: Antioxidative properties from curcumin powder and curcumin from pectinate gel beads after 330 minutes of dissolution