

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CAMPUS CAMPO MOURÃO - PARANÁ

GRYELE KAREN PIVA SILVA

**MICROPARTÍCULAS SÓLIDAS LIPÍDICAS: ESTUDO DE VARIÁVEIS
OPERACIONAIS E ENCAPSULAÇÃO DE VITAMINA D₃**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2014

GRYELE KAREN PIVA SILVA

**MICROPARTÍCULAS SÓLIDAS LIPÍDICAS: ESTUDO DE VARIÁVEIS
OPERACIONAIS E ENCAPSULAÇÃO DE VITAMINA D₃**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos da Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Campo Mourão, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves

CAMPO MOURÃO

2014



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Campo Mourão

Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos
Engenharia de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

MICROPARTÍCULAS SÓLIDAS LIPÍDICAS: ESTUDO DE VARIÁVEIS OPERACIONAIS E ENCAPSULAÇÃO DE VITAMINA D₃

por:

GRYELE KAREN PIVA SILVA

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 07 de Agosto de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves
Orientador

Membro da banca

Membro da banca

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se na Coordenação de Tecnologia e Engenharia de Alimentos da UTFPR Campus Campo Mourão.

À memória do meu avô Armelino Piva. À minha mãe
Angela Maria Piva e à minha avó Olinda Giroto
Piva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me deu coragem para questionar a realidade e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

A minha mãe Angela Maria Piva. Seu esforço, dedicação e sacrifício me colocaram onde estou. Seu amor, carinho e apoio, me fez continuar, sem ela não teria chegado tão longe. Obrigada por se doar inteira e renunciar aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar o meu, por compartilhar e alimentar o meu ideal, incentivando a prosseguir na jornada, está conquista é tão minha, quanto sua.

A minha avó Olinda Giroto Piva, que esteve presente em todos os momentos me ensinando o valor da família e do lar, que me colocou em suas orações e nos momentos mais difíceis me aconselhou da melhor maneira e me faz acreditar que era possível.

Ao meu avô Armelino Piva (*in memoriam*), por ter sido meu exemplo de homem/pai, por ter me acolhido e me mostrado que acima de tudo, o importante é ser feliz.

Ao meu irmão Alex Piva e minha cunhada Daniela Penasso por terem participado e terem contribuindo para que essa etapa da minha vida fosse concluída.

A minha sobrinha Emanuella Piva Penasso, meu maior incentivo para um futuro melhor. Nesses anos você foi minha maior saudade.

Agradeço a toda minha família pelo apoio, pela presença e preocupação ao longo desses anos. Principalmente a minha tia Creuza Piva.

A Jéssica Cintia Barbieri, a amizade que se concretizou nesses anos e tornou tudo mais fácil, agradável e divertido. Por sempre estar disposta a ajudar, pela cumplicidade, carinho e força. Foram muitos momentos de desesperos passados juntas como também muitas alegrias e loucuras compartilhadas, momentos esses que jamais serão esquecidos.

A Héliide Nelly Gomes, por sua amizade desde o início do curso, me apoiando e me fazendo rir, por ter compartilhado sua família que em vários momentos me acolheu. Obrigada também pela colaboração dado nos experimentos realizados.

A todos os colegas da faculdade, em especial a Maysa Formigoni e Isabela Manso pelo grande auxílio nos trabalhos e dificuldades no decorrer do curso.

A todos meus amigos de Japurá, por serem os melhores. Obrigada pela parceria e companheirismo de sempre, por serem quem são, tornando com certeza tudo mais fácil. Por torcerem pelo meu sucesso, comemorando todas as conquistas juntos, em especial a Gabriela Machry e Renan Juliani Nascimento por terem sido tão presentes ao longo desses anos.

A meu professor orientador Odinei Hess Gonçalves pela oportunidade, ensinamentos, dedicação e paciência, tornado esse trabalho real. Esse período foi de suma importância na minha formação.

Aos professores da UTFPR por terem ensinado que é preciso foco e dedicação para se tornar uma engenheira, em especial à banca examinadora pela atenção a este trabalho.

Muito Obrigada.

*"A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e
daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O
que ela quer da gente é coragem."*

Guimarães Rosa

RESUMO

SILVA, GRYELE KAREN PIVA. **Micropartículas sólidas lipídicas: estudo de variáveis operacionais e encapsulação de vitamina D₃**. 2014. 38f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

Micropartículas sólidas lipídicas podem ser prontamente obtidas a partir do método de dispersão a quente, onde um lipídio (sólido em temperatura ambiente) é derretido e disperso em água contendo um estabilizante, formando uma dispersão em água de gotas lipídicas. Após o resfriamento, essas gotas lipídicas se transformam em partículas, que podem ser secas e utilizadas como carregadores de compostos hidrofóbicos. Contudo, parâmetros como agitação, concentração dos componentes ou a presença de um segundo lipídio interferem na morfologia final das micropartículas e devem ser avaliados cuidadosamente. O objetivo do presente trabalho foi produzir micropartículas compostas de cera de carnaúba (lipídio sólido) e triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico (MCT, do inglês *medium-chain triglycerides*) e utilizá-las para encapsular Vitamina D₃. Foram avaliados o efeito sobre o tamanho das micropartículas da taxa de agitação, da concentração da fase lipídica e da relação mássica cera de carnaúba:MCT. Os resultados demonstraram influência sobre a faixa experimental avaliada para todos os parâmetros. As partículas foram utilizadas para encapsular Vitamina D₃, apresentando eficiência de encapsulação de 63%.

Palavras-chave: SLM, aditivos alimentares, cera de carnaúba, dispersão a quente, homogeneização a quente, triglicerídeos de cadeia média.

ABSTRACT

SILVA, GRYELE KAREN PIVA. **Solid lipid microparticles: a study of operating variables and encapsulation of vitamin D₃**. 2014. 38f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

Solid lipid microparticles can be readily obtained by the hot dispersion method. A lipid (solid at room temperature) is melted and dispersed in a stabilizer aqueous solution yielding lipid droplets suspended in water. Upon cooling, these droplets form micron-sized particles that can be dried and used as carriers for hydrophobic substances. However, parameters like stirring rate, compounds concentration and the presence of a second lipid influences the final particles morphology and must be carefully evaluated. The objective of this work was to obtain microparticles composed by carnauba wax as solid lipid and use them to encapsulate D₃ vitamin. The effect on the average particles size of the following experimental parameters were evaluated: stirring rate, the water:lipid phase mass ratio and the use of medium-chain triglycerides (MCT) as liquid lipid. Results demonstrated that these experimental parameters influenced the average particles size. D₃ vitamin was successfully encapsulated in the microparticles with an encapsulation efficiency of 63%.

Keywords: SLM, food additives, carnaúba wax, lipid hot dispersion, lipid hot homogenization, medium-chain triglycerides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da vitamina D3.....	4
Figura 2. Micropartículas lipídicas obtidas nos ensaios iniciais.....	12
Figura 3. Distribuição de tamanho das micropartículas em função da taxa de agitação.....	15
Figura 4. Distribuição de tamanho das micropartículas em função da fração mássica da fase dispersa.	15
Figura 5. Distribuição de tamanho das micropartículas em função da concentração de MCT (g/gfase dispersa).	16
Figura 6. Imagens de microscopia óptica das partículas obtidas com taxas de agitação de (a) 7000 e (b) 24000 rpm.	17
Figura 7. Imagens de microscopia óptica das partículas obtidas com frações de fase dispersa de (a) 0,15 e (b) 0,30.	18
Figura 8. Imagens de microscopia óptica das partículas obtidas com frações de fase dispersa de (a) 0% e (b) 30%.....	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros operacionais utilizados nos experimentos.	13
Tabela 2. Diâmetros médios para diferentes taxas de agitação.	14
Tabela 3. Diâmetros médios para diferentes frações de fase dispersa.	14
Tabela 4. Diâmetros médios para diferentes concentrações de MCT.	14

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1	MICROENCAPSULAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	2
2.2	ENCAPSULAÇÃO DE VITAMINA D ₃	3
3	OBJETIVOS	6
3.1	OBJETIVO PRINCIPAL	6
3.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	6
4	MATERIAIS E MÉTODOS	7
4.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO	7
4.2	MATERIAIS	7
4.3	OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	7
4.3.1	ADIÇÃO DE ÁGUA FRIA CONTENDO UM SURFACTANTE E AGITADOR MECÂNICO	8
4.3.2	RESFRIAMENTO EM BANHO DE GELO E DISPERSOR ULTRATURRAX ...	8
4.4	CARACTERIZAÇÃO	9
4.4.1	DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE MCT E VITAMINA D ₃	9
4.4.2	MORFOLOGIA E TAMANHO DAS MICROPARTÍCULAS	10
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
5.1	FORMULAÇÕES PRELIMINARES	11
5.2	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS SOBRE AS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS	13
5.3	ENCAPSULAÇÃO DA VITAMINA D ₃	21
6	CONCLUSÃO	22
7	REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

As perdas de vitaminas que ocorrem nos alimentos durante o seu processamento e armazenamento levaram à prática de adicionar tais vitaminas aos alimentos processados, de modo a recompor os teores originais e a reduzir deficiências nutricionais na população (LIBERATO & PINHEIRO-SANT'ANA, 2006).

A legislação brasileira define o termo aditivo alimentar como "toda a substância, quer tenha ou não valor nutritivo, que por si só não é normalmente gênero alimentício nem ingrediente característico de um gênero alimentício, mas cuja adição intencional, com finalidade tecnológica ou organoléptica, em qualquer fase de obtenção, tratamento, acondicionamento, transporte ou armazenagem de um gênero alimentício, tem como consequência, quer a sua incorporação nele ou a presença de um seu derivado, quer a modificação de características desse gênero" (ANVISA, 1998).

O desenvolvimento de novas técnicas de microencapsulação tem aberto possibilidades para a indústria alimentícia a fim de favorecer a proteção e manter a estabilidade de aditivos alimentares. Várias vitaminas são altamente oxidáveis, podendo através da encapsulação se beneficiar, pois, além de aumentar a estabilidade desses compostos, pode ainda mascarar possíveis sabores ou odores estranhos (BRAZEL, 1999).

Estima-se que 1 bilhão de pessoas no mundo têm deficiência de vitamina D₃. A deficiência de vitamina D₃ acontece principalmente em países em desenvolvimento e pode causar raquitismo. A principal fonte de vitamina D₃ para a maioria da população vem da exposição ao sol, com uma pequena quantidade adquirida a partir de alimentos e suplementos (HOLICK, 2009).

A encapsulação da vitamina D₃ vem sendo estudada como uma estratégia para diminuir a incidência de problemas de saúde associados à sua falta no organismo. O uso de encapsulantes lipídicos é interessante, pois estes são biocompatíveis e podem ser adicionados como aditivos alimentares.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROENCAPSULAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Como os alimentos estão sujeitos a vários fatores que interferem na sua composição natural, como temperatura, oxidação e exposição a microrganismo, os aditivos são úteis para manter sua integridade, segurança, características e qualidade. Portanto, as principais razões para o seu uso em alimentos é manter a consistência do produto, manter ou melhorar o valor nutricional, manter a palatabilidade, aumentar a maciez, controlar o pH e melhorar sabor ou cor. Além disso, podem ser também adicionados vitaminas e minerais na tentativa de enriquecê-los, mantendo ou melhorando o valor nutricional dos alimentos industrializados (VELLOZO; FISBERG, 2010; PORTO, 2010; NILSON; PIZA, 1998).

A microencapsulação na indústria alimentícia vem solucionando certas limitações no emprego de ingredientes, visto que pode reduzir *off-flavors* produzidos por certas vitaminas e minerais; mascarar compostos de sabor indesejável; melhorar sua incorporação em sistemas secos; permitir a liberação controlada; melhorar a estabilidade a extremos de temperatura, pH e umidade; reduzir a reatividade dos nutrientes com outros ingredientes; reduzir a volatilidade; retardar alterações que podem resultar em perda de aroma, alteração de cor ou perda do valor nutricional (DESAI; PARK, 2005; SCHROOYEN et. al., 2001; DZIEZAK, 1988).

A natureza do material encapsulante é um fator importante na estabilidade dos compostos encapsulados (ROSENBERG et al., 1990). Para a escolha deste material devem ser considerados fatores como: propriedades físicas e químicas (porosidade, solubilidade, viscosidade, compatibilidade mecânicas, transição vítrea, capacidade de formação de filme, compatibilidade entre encapsulado e encapsulante e fatores econômicos (BRAZEL, 1999). Além disso, os materiais encapsulantes devem ser inertes, isentos de impurezas, além de ser biodegradáveis e biocompatíveis, não carcinogênicos, não alergênicos e não mutagênicos, devendo causar pouca ou nenhuma resposta imunológica além de ser capaz de aprisionar concentrações adequadas e suficientes do composto a ser encapsulado (URBAN,

et. al., 2009). Dentre os principais materiais utilizados nas microencapsulação de alimentos estão o amido ou seus derivados, proteínas, gomas, lipídios, ou combinações entre estes agentes (SHAHIDI; HAN, 1993). Atualmente há inúmeros métodos de se encapsular substâncias (TIWARI et. al., 2010; DESAI; PARK, 2005) e sua escolha depende do tipo do material ativo, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para a sua ação (SILVA et. al., 2003).

O uso de encapsulantes lipídicos oferece vantagens na encapsulação de aditivos alimentares, principalmente devido ao fato de serem biocompatíveis e/ou biodegradáveis. Em geral, as técnicas de obtenção de micropartículas ou microcápsulas lipídicas não requerem a adição de solventes que poderiam contaminar o produto final. As técnicas mais bem estabelecidas na literatura para a obtenção de micropartículas lipídicas são a dispersão a quente (ou homogeneização a quente) e o *spray chilling/spray congealing* (SABATINO et. al., 2012; UMEYOR et. al., 2012;). A primeira apresenta a vantagem de utilizar equipamentos mais simples enquanto na segunda não é necessária a presença de água para dispersar a fase lipídica.

Nanjwade et. al. (2011), obtiveram micropartículas lipídicas compostas de monoestearato de glicerila e um homogeneizador do tipo rotor-estator (Ultra Turrax) e obtiveram partículas da ordem de 20 micrômetros. Formulações onde o dispersor Ultra Turrax não foi utilizado não se mantiveram estáveis após a preparação. Frederiksen e colaboradores (2003) utilizaram um homogeneizador à alta pressão para produzir micropartículas de Compritol 888 ATO, éster lipídico com ponto de fusão de cerca de 70 °C. Foram obtidos diâmetros médios entre 1 e 100 micrômetros, dependendo da formulação utilizada.

2.2 ENCAPSULAÇÃO DE VITAMINA D₃

A Vitamina D₃ (coleciferol, Figura 1) é um hormônio esteróide lipossolúvel produzido na pele na presença de raios Ultra Violetas ou ingerido a partir de fontes dietéticas. Possui duas formas principais, a vitamina D₃ (coleciferol) ou vitamina

D₂ (ergocalciferol). Já é evidenciado que a vitamina D₃ é de grande importância e sua deficiência está associada a uma vasta gama de doenças, tais como doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose, raquitismo, osteomalacia e hiperparatiroidismo secundário e cancro. Vários estudos demonstraram que a vitamina D₃ pode potencialmente induzir a apoptose e inibir a angiogênese e também a invasão tumoral e metástases (DOMINGUES, 2013).

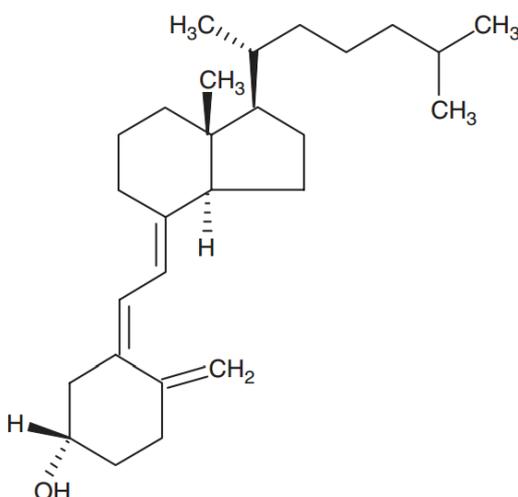


Figura 1. Estrutura química da vitamina D₃ (PETRITZ et. al., 2006).

A encapsulação de vitaminas lipossolúveis foi revisada por Gonnet e colaboradores (GONNET et. al., 2010). A Vitamina D₃ pode ser encapsulada por diversos mecanismos como emulsões e microemulsões, precipitação isoelétrica de isolado protéico de soja, coacervação de proteínas de soro de leite (ABBASI et. al., 2014) ou extrusão com maltodextrina como encapsulante (PETRITZ et. al., 2006).

ALMOUZEN et. al. (2013), encapsularam vitamina D₃ e derivados biologicamente ativos em nanopartículas de poli(L-D-ácido láctico) através da técnica de nanoprecipitação. Os autores relataram altos valores de eficiência de encapsulação, contudo é preciso levar em conta as baixas concentrações de vitamina D avaliadas (0,025% em massa). Os experimentos indicaram que o uso de triglicerídeos de cadeia média como dos ácidos cáprico, caprílico e succínico na formulação das nanocápsulas levou ao aumento da eficiência de encapsulação e os

autores atribuíram esse resultado ao fato de a vitamina D₃ ter mais afinidade por esses triglicerídeos do que pelo poli(L-D-ácido láctico).

A encapsulação da vitamina D₃ utilizando o método de dispersão a quente precisa ser melhor estudada, pois este vem sendo empregado com sucesso para encapsular outros compostos lipofílicos e tem potencial de apresentar bons resultados para a Vitamina D₃.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Obter micropartículas lipídicas biocompatíveis compostas de cera de carnaúba através do método de dispersão a quente.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Caracterizar as micropartículas em relação à distribuição de tamanhos e morfologia;
- Avaliar a influência da taxa de agitação, da quantidade de fase lipídica utilizada e do uso de um lipídio líquido (triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico) sobre o tamanho médio das micropartículas;
- Encapsular vitamina D3 nas micropartículas e avaliar a eficiência de encapsulação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) *campus* Campo Mourão.

4.2 MATERIAIS

Ácido esteárico (Sigma-Aldrich), cera de carnaúba (Sigma-Aldrich) e triglicerídeos de ácidocáprico/caprílico (MCT, *médium chaintriglycerides*) foram utilizados como lipídio sólido e líquido na formulação das micropartículas, respectivamente. Caseinato de sódio (Sigma-Aldrich) e Tween 80 (Vetec) foram utilizados como surfactante. Água destilada foi utilizada como meio contínuo. Vitamina D₃ em solução de triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (Addera D3, FARMASA) contendo 3300 UI/mL (82,5 µg/mL) foi utilizada nos experimentos conforme recebida quando indicado.

4.3 OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

Foram utilizados dois procedimentos distintos, conforme indicação ao longo do texto. Ambos se baseiam em um lipídio que é sólido na temperatura ambiente, mas pode ser derretido sob aquecimento. Este é derretido e disperso em água quente sob forte agitação, para formação de gotas lipídicas. Essas gotas são então resfriadas abaixo do ponto de fusão lipídio, resultando em micropartículas sólidas. Os dois procedimentos se diferenciam na forma como o resfriamento é feito.

4.3.1 ADIÇÃO DE ÁGUA FRIA CONTENDO UM SURFACTANTE E AGITADOR MECÂNICO

O lipídio sólido (5 g de ácido esteárico) e 5 g de triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (MCT) foram pesados diretamente no reator e este foi conectado ao banho termostático (DIST-Mod-DI-950M) a 75°C (para o ácido esteárico). O lipídio sólido foi derretido por 5 minutos. Para a dispersão da fase aquosa, 2,4 g de Tween 80 foi dissolvido em 200 g de água. Esta foi aquecida na mesma temperatura do banho termostático e adicionada no reator encamisado sob agitação mecânica (400 rpm), que foi mantida por 10 minutos. A água de resfriamento foi obtida dissolvendo 2,4 g de Tween 80 em 200 g de água a 5°C. Passados os 10 minutos, a água de resfriamento foi adicionada ao reator e a agitação foi mantida por 1 minuto. A temperatura final atingida foi 40°C.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando a cera de carnaúba como lipídio sólido e a temperatura do banho termostático utilizada foi de 90°C, assim como a temperatura da fase aquosa.

4.3.2 RESFRIAMENTO EM BANHO DE GELO E DISPERSOR ULTRATURRAX

O lipídio sólido (cera de carnaúba) e os triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (MCT) ou a Vitamina D₃ em solução de MCT foram pesados diretamente no reator e este foi conectado ao banho termostático (DIST-Mod-DI-950M) a 90°C. O lipídio sólido foi derretido por 5 minutos. Para a dispersão da fase aquosa, 0,0525 g de caseinato de sódio foi dissolvido em 50 g de água. Esta foi aquecida na mesma temperatura do banho termostático e adicionada no reator encamisado sob agitação do dispersor Ultraturrax (IKA, T25), que foi mantida por 10 minutos. Imediatamente após esse tempo, a dispersão foi descarregada em um Becker e resfriada em banho de gelo até atingir 30°C.

4.4 CARACTERIZAÇÃO

4.4.1 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE MCT E VITAMINA D₃

As quantidades de MCT e vitamina D₃ realmente encapsulada foram determinadas por espectrofotometria UV-Vis (Oceanoptics, UV-RED TIBE USB 650 UV). Contudo, o espectro da cera de carnaúba e do MCT se sobrepõe o que impede que a concentração de MCT seja determinada por calibração univariada simples. Há a necessidade de separar os espectros a fim de que as concentrações sejam avaliadas. Para tanto, espectros UV-Vis de soluções de MCT em clorofórmio (24,045; 19,236; 14,427; 9,618; 4,809 e 0,962 mg_{MCT}/mL) foram obtidos e utilizados para construir uma curva de calibração. Uma amostra das micropartículas foi lavada com etanol absoluto em filtro quantitativo e seco em estufa de circulação forçada até massa constante. Uma alíquota foi dissolvida em clorofórmio e analisada por UV-Vis.

O espectro resultante foi tratado pela técnica de MCR-ALS e o pico a 242 nm referente ao MCT foi utilizado para calcular a eficiência de encapsulação do MCT através da Equação 1, onde [MCT]_{adicionada} se refere à concentração adicionada na formulação e [MCT]_{encapsulada} se refere à concentração presente nas micropartículas determinada por UV-Vis.

$$EE(\%) = \frac{[MCT]_{encapsulada}}{[MCT]_{adicionada}} \times 100 \quad (1)$$

A concentração de Vitamina D₃ encapsulada foi determinada indiretamente a partir da eficiência de encapsulação de MCT, sabendo que a concentração da vitamina é de 82,5 µg/g_{MCT}.

4.4.2 MORFOLOGIA E TAMANHO DAS MICROPARTÍCULAS

Após a correção do pH, serão obtidas imagens por microscopia ótica do microscópio (BIOVAL, L2000A), com câmera acoplada ao computador (DCM130E).

O formato das micropartículas foi avaliado visualmente e o tamanho médio foi determinado utilizando um software analisador de imagens apropriado após a medição de no mínimo 250 partículas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FORMULAÇÕES PRELIMINARES

A Figura 2 apresenta imagens de microscopia ótica das micropartículas utilizando o procedimento descrito no item 4.3.1, onde foi utilizado um agitador mecânico de hélices e ocorreu a adição de uma solução aquosa de surfactante diretamente no meio reacional para solidificação das partículas. Na primeira foi utilizado ácido esteárico e na segunda, cera de carnaúba, mantidos os demais componentes constantes. Nesses experimentos, foi utilizado MCT sem vitamina D₃.

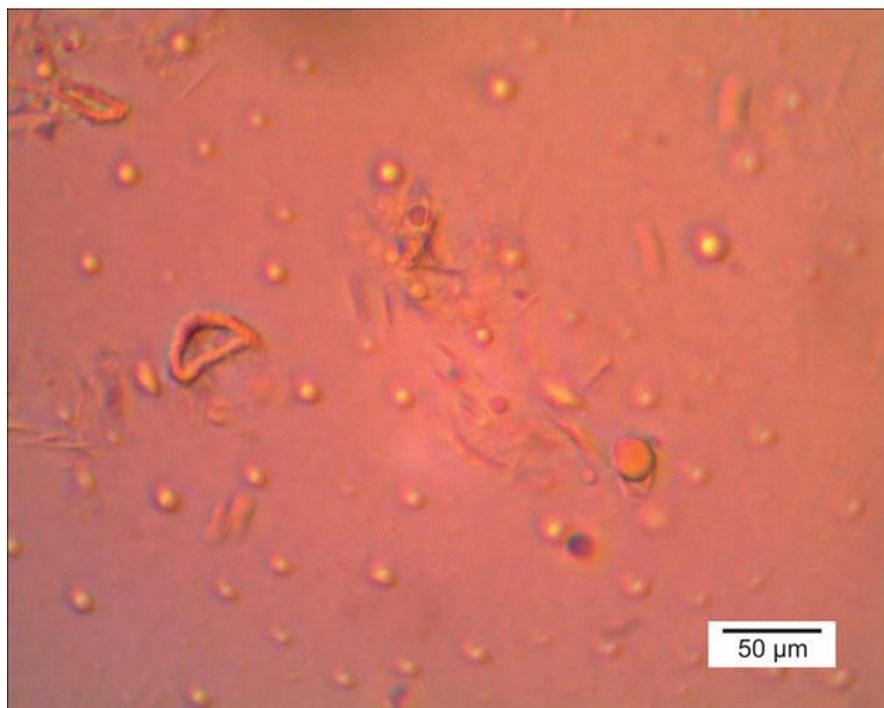


Figura 2. Micropartículas lipídicas obtidas nos ensaios iniciais, com ácido esteárico e adição de fase aquosa fria.

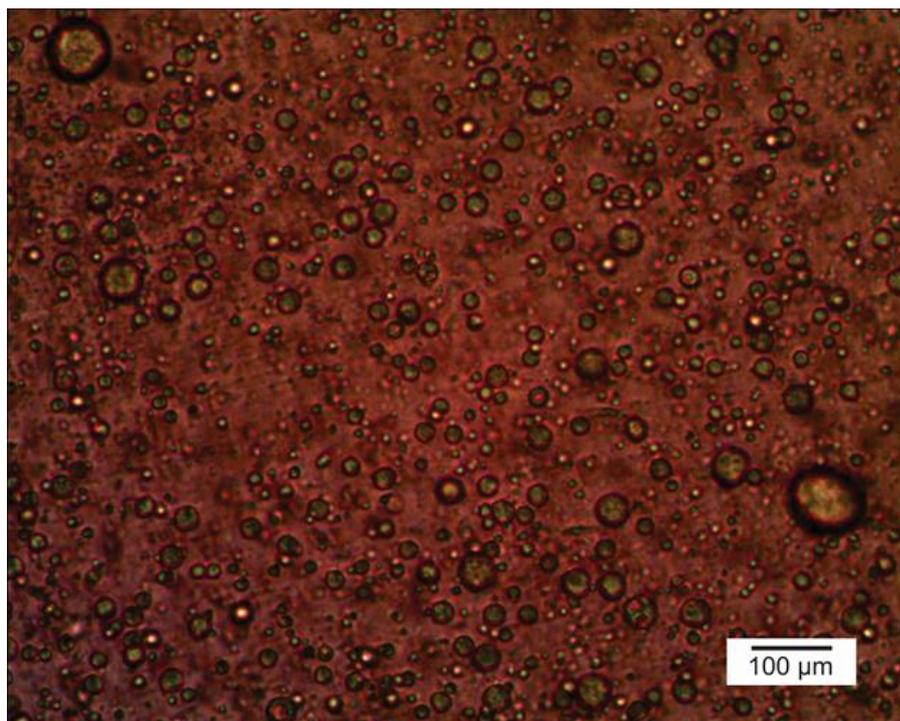


Figura 3. Micropartículas lipídicas obtidas nos ensaios iniciais com cera de carnaúba e adição de fase aquosa fria.

É possível observar que o uso de ácido esteárico (Figura 2) levou à formação de partículas com morfologia do tipo casca e núcleo e outras com formato de espícula. Também se observa a presença de gotas oleosas, provavelmente compostas de MCT (que é líquido na temperatura ambiente) que não foi efetivamente encapsulado no lipídio sólido. O ponto de fusão do ácido esteárico é baixo (65°C) quando comparado ao da cera de carnaúba (85°C), o que deve favorecer a formação de partículas mais irregulares no caso do ácido esteárico.

Quando o mesmo procedimento foi aplicado à cera de carnaúba, partículas de morfologia aproximadamente esférica foram obtidas (Figura 3), contudo a quase totalidade das partículas não apresenta a morfologia do tipo casca e núcleo, onde uma casca sólida formada pela cera de carnaúba envolve o núcleo líquido formado pelo MCT.

Dessa forma, essa metodologia não parece adequada para a obtenção das micropartículas, por levar à perda de parte do lipídio líquido e pela necessidade de adicionar mais água, diminuindo o rendimento do processo. Um novo procedimento

experimental foi proposto, onde o resfriamento das partículas é feito pela imersão em banho de gelo, sem a necessidade de água adicional.

5.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS SOBRE AS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS

Nesses experimentos, foi utilizado o procedimento descrito no item 4.3.2. Também aqui, utilizou-se MCT sem vitamina D₃.

A Tabela 1 apresenta os experimentos realizados e os respectivos parâmetros experimentais que foram avaliados.

Nas Tabelas 2, 3 e 4 são apresentados os resultados de diâmetro médio das micropartículas avaliando o efeito da agitação, da fração de fase dispersa e da concentração de MCT.

Os histogramas das distribuições de tamanhos das micropartículas são apresentadas nas Figuras 4, 5, 6, 7 e 8.

Imagens das micropartículas são apresentadas nas Figuras 9, 10, 11 e 12.

Tabela 1. Parâmetros operacionais utilizados nos experimentos.

Experimentos	Agitação (rpm)	Fração de fase dispersa (g/g_{total})	[MCT] (g/g_{fase dispersa})
0204	16000	0,05	0,3
0105	24000	0,05	0,5
0205	16000	0,15	0,5
0305	16000	0,30	0,5
0405	16000	0,05	0,0
0505	7000	0,05	0,5

Tabela 2. Diâmetros médios para diferentes taxas de agitação.

Taxa de agitação	Diâmetro médio (μm)	Desvio padrão da média (μm)
7000	36,4	1,3
24000	25,3	0,7

Tabela 3. Diâmetros médios para diferentes frações de fase dispersa.

Fração de fase dispersa ($\text{g/g}_{\text{total}}$)	Diâmetro médio (μm)	Desvio padrão da média (μm)
0,15	31,0	1,0
0,30	41,0	1,1

Tabela 4. Diâmetros médios para diferentes concentrações de MCT.

[MCT] ($\text{g/g}_{\text{fase dispersa}}$)	Diâmetro médio (μm)	Desvio padrão da média (μm)
0,0	30,2	1,4
0,3	23,0	0,7

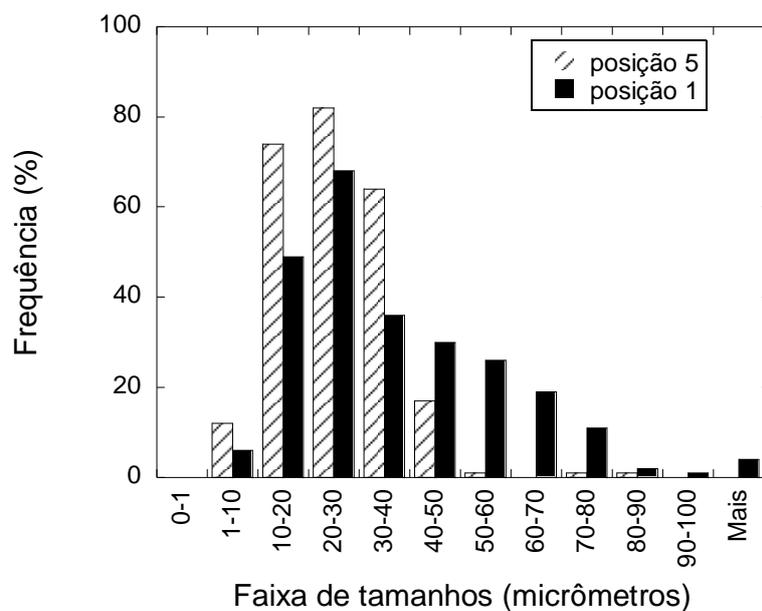


Figura 4. Distribuição de tamanho das micropartículas em função da taxa de agitação.

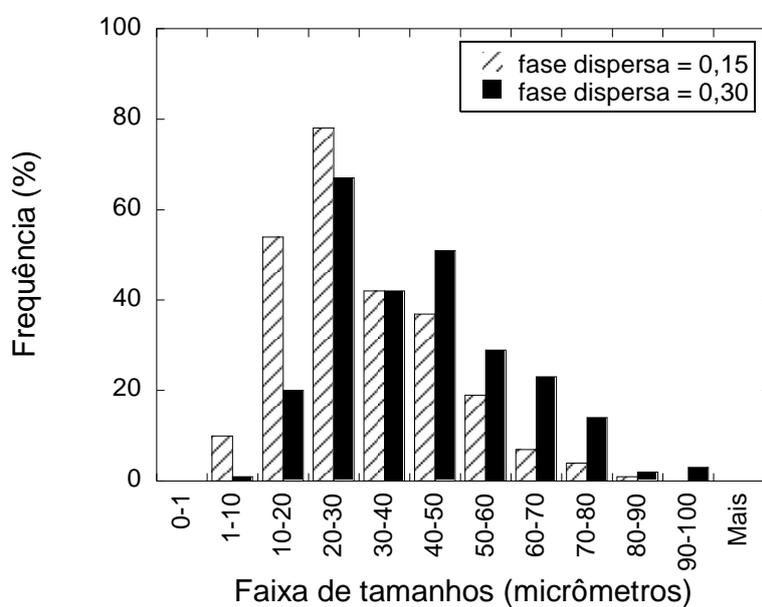


Figura 5. Distribuição de tamanho das micropartículas em função da fração mássica da fase dispersa.

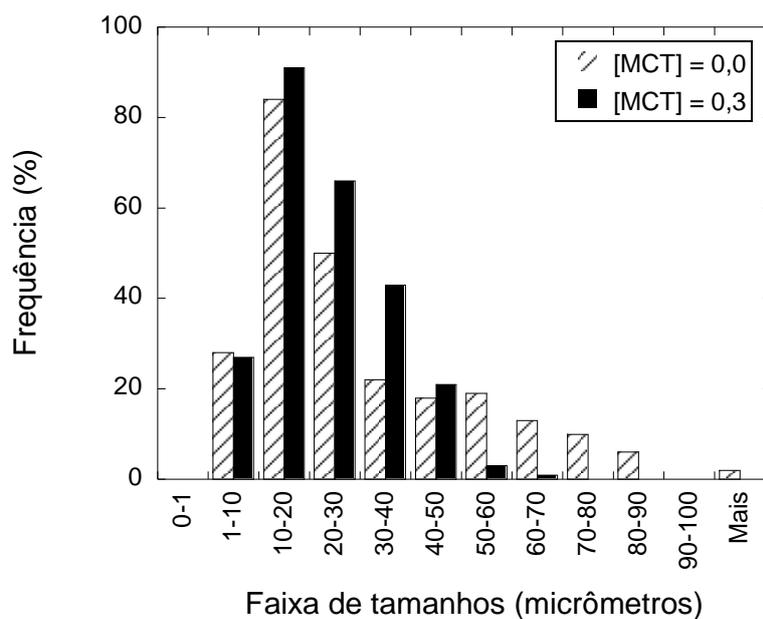


Figura 6. Distribuição de tamanho das micropartículas em função da concentração de MCT (g/g fase dispersa).

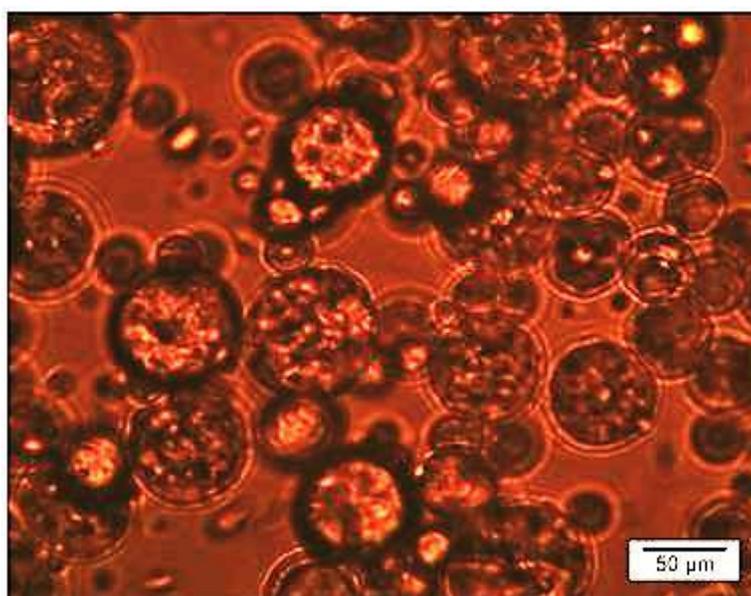


Figura 7. Imagens de microscopia óptica das partículas obtidas com taxas de agitação de 7000 rpm.

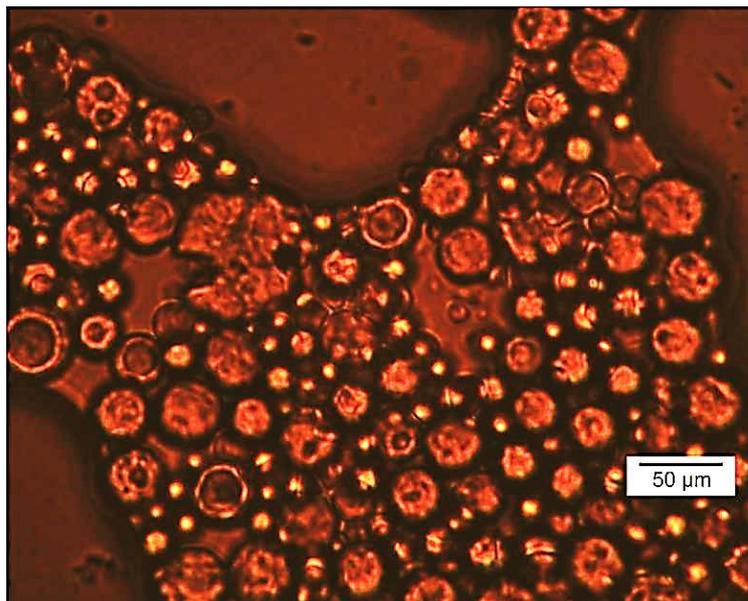


Figura 8. Imagens de microscopia óptica das partículas obtidas com taxas de agitação de 24000 rpm.

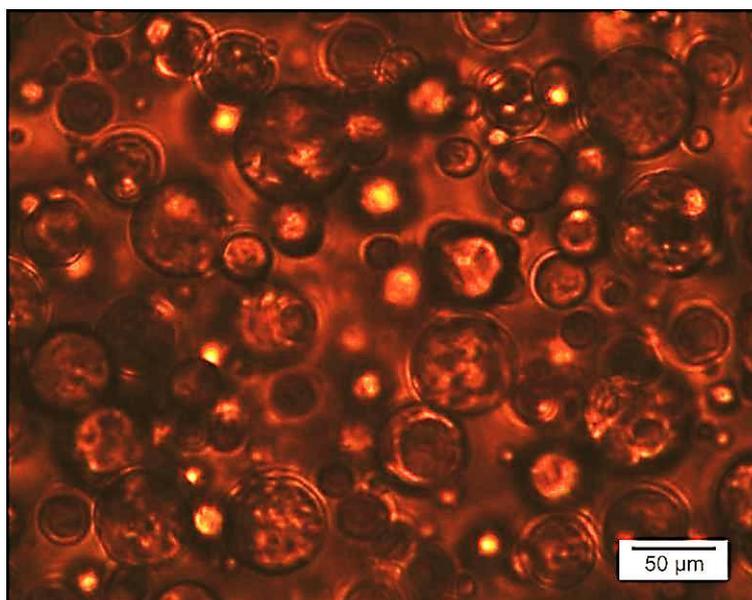


Figura 9. Imagens de microscopia óptica das partículas obtidas com frações de fase dispersa de 0,15.

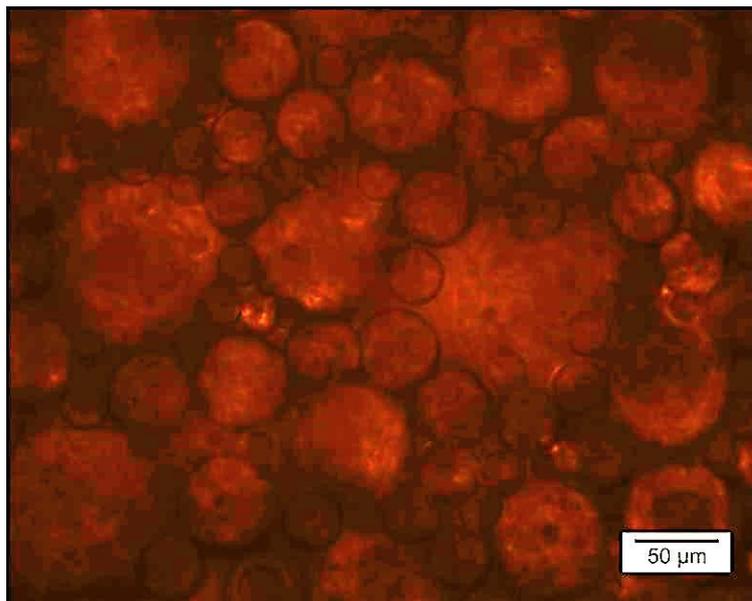


Figura 10. Imagens de microscopia óptica das partículas obtidas com frações de fase dispersa de 0,30.

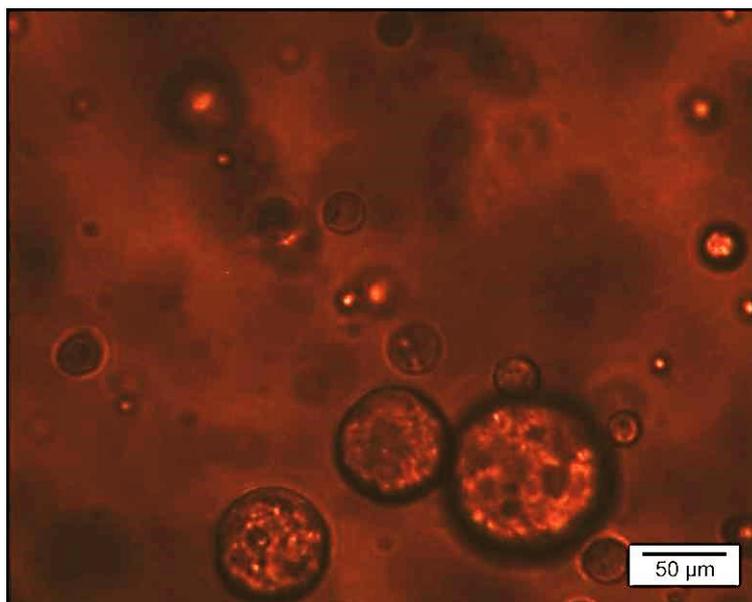


Figura 11. Imagens de microscopia óptica das partículas obtidas com frações de fase dispersa de 0%.

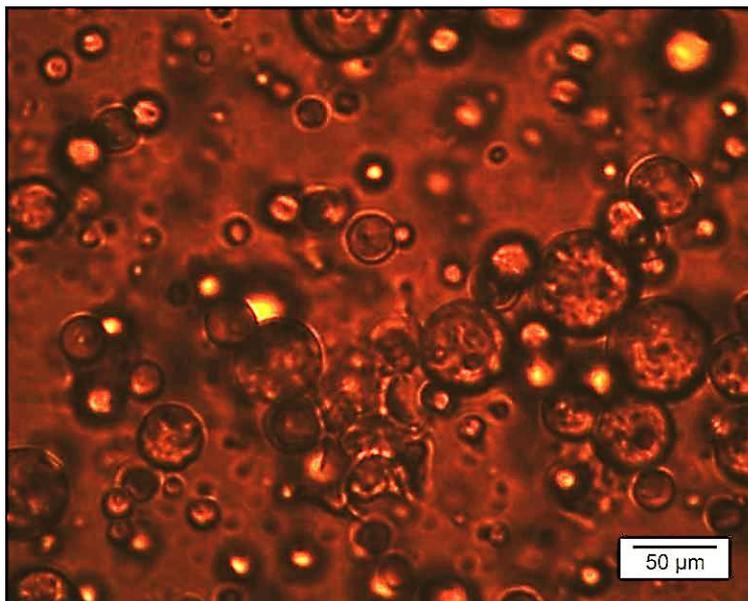


Figura 12. Imagens de microscopia óptica das partículas obtidas com frações de fase dispersa de 30%.

É importante notar que em um sistema de gotas lipídicas dispersas em água na presença de um surfactante, o tamanho final depende da relação entre o quebramento e a coalescência dessas gotas (YUAN et. al., 1991; SOVOVÁ, 1981).

Elas tendem a quebrar quando se chocam com o agitador formando gotas menores e tendem a juntar-se para formar gotas maiores quando estão próximas das paredes do recipiente, por ser esta uma região de baixa turbulência. Quando o sistema é resfriado, as gotas lipídicas se solidificam, dando origem às partículas.

Em vista disso, observa-se que o tamanho das micropartículas diminuiu com o aumento da taxa de agitação, dentro das condições experimentais avaliadas (Tabela 2). Isso ocorreu porque quanto maior a taxa de agitação, mais energia está disponível para o quebramento das gotas quando estas se chocam com o agitador, resultando em uma diminuição do tamanho médio final, conforme descrito por Chatzi e Kiparissides (1994).

Na Figura 4 nota-se que ocorreu um espalhamento na curva de distribuição dos tamanhos com o aumento da agitação, o que não é desejado no caso de encapsulação de compostos, já que a eficiência de encapsulação e a liberação controlada variam com o tamanho das micropartículas.

Para o aumento da fração de fase dispersa (ou seja, a relação entre a quantidade de fase lipídica em relação à fase aquosa contínua) foi observado um aumento do tamanho médio. Isso pode ser explicado pelo fato de que o tamanho final depende da frequência com que as gotas lipídicas se chocam entre si, provocando a junção de duas gotas menores em uma gota maior (KONNO et. al., 1982). Quanto mais fase dispersa estiver presente, maior é a frequência desses choques, levando à formação de gotas e partículas cada vez maiores. Esse aumento ficou evidente no gráfico de distribuição de tamanhos (Figura 5), onde a distribuição foi deslocada para a região de maiores tamanhos com o aumento da fração de fase dispersa.

Finalmente, o uso do MCT (triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico) levou à diminuição do tamanho médio das micropartículas. O uso do MCT provavelmente causou uma diminuição da viscosidade da fase dispersa, devido a ser este um lipídio líquido tanto na temperatura ambiente quanto na temperatura em que as micropartículas são obtidas. Gotas lipídicas de baixa viscosidade tendem a quebrar mais facilmente quando se chocam com o agitador, facilitando a formação de gotas e partículas menores (Figura 7 e 8).

Em relação à morfologia das micropartículas, em todas as condições experimentais estas se apresentaram com formato esférico e regular. Na Figura 11, onde não foi adicionado o lipídio líquido, que existem manchas nas partículas, provavelmente devido a rugosidades na sua superfície. Nas formulações onde o MCT foi utilizado, é possível observar a morfologia do tipo casca e núcleo, onde uma casca sólida formada pela cera de carnaúba envolve o núcleo líquido formado pelo MCT. Estruturas com vários núcleos líquidos dispersos na matriz sólida da partícula também podem ser observadas. Esses dois tipos de estruturas complexas são interessantes do ponto de vista de encapsulação de compostos, visto que a solubilidade de substâncias sólidas é em geral baixa na fração sólida da partícula, mas pode ser maior na fase líquida.

5.3 ENCAPSULAÇÃO DA VITAMINA D₃

Após o estudo das variáveis operacionais envolvidas na obtenção das micropartículas lipídicas, um experimento foi realizado a fim de encapsular a vitamina D₃ com a seguinte formulação: 50g de água destilada, 0,0525 g de caseinato de sódio como surfactante, 1,25g de cera de carnaúba e 1,25g de MCT contendo vitamina D₃ (82,5 µg/g MCT). O procedimento experimental foi aquele descrito no item 4.3.2, escolhido devido ao fato de produzir partículas esféricas com morfologia do tipo casca e núcleo, conforme visto nas Figuras 5 a 7.

A eficiência de encapsulação calculada pela Equação 1 foi de 63%, resultando em uma concentração de vitamina D₃ de 26,2µg/g de micropartículas. Levando em conta que a recomendação de ingestão diária de vitamina D₃ é de 600 UI/dia ou 15µg/dia (IOM, 2011), a ingestão de aproximadamente 0,58 g das micropartículas adicionado na alimentação pode suprir a necessidade diária dessa vitamina. Vale ressaltar que todos os componentes das micropartículas são biocompatíveis e considerados “*Generally Accepted as Safe- GRAS*” pelo *Food and Drug Administration* (FDA, 1978).

6 CONCLUSÃO

Micropartículas de cera de carnaúba foram obtidas pela técnica de homogeneização a quente em diferentes condições experimentais. Maiores taxas de agitação, fração de fase dispersa e concentração de triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (MCT), favoreceram a formação de partículas de tamanhos maiores. As micropartículas apresentaram morfologia esférica e do tipo casca-e-núcleo, onde uma casca sólida de cera de carnaúba se formou sobre um ou mais núcleos líquidos de MCT. Uma das formulações foi escolhida para a encapsulação de vitamina D₃, alcançando eficiência de encapsulação de 63% e concentração de vitamina D₃ de 26,2 µg/g de micropartículas.

7 REFERÊNCIAS

ABBASI, A. et. al. Stability of Vitamin D₃ Encapsulated in Nanoparticles of Whey Protein Isolate. **Journal Food Chemistry**, v. 143, p. 379-383, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico Referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais. Republicada por ter saído com incorreção, do original. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, de 30 de março de 1998. Seção 1-E, p. 4. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/31_98.htm>. Acesso em: Dezembro de 2013.

ALMOUZEN, E. et al. Nano-encapsulation of Vitamin D3 Active Metabolites for Application in Chemotherapy: Formulation Study and in Vitro Evaluation. **Pharm. Res.**, v.30, p.1137–1146, 2013.

BRAZEL, C.S. Microencapsulation: Offering Solutions for the Food Industry. **Cereal Foods World**, v.44, n.6, p.388-393, 1999.

CHATZI, E. G.; KIPARISSIDES, C. Drop Size Distributions in High Holdup Fraction Dispersion Systems: Effect of the Degree of Hydrolysis of PVA Stabilizer. **Chemical Engineering Science**, v. 49, p. 5039-5052, 1994.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying Technology**, London, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

DOMINGUES, N. J. A. Carrier Systems for Vitamin D. **Dissertation for the degree Integrated Master in Bioengineering**. Faculty of Engineering University of Porto. Portugal, 2013.

DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and Encapsulated Ingredients. **Food Technology**, p. 136-151, 1998.

FREDERIKSEN H. K. et. al. Solid Lipid Microparticle Formulations of the Pyrethroid Gammacyhalothrin Incompatibility of the Lipid and the Pyrethroid and Biological

Properties of the Formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 86 p. 243–252, 2003.

FDA - Food and Drug Administration. Center for Food Safety & Applied. **Nutrition**, Fed Regist 63: 64222-64228, 1998. Disponível em: <<http://www.vf.cfsan.fda.gov>>. Acesso em: Julho de 2014.

GONNET, M. et. al. New Trends in Encapsulation of Liposoluble Vitamins. **Journal of controlled release**, v. 146, p 276-290, 2010.

HOLICK, Michael F. Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application. **Annals of Epidemiology**, v. 19, p. 73-78, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.annepidem.2007.12.001>>. Acesso em: Janeiro de 2014.

ILIC I. et. al. Microparticle Size Control and Glimepiride Microencapsulation Using Spray Congealing Technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 176-783, 2009.

IOM - INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. **Of The National Academies**, Washington, DC, 2011. Disponível em: <<http://migre.me/kznC6>>. Acesso em: Julho de 2014.

KONNO, M. et. al. The Effect of Stabilizer on Coalescence of Dispersed Drops in Suspension Polymerization of Styrene. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 15, p. 131-135, 1982.

LIBERATO, S. C.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Fortification of Industrialized Foods with Vitamins. **Revista de Nutrição**, Campinas, SP, v. 19, n. 2, p. 215-231, abr. 2006.

NANJWADE B. K. et. al. Development and Characterization of Solid-Lipid Microparticles of Highly Insoluble Drug Sirolimus. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, v. 3, n. 2, p. 11-15, 2011.

NILSON, A; PIZA, J. Food Fortification: A Tool for Fighting Hidden Hunger. **Food Nutr. Bull**, p. 49-60, 1998.

PETRITZ, E. et al. Determination of Phylloquinone and Cholecalciferol Encapsulated in Granulates Formed by Melt Extrusion. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 69, p. 101-112, 2006.

PORTO, A. A. **Contributo para a Estimativa da Prevalência da Ingestão de Edulcorantes Intensos num Grupo de Jovens Estudantes em Portugal Continental**. Tese de mestrado - Universidade de Lisboa, 2010. Disponível em: <<http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/2609/1/Tese%20FINAL.pdf>>. Acesso em: Janeiro de 2014.

ROSENBERG, M. et al. Factors Affect Ingredients in Spray-Drying Microencapsulation of Volatile Materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1288-1294, 1990.

SABATINO M. D. et. al. Spray Congealed Lipid Microparticles with High Protein Loading: Preparation and Solid State Characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 346-356, 2012.

SCHROOYEN P. M. M. et. al. Microencapsulation: Its Application in Nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p. 475-479, 2001.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of Food Ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SILVA, C. et. al. Administração Oral de Peptídeos e Proteínas: II. Aplicação de Métodos de Microencapsulação. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 1-9, 2003.

SOVOVÁ, H. Breakage and Coalescence of Drops in a Batch Stirred Vessel: II. Comparison of Model and Experiments. **Chemical Engineering Science**, v. 36, p. 1567-1573, 1981.

TIWARI, S. et al. Microencapsulation Techniques and its Application: A Review. **The Pharma Research**, p. 112-116, 2010.

UMEYOR C. E. et. al. Solid Lipid Microparticles (SLMS): An Effective Lipid Based Technology for Controlled Drug Delivery. **American Journal of Pharmatech Research**, v. 2, n. 6, p. 1-18, 2012.

URBAN, M. et al. Evaporation Techniques. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 210, p. 961-970. 2009.

VELLOZO, E. P.; FISBERG M. O Impacto da Fortificação de Alimentos na Prevenção da Deficiência de Ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 134-139, 2010.

YUAN, H. G. et. al. Suspension Polymerization. **JMS-Rev. Macromol. Chem. Phys** p. 215 – 299, 1991.