

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANA
DEPARTAMENTO ACADEMICO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS
CURSO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

MARIA LUÍSA CERRI

**ELABORAÇÃO DE MICROESFERAS DE CÁLCIO, MAGNÉSIO E FÓSFORO
COMO ALTERNATIVA PARA O ENRIQUECIMENTO DE MATRIZES
ALIMENTARES**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2017

MARIA LUÍSA CERRI

ELABORAÇÃO DE MICROESFERAS DE CÁLCIO, MAGNÉSIO E FÓSFORO COMO ALTERNATIVA PARA O ENRIQUECIMENTO DE MATRIZES ALIMENTARES

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos do Departamento Acadêmico de Tecnologia em Alimentos – DAALM – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliana Aparecida Fagundes Queiroz Bortolozo

PONTA GROSSA

2017



TERMO DE APROVAÇÃO

ELABORAÇÃO DE MICROESFERAS DE CÁLCIO, MAGNÉSIO E FÓSFORO COMO ALTERNATIVA PARA O ENRIQUECIMENTO DE MATRIZES ALIMENTARES

Por

MARIA LUÍSA CERRI

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 5 de dezembro de 2017, como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof.^a Dr.^a Eliana Fagundes Queiroz Bortolozo
Prof.^a Orientadora.

Prof.^a Dr.^a Maria Helene Canteri
Membro titular.

Prof.^a Msc. Simone Bowles
Membro titular.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo
esforço incondicional que investiram em
mim em todos esses anos.

*“Se fui capaz de ver mais longe, é
porque me apoiei em ombros de gigantes”*

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Agradeço pela vida e pelas oportunidades que a mim se apresentaram e tornaram possíveis essa pesquisa e graduação.

Meus sinceros agradecimentos à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa, e todo seu corpo docente, direção e administração, que por meios financeiros, físicos e humanísticos, prestaram todo o auxílio necessário para a minha graduação e pesquisa.

Agradeço também ao departamento de Farmácia da Universidade Estadual de Ponta Grossa pelo apoio à pesquisa, a partir da doação de materiais e empréstimo de equipamentos.

À minha orientadora, Professora Doutora Eliana Fagundes Queiroz Bortolozo, sou grata por ser a bússola deste estudo, por todo o tempo dedicado no esforço de me ajudar a fazer uma pesquisa não só como protocolo para o término de curso, mas sim uma pesquisa de excelência no intuito de colaborar para uma vida melhor para a sociedade e em consonância com os aspectos sócio-ecológicos.

Ao Professor Doutor Paulo Vitor Farago, pela pronta abertura aos laboratórios e apoio pleno com seu conhecimento desse tema tão atual e relevante.

À Professora Doutora Maria Helene Canteri, pela sua coorientação e pelas palavras e conselhos sempre sábios.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelo apoio na realização de análises.

Agradeço à Professora Doutora Lara Tschopoko Pedroso Pereira, por sua prontidão e apoio.

Meu agradecimento aos meus pais pelo apoio incondicional, seja emocional, financeiro ou outros. Devo minha vida a vocês e espero que possam se sentir orgulhosos de meu esforço. Agradeço também pela ética, fibra moral e senso crítico que me ensinaram.

À minha irmã, Ana Cecília, meu muito obrigada pelas brincadeiras e pelo exemplo de força de vontade e foco.

Às minhas amigas da Universidade Aline, Andreia, Caroline, Crislayne, Daiane, Emanuelle e Suzy, companheiras nos trabalhos durante toda a nossa

formação, durante as dificuldades, as broncas e também os bons momentos. A graduação não teria sido a mesma sem vocês.

Agradeço às minhas amigas da antiga faculdade, Gabrielle, Giovana, Larissa, Mariana e Rafaela, por ainda estarem presentes (próximas ou distantes) e me auxiliarem durante este processo.

Termino esta sessão agradecendo a todos que direta ou indiretamente participaram da minha formação e nem sempre têm visibilidade.

RESUMO

CERRI, Maria Luísa. **ELABORAÇÃO DE MICROESFERAS DE CÁLCIO, MAGNÉSIO E FÓSFORO COMO ALTERNATIVA PARA O ENRIQUECIMENTO DE MATRIZES ALIMENTARES**. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2017.

A microesfera possibilita proteger o seu núcleo de interações com elementos exteriores, evita reações de oxidação e libera seu composto de forma lenta ou dependendo de uma condição específica de pH ou temperatura. No caso da incorporação com nutrientes, as microesferas podem influenciar positivamente no aumento da biodisponibilidade. Este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar microesferas incorporadas de cálcio, fósforo e magnésio, como alternativa para o enriquecimento de alimentos. Utilizou-se o método de *spray drying* e como encapsulante o polímero Eudragit®. Para a caracterização foram realizadas análises de cinzas, microscopia eletrônica de varredura (FEG-SEM), rendimento, eficiência de encapsulação, umidade e difração de raio-X. A partir de uma formulação com 90% de polímero e 10% de minerais, foram obtidas microesferas redondas e de superfície lisa, com rendimento de 51,95% e umidade de 6,64%. Em relação às cinzas obteve-se 10,358% ± 2,07 e a eficiência de encapsulação ficou em 94,69% ± 18,94. Comparando com os dados encontrados na literatura, a formulação em questão de rendimento e eficiência foi considerada satisfatória.

Palavras-chave: Microesfera. Minerais. *Spray drying*.

ABSTRACT

CERRI, MARIA LUÍSA. **DEVELOPING OF MICROESPHERES CONTAINING CALCIUM, MAGNESIUM AND PHOSPHORUS AS AN ALTERNATIVE TO ENRICH A FOOD MATRIX.** 40 F. CONCLUSION PAPER (FOOD TECHNOLOGY) – FEDERAL TECHNOLOGICAL UNIVERSITY OF PARANÁ. PONTA GROSSA, 2017.

The microsphere allows the protection of the minerals from chemical interactions, avoid oxidative reactions, slowly liberate the compound, and only in certain conditions of pH and temperature. The microspheres can influence positively in the increase of the bioavailability of the minerals. The objective of this research is to develop and characterize microspheres incorporated with calcium, phosphorus and magnesium, as an alternative to enrich food. The method for obtaining the microspheres was the spray drying with the polymer Eudragit S100. For the characterization the analysis of ashes, field emission gun scanning electron microscope (FEG-SEM), output, efficiency of encapsulation, humidity and X-ray diffraction were done. The formulation containing 90% of polymer and 10% of minerals resulted in rounded microspheres with smooth surface, with output of 51,95% and humidity of 6,64%. The ashes analysis resulted in $10,358\% \pm 2,07$ of inorganic material and the efficiency of encapsulation $94,69\% \pm 18,94$. The formulation was considered satisfactory in terms of output and efficiency, comparing the data to the literature.

Keywords: Microsphere. Minerals. Spray drying.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –REPRESENTAÇÃO DE ESFERA (A) E CAPSULA (B).....	16
Figura 2 - ESTRUTURA DOS DIFERENTES TIPOS DE MICROPARTÍCULAS.....	17
Figura 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DE DIVERSOS TIPOS DE EUDRAGIT®.....	20
Figura 4 – DESENHO EXPERIMENTAL DAS FASES DO ESTUDO.....	23
Figura 5 – ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DAS MICROPARTÍCULAS COM E SEM MINERAIS EM DIFERENTES AUMENTOS.....	29
Figura 6 – DIFRATOGRAMA DAS MICROPARTÍCULAS SEM MINERAIS	30
Figura 7 – DIFRATOGRAMA DAS MICROPARTÍCULAS COM MINERAIS	31
Figura 8 – DIFRATOGRAMA COMPARATIVO DAS MICROESFERAS COM E SEM MINERAIS	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES UTILIZADOS PARA O PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	24
Tabela 2 - PERCENTUAIS DE RENDIMENTO E UMIDADE DAS MICROPARTÍCULAS.....	26
Tabela 3 - TEOR DE CINZAS NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES.....	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 GERAL.....	12
2.2 ESPECÍFICOS.....	12
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3.1 IMPORTÂNCIA DOS MINERAIS NO METABOLISMO HUMANO.....	13
3.2 ALIMENTOS ENRIQUECIDOS.....	14
3.3 BIODISPONIBILIDADE.....	14
3.4 MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	15
3.5 APLICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS.....	17
3.6 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS.....	18
3.6.1 <i>Spray Drying</i>	18
3.7 POLÍMEROS pH-DEPENDENTES.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 EQUIPAMENTOS.....	21
4.2 REAGENTES E SOLVENTES.....	21
4.2.1 Minerais.....	21
4.2.2 Polímeros.....	21
4.2.3 Água purificada.....	21
4.2.4 Solventes e demais reagentes.....	21
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	22
4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	24
4.4.1 Planejamento da composição das microesferas.....	24
4.4.2 <i>Spray drying</i>	24
4.4.3 Rendimento.....	25
4.4.4 Análise de umidade.....	25
4.4.5 Cinzas.....	25
4.4.6 Eficiência de Encapsulação (EE%).....	25
4.4.7 Microscopia eletrônica de varredura.....	25
4.4.8 Difração de raios-x.....	25
5 RESULTADOS.....	27
5.1 RENDIMENTO E UMIDADE.....	27
5.2 TEOR DE CINZAS.....	27
5.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	28
5.4 FEG-SEM.....	28
5.4 DIFRAÇÃO RAIOS-X.....	30
6 CONCLUSÃO.....	33
REFERENCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

A carência de micronutrientes (vitaminas e minerais) tem-se demonstrado prevalente na população brasileira, sobretudo em crianças, relacionadas com condições socioeconômicas e ambientais (PEDRAZA; DANTAS ROCHA, 2016). Os minerais e vitaminas são nutrientes essenciais, atuando na formação e manutenção do corpo, em atividades enzimáticas, balanço osmótico e ácido-básico, transporte e transferência de nutrientes, sensibilidade de células nervosas e musculares, modulação do sistema imune, entre outras funções orgânicas (BRINQUES, 2014).

O enriquecimento ou fortificação dos alimentos é uma estratégia para corrigir a ingestão inadequada de minerais e vitaminas para populações de diferentes faixas etárias. No Brasil, os alimentos enriquecidos são regulamentados pela Portaria n. 31 de 13 de janeiro de 1998 que fixa a identidade e as características mínimas de “Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais” (BRASIL, 1998).

Fortificam-se alimentos quando se pode confirmar uma deficiência em um número relevante de indivíduos. Já a suplementação é feita para grupos específicos com aquela deficiência, como por exemplo, uma possível deficiência de cálcio em gestantes, crianças em fase de crescimento ou idosos (COZZOLINO, 2007). No Brasil, alguns alimentos já têm a fortificação obrigatória pelo Ministério da Saúde, como o ferro e ácido fólico, cuja adição é obrigatória nas farinhas de trigo e milho (BRASIL, 2002).

A biodisponibilidade de nutrientes representa a fração potencialmente utilizada pelo organismo, levando-se em consideração sua digestibilidade, absorção, transporte e metabolização no tecido alvo e deve ser levada em conta ao se fortificar uma matriz alimentar (COZZOLINO, 2007). A biodisponibilidade de nutrientes está condicionada à condição de ingestão, à saúde do indivíduo, à forma de preparo do alimento, à forma química do nutriente e a matriz alimentar. Essas propriedades podem ser influenciadas pelo processamento dos alimentos, como ação do calor, fermentação e enriquecimento dos alimentos (COZZOLINO, 2007).

Uma alternativa para a fortificação dos alimentos é o uso das microesferas, que protegem elementos frágeis, garantem um aumento da biodisponibilidade e diminuem a interferência do nutriente nas características sensoriais dos alimentos. Isso porque a microesfera é capaz de evitar interações entre componentes, retardar a migração

dos componentes do núcleo para o exterior, proteger de reações degradativas como a oxidação e permitir que a liberação do material seja controlada (AZEREDO, 2005).

Este trabalho foi motivado levando-se em conta a incidência da carência populacional dos minerais cálcio, magnésio e fósforo (IBGE, 2008/2009) e a dificuldade e insuficiência verificada na fortificação tradicional de alimentos.

O desenvolvimento de microesferas compostas de cálcio, magnésio e fósforo, nas proporções ideais para o desenvolvimento do tecido ósseo e outras funções orgânicas destes nutrientes, poderá viabilizar uma nova alternativa para a área de alimentos enriquecidos com maior biodisponibilidade e menor influência nas suas características sensoriais.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver e caracterizar microesferas de cálcio, fósforo e magnésio a partir da técnica de *Spray Dryer*, utilizando o Eudragit® como material encapsulante.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar as proporções dos nutrientes cálcio, fósforo e material polimérico para elaboração de microesferas como alternativa para o enriquecimento de alimentos.
- Estabelecer o protocolo da elaboração das microesferas a partir do método de *spray-drying*.
- Quantificar o teor final de minerais encapsulados, utilizando-se a quantificação de cinzas e assim determinar a eficiência de encapsulação.
- Determinar a morfologia e tamanho das microcápsulas por microscopia de varredura.
- Determinar o rendimento e umidade das microesferas.
- Conhecer a cristalinidade da amostra a partir da análise de difração de raio-X.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 IMPORTÂNCIA DOS MINERAIS NO METABOLISMO HUMANO

Segundo o *National Research Council* (1989), o cálcio tem as funções de constituir o tecido ósseo, funcionar como um mensageiro intracelular nas células e nos tecidos, como mediador de contração vascular, vasodilatação, função muscular, transmissão nervosa e secreção hormonal.

A função do fósforo no organismo, segundo Cozzolino (2007), é de auxiliar na manutenção do pH, na reserva temporária de energia na forma de ATP (oriundo do metabolismo de macronutrientes), sendo responsável pela ativação de cascatas enzimáticas.

Já o magnésio, de acordo com Bordignon (2003), regula uma grande parte dos sistemas enzimáticos, atua no equilíbrio hídrico e eletrolítico do organismo e têm um importante papel na síntese das proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídeos.

A deficiência mineral nos seres humanos é causadora de patologias e a carência desses minerais pode ocorrer devido a diversos motivos desde escassez de minerais na dieta, má absorção ou baixa biodisponibilidade. Um estudo de avaliação do consumo de minerais na dieta da população brasileira realizado pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e sintetizado por Cozzolino (2007), mostra que o consumo diário de cálcio da população brasileira gira em torno de 300/500 mg/dia, enquanto a Ingestão Diária Recomendada (IDR) pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2005) é de 1000 mg/dia.

A Ingestão Diária Recomendada (IDR) de magnésio corresponde a 260 mg/dia (BRASIL, 2005), mas segundo este mesmo estudo de Cozzolino (2007), poucas regiões têm valor limítrofe, enquanto os outros ficam abaixo da recomendação. A IDR para o fósforo é de 700 mg/dia (BRASIL, 2005), porém como exposto por Veiga (2013) o consumo deste mineral é inadequado em pouco mais de dois terços dos adolescentes estudados.

Segundo dados observados por Ribeiro (2002), em estudo com atletas da ginástica olímpica de clubes do Rio de Janeiro e São Paulo, o consumo de produtos com fonte de cálcio está abaixo da recomendação nutricional (National Research, 1989) em aproximadamente 45%. O consumo deste nutriente é essencial, especialmente para atletas, visto que o exercício acelera a perda do cálcio no suor.

3.2 ALIMENTOS ENRIQUECIDOS

Segundo a Anvisa, alimentos fortificados ou enriquecidos são aqueles adicionados de um ou mais nutrientes essenciais, como os minerais, com o objetivo de aumentar o valor nutritivo na alimentação da população ou de grupos específicos (BRASIL, 1998).

Existem duas modalidades de adição de nutrientes, os chamados ‘alimentos adicionados de nutrientes essenciais’ e os ‘alimentos enriquecidos ou fortificados’. Os primeiros, para receber essa denominação, necessitam que 100 mL ou 100 g do produto forneçam no máximo 7,5% da IDR, podendo constar na embalagem “alimento fonte” de determinado nutriente. Já os alimentos enriquecidos ou fortificados necessitam que esse número seja pelo menos 15% da IDR, para serem denominados como “alimento com alto teor ou rico” em determinado nutriente (BRASIL, 1998).

Para a adição do nutriente, devem-se inserir concentrações que não acarretem em ingestão excessiva ou irrelevante. Deve-se também considerar sua interação com outros nutrientes ou substâncias, sua biodisponibilidade e segurança (BRASIL, 1998).

3.3 BIODISPONIBILIDADE

O termo biodisponibilidade foi primeiro aplicado à área farmacológica, visando determinar qual a proporção da droga atinge a corrente sanguínea intacta. Então, na década de 80 entendendo-se que a presença do nutriente não garantia a sua absorção, esse termo foi adaptado para os alimentos para discriminar a proporção de nutrientes realmente aproveitada pelo organismo. Porém, no Congresso de biodisponibilidade, realizado na Holanda em 1997, essa definição mudou:

“Biodisponibilidade é a fração de qualquer nutriente ingerido com o potencial para suprir demandas fisiológicas em tecidos alvos” (COZZOLINO, 1997).

De acordo com Bronner e Pansu (1998), a biodisponibilidade é dependente da digestibilidade, solubilização, absorção, retenção e utilização pelo indivíduo.

A absorção de cálcio no corpo humano dá-se de duas formas: ativa e passiva. O transporte ativo acontece quando existe baixa ingestão do mineral, é dependente da vitamina D e acontece predominantemente no duodeno (pH 6,6). O transporte passivo acontece com o aumento da ingestão de cálcio e ocorre principalmente no íleo (pH > 8), no ceco (pH 7,6) e no cólon ascendente (pH 7), (BRONNER, 1998)

No estômago, os ácidos secretados diminuem o pH do conteúdo estomacal, depois de expelido para o duodeno o pH sobe para níveis alcalinos; nessa mudança menos cálcio é solubilizado e uma parte precipita. Por esse motivo, o carbonato de cálcio, comumente utilizado no enriquecimento dos alimentos, quando ingerido sozinho se torna uma fonte pobre de cálcio (RECKER 1985 apud BRONNER 1998).

Os componentes da dieta ingeridos juntamente com o cálcio também podem ser fatores determinantes para sua absorção, por exemplo no caso de fitatos, oxalatos e taninos, que formam complexos insolúveis com o cálcio e reduzem sua absorção (COZZOLINO, 2007).

O fósforo apresenta, em geral, boa biodisponibilidade nos alimentos, porém em sementes, leguminosas e castanhas, que contém ácido fítico a biodisponibilidade é reduzida. Porém, pela ação de fitases e colônias de bactérias uma quantidade de fósforo é hidrolisada e torna-se disponível (COZZOLINO, 2007).

O magnésio, assim como o cálcio também é predominantemente absorvido no íleo e cólon. Não há competição entre o magnésio e o cálcio pela absorção (COZZOLINO, 2007). Em relação à biodisponibilidade, os fitatos, fibras, álcool e o excesso de fosfato diminuem a absorção do magnésio.

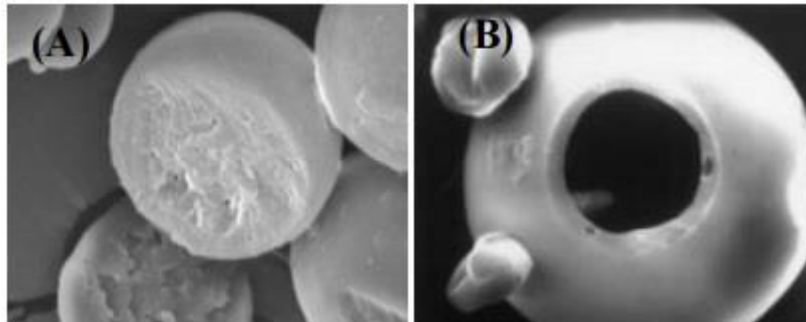
3.4 MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Segundo Arshady (1991), Burgess e Hickey (1994), micropartículas são esféricas e sólidas e seu tamanho varia entre 1 e 1000 μm (apud SILVA et al., 2003, p.2).

As micropartículas podem ser classificadas em microcápsulas e microesferas, diferenciadas pela forma em que o conteúdo se encontra, sendo matricial ou reservatório (FAYAD, 2010).

Na microcápsula forma-se um núcleo do princípio ativo com envoltório do polímero, sendo classificada como reservatório (SILVA et al., 2003) (Figura 1). As microcápsulas são heterogêneas, pois formam uma bolsa contendo o princípio ativo (também chamado de sistema vesicular), cuja cavidade pode ser oleosa ou aquosa e é envolvida pelo polímero que forma uma membrana, cuja espessura é bastante variável (FAYAD, 2010). As microcápsulas podem ser mono ou polinucleares, dependendo da quantidade de núcleos formados (SILVA, 2003).

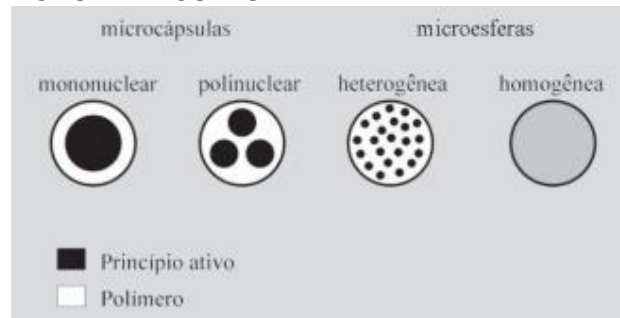
FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO DE ESFERA (A) E CÁPSULA (B)



Fonte: ANDREANI (2009) e PEDROZA-ISLAS (1999) apud FAYAD (2010)

Nas microesferas, o princípio ativo fica disperso no material polimérico, sendo, portanto, matricial. A microesfera pode ser homogênea ou heterogênea, na qual o polímero forma uma espécie de rede em que o princípio ativo pode estar dissolvido (homogênea) ou disperso na superfície (heterogênea) (FAYAD, 2010; SILVA et al., 2003). Essa estrutura também pode ser denominada de tipo “esponja” pela semelhança visual (Figura 2).

FIGURA 2: ESTRUTURA DOS DIFERENTES TIPOS DE MICROPARTÍCULAS



Fonte: SILVA et al (2003).

3.5 APLICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS

Devido às suas propriedades, as micropartículas são amplamente utilizadas para encapsular substâncias como pigmentos, vitaminas, fármacos e nutrientes (BOURGEAT, 2003).

Na área de alimentos são realizadas pesquisas com o objetivo de proteger nutrientes, vitaminas e oleaginosas; e também diminuir características sensoriais desagradáveis (COCATO et al, 2007; VALDUGA et al, 2008; DRUSCH et al., 2006).

Os efeitos da oxidação, reação que diminui a biodisponibilidade e agrega sabores desagradáveis ao alimento, foram reduzidos com a utilização de microcápsulas (COCATO et al., 2007).

Na área de alimentos, é possível observar o uso de micropartículas principalmente para proteção do princípio ativo, como no estudo de Favaro-Trindade (2002) em que foram microencapsulados microrganismos probióticos (*L. acidophilus* e *B. lactis*) por *spray drying*, visto que pela legislação atual os microrganismos devem ser viáveis, ou seja, precisam sobreviver ao trato gastrointestinal.

Outra aplicação da micropartícula é para armazenamento de enzimas para acelerar o amadurecimento de queijos, como no estudo de Kailasapathy (2005), onde os queijos adicionados das micropartículas tiveram a taxa de proteólise aumentada em relação aos queijos não tratados com micropartículas.

Comunian (2013) realizou um estudo para encapsular ácido ascórbico pelo método de coacervação complexa, com o objetivo de aumentar a estabilidade protegendo-o de fatores como aquecimento, luz e oxidação; e assim adicionar a microcápsula como um antioxidante para carnes.

3.6 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS

A escolha do método de obtenção de micropartículas depende, entre vários fatores, da aplicação da microcápsula, das propriedades físico-químicas do princípio ativo e do agente encapsulante, do tamanho desejado para as partículas e do mecanismo de liberação (JACKSON e LEE, 1991 apud FAVARO-TRINDADE, 2008).

Dentre os métodos, os mais utilizados em pesquisas são: *spray drying*, liofilização, coacervação simples e complexa, lipossomas e lipoesferas, extrusão, leiteo fluidizado e inclusão molecular (FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

Na liofilização, só é possível encapsular materiais líquidos; no leiteo fluidizado apenas sólidos; nos demais métodos, é possível encapsular materiais sólidos ou líquidos, mas não gasosos, com exceção dos métodos de extrusão que permitem encapsular gases (Southwest Research Institute, 1991; SHAHIDI e HAN, 1993; DESAI e PARK, 2005; e MADENE et al., 2006 apud FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

3.6.1 SPRAY DRYING

No método de *spray drying*, a solução contendo o polímero e o princípio ativo é nebulizada em um bico atomizador. As gotículas nebulizadas são direcionadas à uma câmara dessecante, que em alta temperatura vai evaporar o solvente e formar micropartículas sólidas (ESPOSITO et al., 2002; SOSNIK, 2015 apud LYRA 2016). Mesmo com a alta temperatura no interior da câmara, os compostos termossensíveis não sofrem alterações, pois o tempo de exposição das partículas é curto:

“Em contato com o ar aquecido, a água se evapora rapidamente da cápsula. A alta relação área de superfície/volume das partículas promove rápida evaporação da água. Com isso, o tempo de exposição das partículas ao calor é curto (geralmente poucos segundos), e a temperatura do núcleo não ultrapassa os 100 °C, o que reduz a ocorrência de alterações indesejáveis em compostos termossensíveis” (DZIEŻAK, 1988 apud AZEREDO, 2005).

Spray drying é uma técnica de transformação de fluídos em pós ou grânulos por atomização em uma corrente de ar quente. Essa técnica é amplamente utilizada

nas indústrias farmacêutica, química, de materiais e alimentícia, principalmente por ser rápida, contínua e possível de reprodução em diversas escalas (SOSNIK, 2015).

A secagem por aspersão tem três fases. Na primeira, o fluído é disperso em forma de gotículas, aumentando assim a sua área superficial; na segunda fase, as gotículas entram em contato com a corrente de ar aquecido e assim ocorre a transferência de calor; na terceira fase, o solvente é evaporado e formam-se partículas sólidas (OLIVEIRA, 2010).

Na área de alimentos, as indústrias utilizam a técnica de *spray dryer* para secagem de produtos em pós finos. A técnica, quando comparada à liofilização é mais rápida e tem alta produtividade (ALVIM, 2005).

Com relação à encapsulação por *spray dryer* em alimentos, pode-se citar o estudo de Valduga (2008), que microencapsulou a antocianina do bagaço da uva do cultivar “Isabel”. Como material encapsulante, foi utilizada maltodextrina e goma arábica. Neste estudo, mostrou-se que a melhor condição de encapsulamento ocorreu quando utilizadas proporções iguais de maltodextrina e goma arábica.

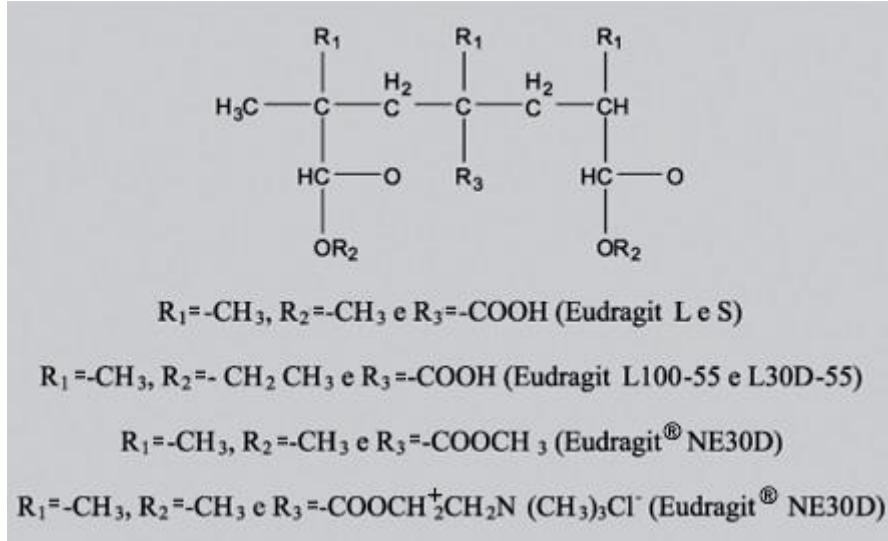
3.7 POLÍMEROS pH-DEPENDENTES

Os sistemas pH-dependentes são compostos que se beneficiam da mudança de pH no trato digestório. Neste caso, os materiais utilizados para revestimentos geralmente são insolúveis em pH ácidos e solúveis em pH neutro ou levemente alcalino. Portanto, esses polímeros previnem a liberação de seu núcleo ativo em locais como estômago e intestino delgado onde não serão eficientemente absorvidos (LYRA, 2016).

Os polímeros chamados pH-dependentes, como por exemplo o Eudragit[®], permitem que a liberação dos minerais seja feita de forma seletiva. Dentre os diferentes encontrados para comercialização, destaca-se o Eudragit[®]S100 (ES100), um polímero entérico, com liberação a partir do duodeno (pH próximo a 6,0) e que não ocorre em pHs ácidos (estômago).

O ES100 é um copolímero aniônico formados com base no ácido metacrílico e metil metacrilato. A proporção de grupos carboxílicos livres e esterificados é de 1:2 (Figura 3) (FREIRE, 2016).

FIGURA 3: ESTRUTURA QUÍMICA DE DIVERSOS TIPOS DE EUDRAGIT®



Fonte: FREIRE (2006)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético (SOLAB, modelo SL-91, Piracicaba, Brasil)
- Analisador de umidade (SARTORIUS, modelo MA35, Göttingen, Alemanha)
- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil)
- Balança analítica (BEL Engineering, modelo Mark 205 A)
- Mufla (QUIMIS, modelo 318D24, Diadema, Brasil)
- Microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca)
- Sistema de secagem por aspersão, *Spray dryer* (LABMAQ, modelo MSD 0.5; Ribeirão Preto, Brasil)

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Minerais

- Cloreto de Cálcio Dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ALPHATEC, Macaé, Brasil)
- Fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4 , Qhemis, Jundiaí, Brasil)
- Carbonato de Magnésio (CaCO_3 , ALPHATEC, Macaé, Brasil)

4.2.2 Polímero

- Polímero Eudragit[®]S100 doado pelo Departamento do curso de Farmácia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.2.3 Água purificada

- Água ultra-pura, obtida por sistema de purificação de água (Milli-Q[®], MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos).
- Para desenvolvimento das microesferas foi utilizada água destilada obtida no equipamento FANEM LTDA (modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil).

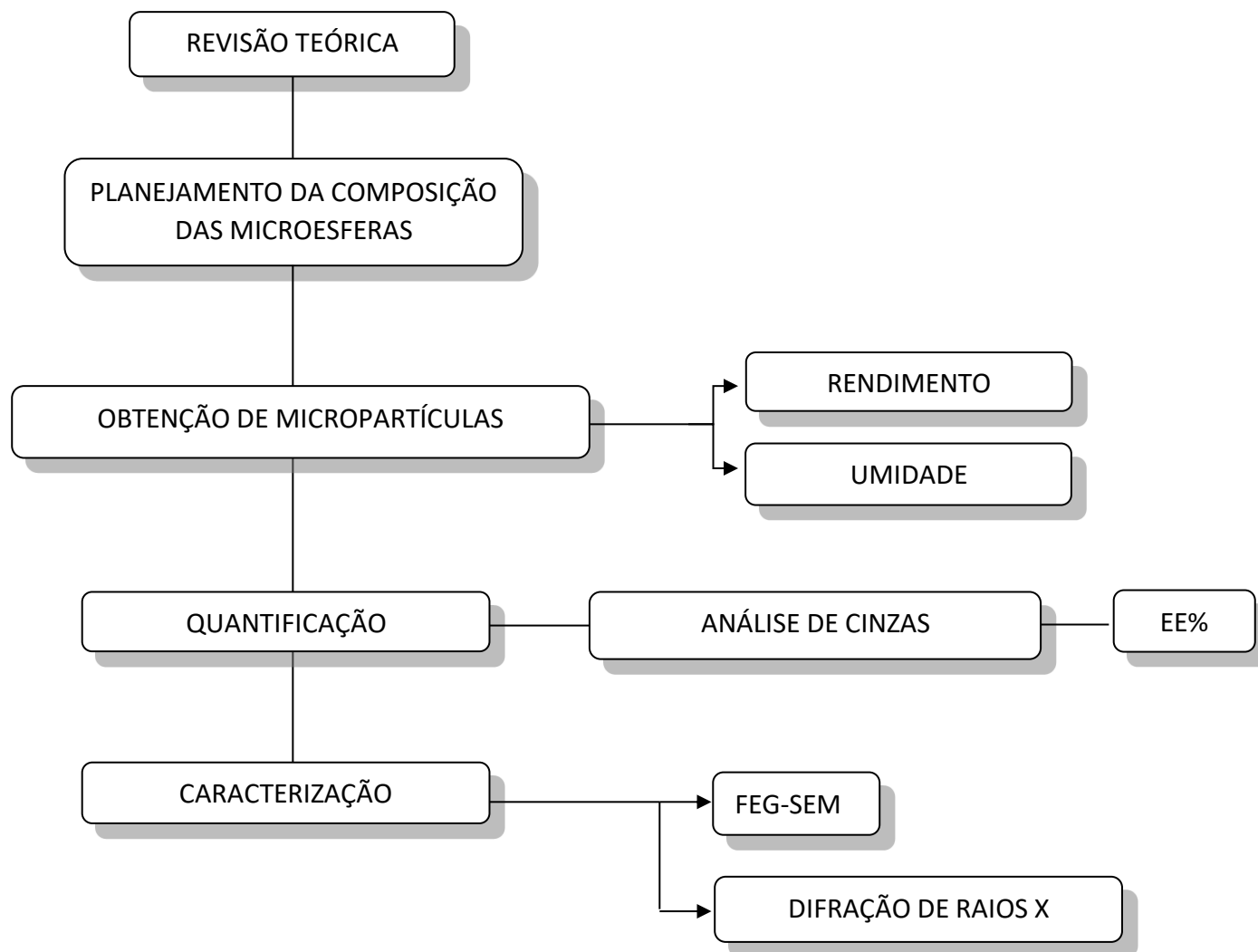
4.2.3 Solventes e Demais Reagentes

- Álcool Etilico P.A. 95% ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, ALPHATEC, Macaé, RJ)

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

As fases deste estudo estão esquematizadas na Figura 4. Inicialmente foi realizada uma investigação em artigos científicos para determinar a concentração dos minerais e melhor método de obtenção da microesfera. Na sequência, foi realizado o desenvolvimento das microesferas poliméricas de ES100. Com as microesferas prontas, foram avaliados o rendimento, a eficiência da encapsulação e a umidade e realizadas análises de cinzas dos minerais e caracterizações morfológicas.

FIGURA 4: DESENHO EXPERIMENTAL DAS FASES DO ESTUDO



4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 Planejamento da composição das microesferas

Na Tabela 1 está apresentada a quantidade utilizada do polímero e minerais, baseada no estudo de Lyra (2016), cuja concentração de componente ativo máximo seria de 20%. Assim sendo, este estudo foi planejado para utilizar 10% de minerais e 90% de polímero. Para a proporção entre os minerais, levou-se em conta as recomendações propostas nas DRIs (*Dietary Reference Intakes*) na proporção de Cálcio/Fósforo/Magnésio de 2:1:0,4 (PADOVANI et al, 2006).

Foi preparada uma suspensão sem adição dos minerais (branco) para fins comparativos.

TABELA 1: CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES UTILIZADOS PARA O PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Componentes	Proporção na concentração da microesfera (%)	Quantidades utilizadas
Cloreto de Cálcio	5,8825	0,11765g
Fosfato de potássio	2,94	0,0588g
Carbonato de Magnésio	1,175	0,0235
Teor de polímero	90	1,8g
Tipo de solvente	Etanol:água 550:200 V/V	750 mL

Fonte: A autora (2017)

4.4.2 Spray Drying

As fontes de minerais foram dissolvidas em água (200 mL) e o polímero em etanol P.A. (550 mL) e posteriormente as duas soluções foram homogeneizadas, sob agitação magnética (SOLAB), por 15 minutos. A mistura foi levada ao *Spray Dryer* (LABMAQ), sob as seguintes condições: diâmetro do atomizador: 0,82 mm, pressão de atomização: 3 kgf cm⁻², fluxo do ar de secagem: 40 L h⁻¹, fluxo de alimentação da formulação em secagem: 0,22 L h⁻¹ e temperatura de saída: 60 ± 5°C.

4.4.3 Rendimento das micropartículas

O rendimento das microesferas foi calculado pela divisão da massa final das microesferas, pela soma da massa do polímero e dos minerais, conforme a equação 1.

$$R = \frac{\textit{massa final (microesferas)}}{\textit{massa inicial (polímero + minerais)}} \times 100$$

4.4.4 Análise de Umidade

A porcentagem de água presente na formulação das microesferas, do branco e da mistura física entre polímero e minerais foi determinada em analisador de umidade (MA35, SARTORIUS). Cada amostra de 0,5 gramas foi colocada em um prato de alumínio previamente seco e aquecida a 105 °C até massa constante.

4.4.5 Análise de Cinzas

As amostras foram calcinadas em chapa metálica e levadas à mufla à 550 °C por 4 horas e comparadas quanto ao teor de cinzas (LUTZ, 2005)

4.4.6 Eficiência de encapsulação (EE%)

A eficiência de encapsulação foi calculada dividindo o valor das cinzas da formulação pelo valor inicialmente colocado de minerais, como exemplificado na equação 2.

$$EE\% = \frac{\textit{peso final de cinzas}}{\textit{peso inicial de minerais + cinzas Eudragit}} \times 100$$

4.4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy* - FEG-SEM)

Para determinação da estrutura e da superfície das microesferas, foi utilizado Microscópio Eletrônico de Varredura por Emissão de Campo (Mira 3, TESCAN).

4.4.8 Difração de raios-X

As microesferas foram analisadas em difratômetro de raios X para determinação de seu arranjo espacial, uma das principais técnicas utilizadas para

definir a cristalinidade da amostra, visto que cada material tem um único padrão difratométrico. A partir do arranjo da molécula podemos definir se ela é cristalina ou amorfa, o que influencia em sua solubilidade.

Substâncias mais cristalinas são menos solúveis e apresentam picos definidos; substâncias amorfas não tem picos definidos, porém são mais solúveis pela disposição aleatória das moléculas. Portanto, pode-se afirmar que a cristalinidade da substância pode influenciar na sua biodisponibilidade, visto que a solubilização pode ser dificultada ou facilitada.

Para a análise foram utilizadas as seguintes condições: ângulo 2θ inicial 5° e 2θ final 80° , à $2^\circ/\text{min}$ e passo de $0,02^\circ$.

5 RESULTADOS

As micropartículas foram obtidas com sucesso por *Spray Drying* e apresentaram aspecto de pó branco a olho nu e sem aglomerados.

5.1 RENDIMENTO E UMIDADE

O rendimento da formulação foi calculado a partir da Equação 1 e os resultados são apresentados na tabela 2. Para a umidade, inicialmente foi realizada a tentativa de determinar pelo método de estufa com circulação de ar em triplicata. Porém, por ser uma massa pequena, verificou-se a existência de erro significativa. Na sequência, repetiram-se as análises em analisador de umidade infravermelho, entretanto sem quantidade suficiente para triplicata.

TABELA 2: PERCENTUAIS DE RENDIMENTO E UMIDADE DAS MICROPARTÍCULAS

FORMULAÇÃO	Rendimento (%)	Umidade (%)
Micropartículas	51,95	6,64
Branco		4,85
Polímero + minerais		4,95

Fonte: A autora (2017)

O rendimento obtido está em consonância com o estudo de Lyra (2016) que obteve valores entre 42,76% e 63,21% nas formulações contendo fármaco e Eudragit®.

O rendimento se mostrou maior que nos estudos de Raffin et al. (2007) e Cruz et al. (2010), de 36 e 47% respectivamente.

Os resultados de umidade ficaram próximos aos encontrados na literatura para microesferas de S100, como em Cruz (2010) que variou de 6,60 à 8,31% e em Lyra (2016) que variou de 1,41 à 5,77%. Vale ressaltar que valores de umidade abaixo de 10%, são mais estáveis em matrizes alimentares. O conteúdo de umidade influencia em modificações químicas e físicas, assim como na multiplicação de microrganismos (ROCKLAND, 1987).

5.2 TEOR DE CINZAS

A tabela 3 apresenta os teores de cinzas das micropartículas encapsuladas com minerais, branco e polímero + minerais.

TABELA 3: TEOR DE CINZAS NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES

FORMULAÇÃO	Cinzas (%) Média \pm DP
Micropartículas	10,3580 \pm 2,07
Branco	0,55 \pm 0,27
Polímero + minerais	10,5689 \pm 4,43

Fonte: A autora (2017)

Levando-se em conta os valores médios de cinzas, os minerais mostraram-se estáveis com relação aos procedimentos realizados. Isso porque, as micropartículas em que haviam minerais, apresentaram média de 10% de teor de cinzas. Esse resultado demonstra que o polímero, material orgânico, foi evaporado, enquanto os minerais (inorgânicos) permaneceram no encapsulado.

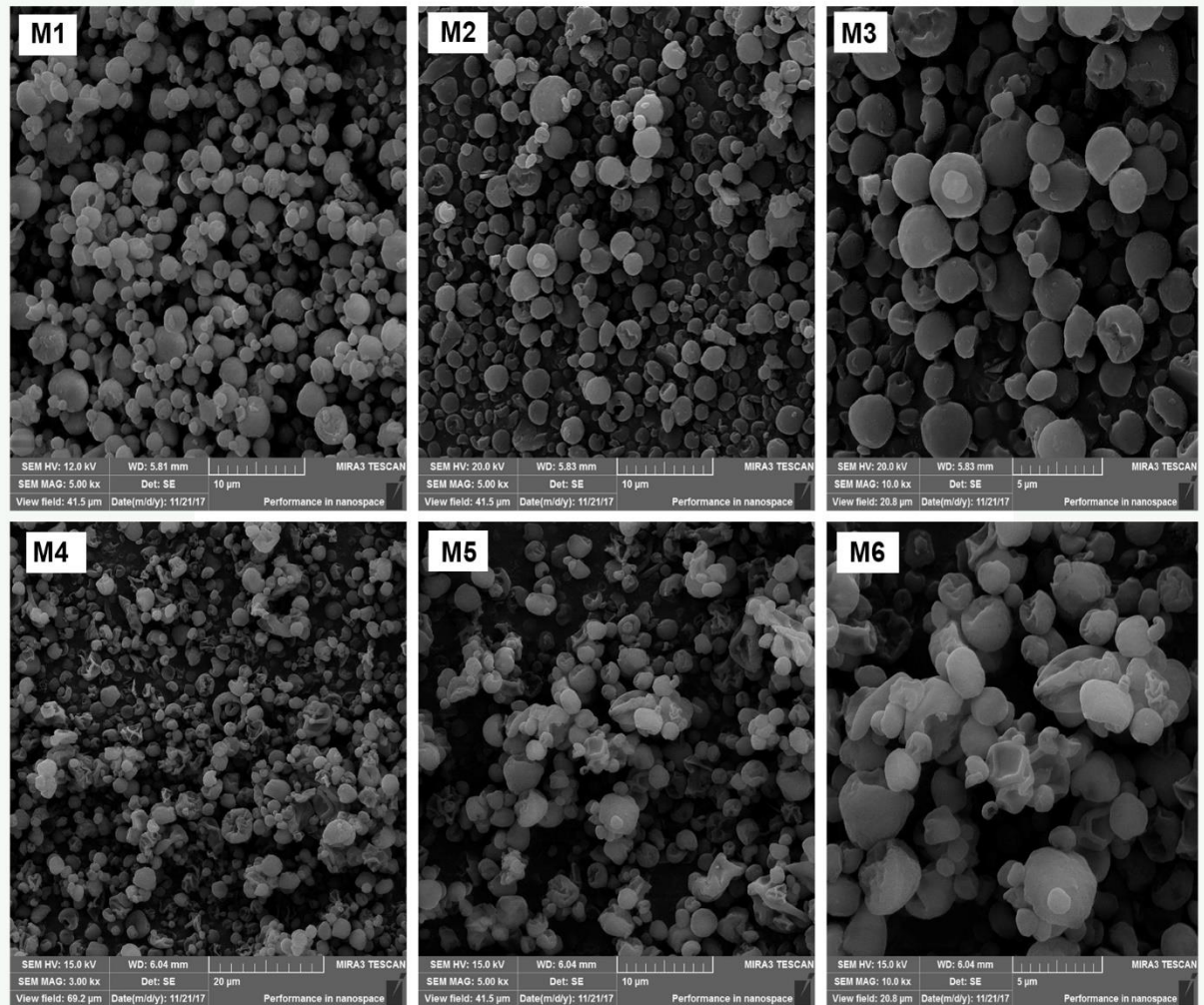
5.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A eficiência da encapsulação, segundo o método proposto, foi de 98,69% (\pm 18,94), estando em conformidade aos encontrados por Cruz (2010) que alcançou uma eficiência de 93,82% \pm 4,15%. Este dado confirma o atendimento ao objetivo proposto neste estudo.

5.4 FEG-SEM

A figura 5 apresenta a morfologia das microesferas produzidas neste estudo. As micropartículas apresentadas de M1 a M3 são correspondentes à formulação de microesferas preparadas com etanol e água (550:200 V/V) contendo polímero e minerais. As imagens M4 a M6 correspondem ao branco, que contém a mesma proporção de polímero, etanol e água, mas não contém os minerais.

FIGURA 5: ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DAS MICROPARTÍCULAS COM E SEM MINERAIS EM DIFERENTES AUMENTOS



Eletromicrografias da formulação branco (M1 a M3) e das microesferas (M4 a M6) em diferentes aumentos.

Fonte: A autora (2017)

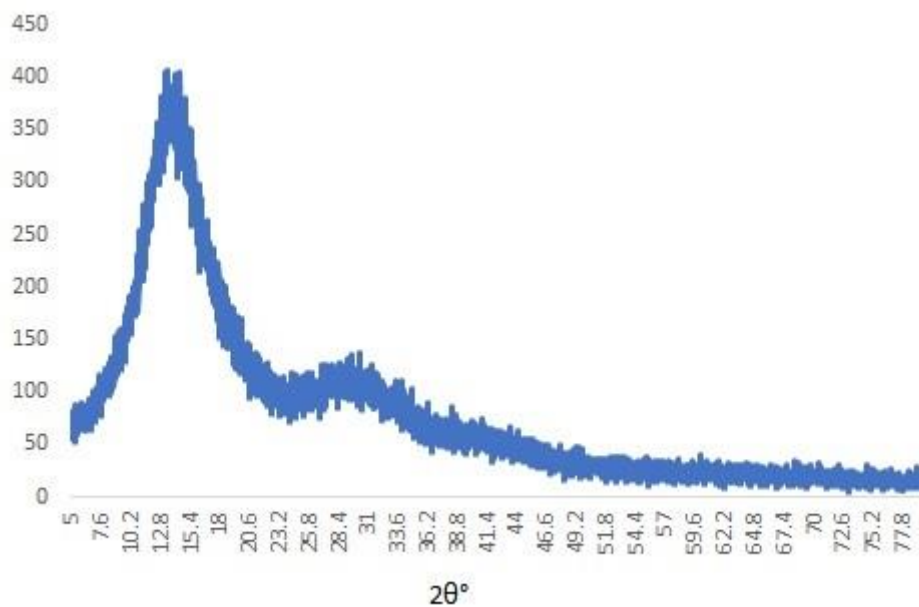
Como observa-se nas imagens, as micropartículas têm forma esférica e superfície lisa, similares às encontradas nos estudos de Cruz et al. (2010), Raffin et al. (2007) e Lyra (2016) que também utilizaram ES100 em *spray dryer* e também similares aos encontrados em Alvim et al. (2015), utilizando goma arábica e ácido ascórbico. Pode-se observar, também, a polidispersidade, característica de microesferas produzidas em *spray dryer*, em que existem partículas maiores e menores juntas. Isso acontece porque o aerossol do *spray dryer* produz gotículas de

diferentes tamanhos. A partir deste resultado, foi possível caracterizar as microesferas produzidas, conforme objetivo inicialmente proposto.

5.5 DIFRAÇÃO DE RAIO X

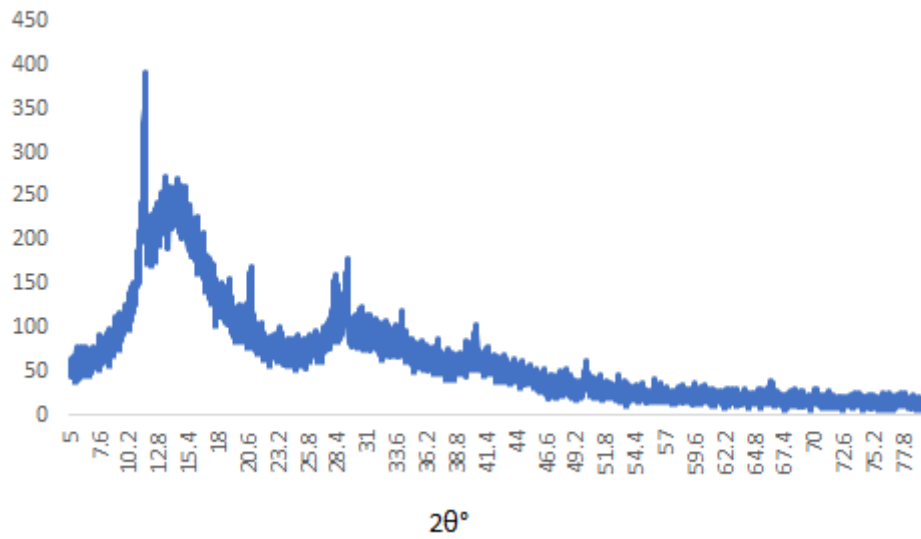
Os difratogramas apresentados nas figuras 6 e 7, apresentam indicações da cristalinidade das microesferas com e sem minerais. É possível observar que ambas têm caráter amorfo, visto que não possuem picos bem definidos. Alguns dos picos que aparecem podem significar microdomínios do mineral no polímero e confirmar sua encapsulação (MENDES, 2011 apus LYRA, 2016).

FIGURA 6: DIFRATOGRAMA DAS MICROPARTÍCULAS SEM MINERAIS



Fonte: A autora (2017)

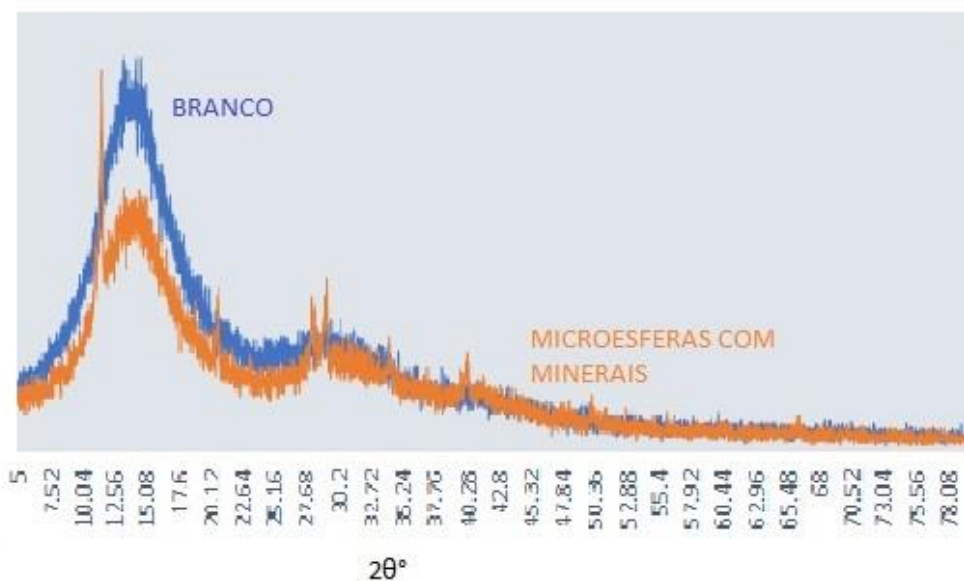
FIGURA 7: DIFRATOGRAMA DAS MICROPARTÍCULAS COM MINERAIS



Fonte: A autora (2017)

Na figura 8, os difratogramas com e sem minerais foram cruzados para uma melhor comparação. Pode-se perceber que ambos não tem picos bem definidos, mas tem a existência de microdomínios em ângulos muito próximos.

FIGURA 8: DIFRATOGRAMA COMPARATIVO DAS MICROESFERAS COM E SEM MINERAIS



Fonte: A autora (2017)

Para confirmar que houve um aumento da solubilidade, seria necessário comparar com os difratogramas dos sais, porém, sabe-se que os sais utilizados são materiais cristalinos e que as microesferas desenvolvidas, como já citado, são amorfas e possivelmente solúveis.

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados e discutidos neste trabalho, demonstrou-se a viabilidade no desenvolvimento de microesferas contendo Eudragit® S100, como material de parede e os minerais cálcio, fósforo e magnésio como ativos, assim como foi possível estabelecer um protocolo para a sua elaboração pelo *Spray Dryer*.

A partir de uma revisão bibliográfica pode-se determinar que a proporção recomendada entre material de parede e ativo para *spray dryer* é de até 20% de ativo e 80% de encapsulante. Para os nutrientes determinou-se que a proporção ideal segundo a legislação para cálcio, fósforo e magnésio é de respectivamente 2:1:0,4.

A formulação utilizada com proporção de ativo utilizado (minerais) de 10% e de polímero de 90%, teve bom rendimento e boa eficiência de encapsulação.

Pode-se determinar que as microesferas possuem morfologia característica de microesferas feitas em *spray dryer*, sendo esféricas, algumas côncavas, de superfície lisa e polidispersas.

Em relação à umidade a formulação está próxima aos valores encontrados na literatura e adequado para a incorporação em matriz alimentar.

Pode-se perceber que quanto à difração de raio x, as amostras de microesferas desenvolvidas são amorfas.

Levando-se em conta os resultados positivos observados neste estudo, para futura utilização da formulação desenvolvida, sugere-se incluir análises para determinar o tamanho e a polidispersão das microesferas, sua biodisponibilidade *in vivo*, sua solubilidade em diferentes matrizes alimentares, informações sobre o grupo funcional da molécula, sua estabilidade, entre outros.

REFERÊNCIAS

ALVIM, I. D. **Produção e caracterização de micropartículas obtidas por Spray Drying e Coacervação Complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes.** 2005. 243 f. Dissertação (Doutorado de Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

ALVIM, I. D. et al. Comparisson between the spray drying and spray chilling microparticles contain ascorbic acid in a baked product application. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, p. 689-694, janeiro 2015.

AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Rev. Alim. Nutr.**, Araraquara, v.16 n.1, p.89 – 97, jan./mar. 2005.

BRASIL. Portaria nº31, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o “Regulamento técnico referente à Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais”. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.org.br =>. Acesso em: 15 de janeiro de 2016

BRASIL. Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o “**Regulamento Técnico para Fortificação de Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico**”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.org.br =>. Acesso em: 29 de janeiro de 2016.

BRASIL. Resolução - RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o “**Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais**”. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.org.br =>. Acesso em: 29 de janeiro de 2016.

BRINQUES, G. B. Bioquímica humana aplicada à nutrição. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2014.

BORDIGNON, C. V. M. Os minerais do corpo: uma visão interdisciplinar. **Arq. Apadec**, 7 (2): 61-63, 2003.

BOURGEAT-LAMI, E., How Particles. **Coloidal Polymers**, p. 212- 215, 2003.

Bronner F, Pansu D. Nutritional aspects of calcium absorption. **J Nutr** 1999;129(1):9-12.

COCATO, Maria Lucia et al. Avaliação por métodos in vitro e in vivo da biodisponibilidade de sulfato ferroso microencapsulado. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 20, n.3, p.239-247, June 2007. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732007000300002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 06 de dezembro de 2016

COMUNIAN, Talita Aline. **Microencapsulação de ácido ascórbico por coacervação complexa e dispositivos microfluídicos: estudo estrutural, estabilidade e aplicação das microcápsulas**. 2013. 190 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP.

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de minerais. **R. Nutr. Campinas**, 10(2): 87-98, jul./dez., 1997

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de nutrientes. SP: Manole, p. 67-175, 2007.

COZZOLINO, Sílvia Maria Franciscato. Deficiências de minerais. **Estud. av.**, São Paulo, v. 21, n. 60, p. 119-126, 2007. Disponível em:http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142007000200009&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 07 de setembro de 2016.

CRUZ, L. et al. Gastroresistant microparticles containing sodium alendronate prevent the bone loss in ovariectomized rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p.441-447, 2010.

DRUSCH, S.; SERFERT, Y.; HEUVEL, A. V. D.; SCHWARZ, K. Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose. **Food Research International**, Amsterdam, v. 39, n. 7, p. 807-815, 2006. Disponível em: <www.sciencedirect.com> Acesso em: 05 de fevereiro de 2017.

FAYAD, Samira J. **Obtenção e Caracterização de Micro e Nanopartículas a base de proteína isolada de soja**. 2010. 106.f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2010.

FAVARO-TRINDADE, C. S. et al. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Braz. J. Food Technol.**, v.11, n.2, p. 103-112, abr./jun. 2008.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 19, n. 4, p. 485-494, 2002.

FREIRE, Ana Cristina et al. Liberação específica de fármacos no cólon por via oral. II - Tipos de sistemas utilizados. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 337-355, Sept. 2006. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000300004&lng=en&nrm=iso>. access on 24 Oct. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322006000300004>.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, Métodos físico-químicos para análise de alimentos, ed.IV, 2005. Método 12/IV.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA. IBGE. POF 2008-2009. **Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Disponível em:http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/comentario.pdf. Acesso: 07 /set/2016.

KAILASAPATHY, K.; LAM, S. H. Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 15, n. 6-9, p. 929-939, 2005.

LYRA, Amanda M. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vivo* de sistemas de liberação microparticulados contendo Efavirenz**. 2016. 102.f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, 2016.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Recommended Dietary Allowances*. 10.ed. Washington DC: National Academy Press, 1989. 284p.

OLIVEIRA, O. W., PETROWICK P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p. 641-650, 2010.

PADOVANI, Renata Maria et al. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. **Rev. nutr**, v. 19, n. 6, p. 741-760, 2006.

PEDRAZA, Dixis Figueroa; DANTAS ROCHA, Ana Carolina. Deficiências de micronutrientes em crianças brasileiras assistidas em creches: revisão da literatura. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 5, 2016.

RAFFIN, R. et al. Development of HPMC and Eudragit S100® blended microparticles containing sodium pantoprazole. **Pharmazie**, v. 62, n. 5, p.361-364, 2007.

RIBEIRO, Beatriz Gonçalves, & SOARES, Eliane de Abreu. (2002). Avaliação do estado nutricional de atletas de ginástica olímpica do Rio de Janeiro e São Paulo. **Revista de Nutrição**, 15(2), 181-191. <https://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732002000200007>

ROCKLAND, L. B.; BEUCHAT, L. R. **Water Activity: Theory and Applications to Food**. Marcel Dekker, New York, Inc. 1987, 404 p.

SILVA, Catarina et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 1-20, mar. 2003. ISSN 1809-4562. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rbcf/article/view/43836>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2017.

SOSNIK A., Seremeta K. P., Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers, **Adv Colloid Interface Sci** (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2015.05.003>

VALDUGA, Eunice et al. Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva "Isabel" (*Vitis labrusca*). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1568-1574, set./out., 2008

VEIGA, Gloria Valeria da et al. Inadequação do consumo de nutrientes entre adolescentes brasileiros. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 47, supl. 1, p. 212s-221s, Feb. 2013. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102013000700007&lng=en&nrm=iso>. access on 25 Oct. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102013000700007>.