UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ORFA COLLAZOS PAUCAR

Encapsulação de colecalciferol (Vitamina D₃) por spray chilling

Pirassununga

2016

ORFA COLLAZOS PAUCAR

Encapsulação de colecalciferol (Vitamina D₃) por spray chilling

Versão corrigida

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

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade

Pirassununga

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

P323e Paucar, Orfa Collazos
 Encapsulação de colecalciferol (Vitamina D₃) por spray
 chilling / Orfa Collazos Paucar. -- Pirassununga, 2016.
 71 f.
 Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
 Departamento de Engenharia de Alimentos.
 Área de Concentração: Ciências da Engenharia de
Alimentos.

 Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro
Trindade.

 1. Microencapsulação 2. Vitamina D₃ 3. Estabilidade
4. Spray chilling 5. Liberação controlada. I. Título.

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – o autor”

Aos meus amados pais Ceferino e Simeona, meus exemplos de vida, por todos os ensinamentos, pelo apoio, incentivo e compreensão de minhas escolhas, para vocês dedico este trabalho. O sacrifício da distância não é nada perto da alegria isso me dá mais força para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente a Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida, por sempre me conduzir e guiar iluminando meu caminho e pela oportunidade de poder concluir mais uma etapa da minha carreira. Além disso colocando pessoas maravilhosas na minha vida.

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Carmen por todos os ensinamentos, pela paciência e confiança em mim, por sempre me atender com facilidade e por todas as conversas, aconselhando-me novos caminhos a seguir e principalmente pelo grande profissional exemplar que você é, que faz de você uma pessoa maravilhosa e amada por todos. Muito obrigada.

Quero agradecer a minha família (pais, irmãos) por todo o carinho, a torcida, porque mesmo de longe vocês acompanharam passo a passo mais uma etapa da minha vida, me dando conselhos e me apoiando, e isso me dá uma energia renovada.

Aos amigos membros da equipe Laprof por ter tido a oportunidade de conviver com vocês ao longo dessa caminhada. Marcelo obrigado pela paciência, por todo os ensinamentos e ajuda fundamental para a realização desse mestrado. Volnei, Fabricio, Talita, Júlia, Marluci, Andressa, Fernando, Lívia, Mariana e toda equipe Laprof muito obrigada! por todo o companheirismo, risadas, amizade e força durante o mestrado.

Aos amigos da pós-graduação de FZEA Carol, Manoela, Larissa, Carine, Cristina, Bárbara, Viviane, Paulo, Fernando, Luis, Walisson, Julio, Lenin por toda a companhia, amizade e outras amizades que conheci na FZEA Layla, Wagner, Jorge, Holmer, Henrique, Renan, Renata, Veronica, Jeferson, Silmar e Gonzalo.

Ao pessoal da Biblioteca principalmente Vanessa, Marcelo, Girlei, Patrícia e Auder.

A meus amigos de Seção de Cooperação Internacional FZEA Clélia e Raul.

Agradeço aos professores do ZEA que gentilmente compartilharam seus laboratórios para que esse trabalho se tornasse possível: Rosemary, Paulo José do Amaral Sobral, Cynthia e todos os outros que tive o prazer de conhecer aqui na FZEA.

Aos técnicos e especialistas de laboratório Carla Monaco, Rodrigo Lourenço e Camila por toda a ajuda durante a realização dos experimentos.

Ao Professor Júlio C. de Carvalho pela ajuda disponibilizada na análise estatística dos dados obtidos neste trabalho.

Agradeço aos professores Rogers Ribeiro e Eliana Setsuko pela oportunidade de participar do Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE) em sua disciplina.

Agradeço a toda comunidade FZEA que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço à PRONABEC (Perú) pela concessão da bolsa de mestrado.

Muito obrigada a todos.

“ Procuro semear otimismo e plantar sementes de paz e justiça. Digo o que penso, com esperança. Penso no que faço, com fé. Faço o que devo fazer, com amor. Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir. ”

Cora Coralina

BIOGRAFIA

Orfa Collazos Paucar, filha de Ceferino Collazos e Simeona Paucar, nasceu na cidade de Huanuco, Perú.

Graduada em Engenharia em Indústrias Alimentarias pela Universidade Nacional Agrária da Selva (Perú). Durante a graduação fez estágios em diversas indústrias e iniciação científica na área de Processamento de alimentos.

Entre a graduação e mestrado trabalhou em diversas indústrias e na área de certificação de Alimentos. Tem experiência em Auditorias de Sistemas Integrados de Gestão da Qualidade e segurança dos alimentos.

Em outubro de 2013 ingressou no mestrado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP).

RESUMO

PAUCAR, O. C. **Encapsulação de colecalciferol (Vitamina D₃) por spray chilling** 2016. 73 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

A indústria de alimentos está constantemente desenvolvendo produtos que fornecem, além de nutrientes, benefícios adicionais à saúde, tais como os enriquecidos com vitaminas. A vitamina D₃ (colecalciferol) é sintetizada na pele durante a exposição da luz solar, controla a homeostase de cálcio e fósforo, metabolismo ósseo, pressão arterial e reabsorção renal de cálcio. O processo de microencapsulação vem sendo bastante aplicado em alimentos e um dos objetivos principais é o controle da liberação do agente ativo no momento e local desejado. A tecnologia de *spray chilling* é interessante para a microencapsulação de vitaminas lipossolúveis. O objetivo deste trabalho foi microencapsular vitamina D₃, utilizando o método de *spray chilling* para a produção das micropartículas lipídicas sólidas (MLS). Para produção das MLS utilizou-se gordura vegetal com ponto de fusão em torno de 48 °C como carreador. Três tratamentos foram estabelecidos: sem aditivos (T1), com adição de 1% de cera de abelha (T2) e com 1% de lecitina de soja (T3). As micropartículas foram caracterizadas quanto à morfologia por microscopia eletrônica de varredura, tamanho médio por difração a laser, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e foi analisada a estabilidade da vitamina D₃ durante o armazenamento a 10 e 25 °C, por meio de quantificações periódicas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As micropartículas obtidas foram esféricas, semelhantes morfologicamente e com distribuição monocaudal de partículas. O tamanho médio das partículas variou em função dos seus ingredientes, sendo que as micropartículas produzidas apenas com vitamina e gordura foram menores em relação às demais (83,0% < 100 µm). A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) demonstrou que não ocorreu interação entre os ingredientes. A estabilidade da vitamina D₃ encapsulada foi satisfatória ao longo de 65 dias com valores superiores a 87% para os três tratamentos e a temperatura apresentou influência na estabilidade. As MLS produzidas com cera apresentaram melhores resultados de estabilidade de vitamina D₃ com valores de 90,18 ± 2,23 % após 65 dias de estocagem. Esses resultados são promissores e demonstram a

viabilidade da técnica de *spray chilling* na produção de MLS carregadas de vitamina D₃, possibilitando uma futura aplicação em alimentos.

Palavras-chave: Microencapsulação, vitamina D₃, estabilidade, *spray chilling*, liberação controlada.

ABSTRACT

PAUCAR, O. C. **Encapsulation Cholecalciferol (Vitamin D₃) by Spray Chilling**. 2016. 73 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The food industry is constantly developing products that provide, in addition to nutrients, additional health benefits such as enriched food with vitamins. Vitamin D₃ (cholecalciferol), which is synthesized in the skin during exposure of sunlight, controls the homeostasis of calcium and phosphorus, bone metabolism, blood pressure and renal reabsorption of calcium. The microencapsulation process has been widely applied in food and is a key objective to control the release of active agents at specific time and desired location. The spray chilling technology is interesting for microencapsulation of fat-soluble vitamins. The objective of this work was microencapsulating vitamin D₃ using the spray chilling method for the production of solid lipid microparticles (SLM). For the production of the SLM it was used vegetable fat with melting point around at 48 °C as a carrier. Three treatments were established: no additives (T1), 1% of beeswax (T2), and 1% soybean lecithin (T3). The morphology of microparticles was characterized by scanning electron microscopy, laser diffraction (average size) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Additionally, vitamin D₃ stability was examined during storage at 10 and 25 °C, through periodic measurements by High-performance liquid chromatography (HPLC). The microparticles obtained were spherical with similar morphology and unimodal size distribution. The average particle size varied according to composition wherein microparticles produced with vitamin and fat were lower than other (83.0% of particles smaller than 100 µm). Spectroscopy in the infrared (FTIR) showed that there was no interaction between the components. The stability of vitamin D₃ encapsulated was satisfactory over 65 days with values greater than 87% for the three treatments and temperature have any influence on the stability. The SLM produced with wax showed better stability for vitamin D₃ with values of 90.18 ± 2.23% after 65 days of storage. These results are promising and demonstrate the feasibility of spray chilling technique in the production of SLM loaded with vitamin D₃, allowing future application in foods.

Keywords: Microencapsulation, vitamin D₃, stability, spray chilling, controlled release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da vitamina D ₂ e vitamina D ₃	23
Figura 2 - Metabolismo da vitamina D ₃	25
Figura 3 - Apresentação de estruturas de partículas obtidas na microencapsulação.	33
Figura 4 - Esquema de um equipamento Spray Chiller.	37
Figura 5 - Amostras obtidas por Spray chilling contendo partículas carregadas de vitamina D ₃ atomizados (T1-T2) 65 °C; (T3) 90 °C, T1: apenas gordura e vitamina; T2: gordura, vitamina e cera; T3: gordura, vitamina e lecitina de soja).....	48
Figura 6 - Imagens obtidas por MEV das micropartículas lipídicas solidas carregadas de vitamina D ₃ (A e B - T1) (C, D - T2) (E e F - T3), observadas com aumento de 500x (A, C, E) e 1000x (B, D, F). T1: apenas gordura e vitamina; T2: gordura, vitamina e cera; T3: gordura, vitamina e lecitina de soja.....	51
Figura 7 - Distribuição de tamanho das micropartículas.....	54
Figura 8 - Espectros de infravermelho dos ingredientes das partículas	56
Figura 9 - Espectros de infravermelho das micropartículas.....	56
Figura 10 - Estabilidade da Vitamina D ₃ estocadas a 10 e 25 °C avaliado por 65 dias.	58
Figura 11 - Estabilidade da Vitamina D ₃ microencapsulada estocada a 10 °C (A) e 25 °C (B) e avaliada por 65 dias	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Recomendações da ingestão diária de vitamina D para indivíduos.....	30
Tabela 2 - Composição dos tratamentos.....	43
Tabela 3 - Concentração de vitamina D ₃ nos tratamentos.....	48
Tabela 4 -Diâmetro médio de volume (DMV) das micropartículas lipídicas sólidas carregadas com vitamina D ₃ produzidas por spray chilling	52
Tabela 5 - Estabilidade da vitamina D ₃ livre armazenada por 65 dias, nas temperaturas de 10 e 25 °C, expressa em % de retenção.....	57
Tabela 6 - Retenção (%) da vitamina D ₃ microencapsulada em período de 65 dias, nas temperaturas de 10 e 25 °C. Combinação temperatura - tratamento e tratamento - dia.....	59
Tabela 7 - Retenção (%) da vitamina D ₃ microencapsulada em período de 65 dias, nas temperaturas de 10 e 25 °C. Combinação temperatura - tratamento e temperatura - dia	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

D₃	Colecalciferol
D₂	Ergocalciferol
25OHD₃	25-hidroxivitamina D ₃
1,25(OH)₂D₃	1,25-dihidroxivitamina D ₃
PTH	Hormônio paratireoide
UI	Unidade Internacional
µg	Micrograma
g	Gramas
mg	Miligramas
cm	Centímetro
nm	Nanômetros

mm	Milímetros
µm	Micrômetros
mL	Mililitros
µl	Microlitros
min	Minutos
s	Segundos
T	Temperatura
°C	Graus Celsius
v	Volume
v/v	Proporção volume/volume
%	Porcentagem
UV	Ultravioleta
Kgf	Quilograma Força

rpm	Rotações por minuto
SAS	Statistical Analysis System
TR	Tempo de Retenção
MLS	Micropartículas lipídicas sólidas
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

SUMÁRIO

1 Introdução	19
2 Revisão Bibliográfica	22
2.1 Vitamina D	22
2.1.1 Metabolismo da vitamina D	24
2.1.2 Funções da vitamina D	26
2.1.3 Deficiência de vitamina D	27
2.1.4 Suplementação da vitamina D	31
2.2 Microencapsulação	32
2.3 <i>Spray Chilling</i>	36
2.4 Microencapsulação de vitamina D ₃	39
3 Material e métodos	42
3.1 Materiais	42
3.2 Tratamentos	42
3.3 Métodos	43
3.3.1 Produção das microcápsulas por <i>Spray Chilling</i>	43
3.3.2 Caracterização das micropartículas	44

3.3.2.1 Análise morfológica das partículas	44
3.3.2.2 Tamanho médio e distribuição de tamanho da partícula	45
3.3.2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	45
3.3.2.4 Quantificação de vitamina D ₃ por cromatografia líquida de alta eficiência	45
3.3.2.5 Avaliação da estabilidade da vitamina D ₃ livre e microencapsulada	46
3.3.3 Análise estatística	47
4 Resultados e discussão.....	48
4.1 Caracterização dos pós.....	48
4.2 Análise morfológica das MLS.....	49
4.3 Tamanho médio e distribuição do tamanho das partículas	52
4.4 Espectroscopia de Infravermelho com transformadas de fourier	54
4.5 Avaliação da estabilidade da vitamina D ₃ livre e microencapsulada	57
5 Conclusão	62
Referências.....	63

1 Introdução

O aumento de expectativa de vida da população está cada vez mais associado ao maior consumo de alimentos que promovem benefícios a saúde. O segmento de alimentos funcionais na indústria de alimentos esta em constante crescimento e vem recebendo cada vez mais interesse pelos consumidores, o que representa um importante desafio tecnológico para indústria. Os nutrientes, suplementos e compostos fitoterápicos podem se apresentar como uma alternativa à medicina moderna ou ferramenta complementar no tratamento e prevenção de doenças (BRAITHWAITE et al., 2014).

Alimentos funcionais são aqueles com ingredientes bioativos como vitaminas, minerais, ácidos graxos ômega 3, carotenoides, polifenóis, fibras alimentares, prebióticos, probióticos. Esses compostos são de naturezas diversas, têm diferentes benefícios fisiológicos e muitos são susceptíveis à degradação durante o processamento ou estocagem do produto alimentício. A prevenção de doenças através da dieta é uma oportunidade única para os chamados alimentos funcionais inovadores (SCHROOYEN; VAN DER MEER; DE KRUIF, 2001), levando ao desenvolvimento de pesquisas em áreas de indústrias de alimentos, cosméticos, nutracêuticos e farmacêuticos.

Vitamina D é um micronutriente essencial para a saúde humana, representada pelas formas de vitamina D₂ (ergocalciferol) e vitamina D₃ (colecalciferol). Esta vitamina vem sendo amplamente empregada na indústria de alimentos, produtos farmacêuticos e de cosméticos devido às suas inúmeras propriedades benéficas. O ergocalciferol é um esteróide encontrado em vegetais e é derivado do ergosterol por ação de raios ultravioleta da luz solar. O colecalciferol é sintetizado pela ação da luz solar sobre 7-deidrocolesterol na pele humana (HOLICK, 1994). A vitamina D é um pró-hormônio biologicamente inativo que sofre duas hidroxilações no organismo para tornar-se ativa, quando atua como um hormônio esteróide (HOLICK, 2004a). Esta vitamina é lipossolúvel.

Dentre as fontes dietéticas naturais de vitamina D, são poucos os alimentos que contêm uma quantidade substancial de vitamina D₃ como peixe e óleo de fígado de bacalhau (BYRDWELL, 2009). Além disso, como cada vez mais as pessoas se expõem menos ao sol, tem sido necessária a suplementação de vitamina D₃ para que o consumidor possa ingerir a dose recomendada. No entanto, esta vitamina é muito sensível a vários fatores ambientais, como por exemplo, luz, calor, oxigênio e umidade, que podem causar sua isomerização, afetando seu efeito biológico (BALLARD et al., 2007; LUO; TENG; WANG, 2012). Uma alternativa promissora para evitar a degradação desta vitamina seria sua encapsulação.

A tecnologia de microencapsulação tem sido utilizada com diversas finalidades na indústria de alimentos e farmacêutica tais como para melhorar a estabilidade de compostos susceptíveis à degradação por fatores ambientais como presença de oxigênio, luz, umidade, pH baixo, entre outros (ZUIDAM; SHIMONI, 2010).

A técnica de *spray-chilling* também designada como *spray congealing* ou *cooling* é muito conveniente para encapsulação de ingredientes alimentícios, pois trata-se de um processo físico, seguro, da simplicidade, rapidez do processo, de baixo custo, de fácil “scale up”, contínuo, que dispensa solvente na formulação e o emprego de altas temperaturas, tornando-se uma técnica viável ambientalmente e vantajosa para encapsulação de compostos bioativos termolábeis (FAVARO-TRINDADE; OKURO; MATOS, 2015). Estes são alguns dos atrativos associados à este processo de obtenção de micropartículas lipídicas sólidas que despertam o interesse por novos estudos (ALBERTINI et al., 2008).

A tecnologia de *spray chilling* consiste na atomização de uma mistura de material ativo e carreador fundido dentro de uma câmara mantida à temperatura abaixo do ponto de fusão do carreador. A atomização produz gotículas que se solidificam rapidamente ao entrar em contato com o ar frio, formando micropartículas (OKURO; MATOS; FAVARO-TRINDADE, 2013). A produção de partículas por este método tem sido aplicada em diversos segmentos como o farmacêutico, cosméticos, agrícola, veterinário e alimentício (CHAMBI et al., 2008).

A encapsulação da vitamina D₃ por *spray chilling* pode favorecer não apenas a redução de sua degradação durante o processamento e armazenamento do alimento, mas também pode auxiliar no mascaramento do sabor da vitamina D₃, possibilitar sua liberação controlada e protegê-la das condições adversas do meio.

A adição de vitamina D₃ encapsulada em alimentos pode torná-los alimentos funcionais ou nutracêuticos, além disso, a presença da gordura que compõe a matriz carreadora na partícula pode facilitar sua absorção no intestino.

O benefício da microencapsulação pode levar a uma maior eficiência, e liberação controlada de nutracêuticos, aumentando assim a bioatividade e diminuindo os efeitos colaterais decorrentes da hipervitaminose devido à alta administração desta vitamina (GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010), já que a encapsulação protege a funcionalidade e pode facilitar a liberação direcionada em específicas partes do intestino (VOS et al., 2010).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo microencapsular vitamina D₃ através da técnica de *spray chilling* para a produção das micropartículas lipídicas sólidas (MLS). Caracterizar as micropartículas produzidas com relação à morfologia, tamanho e distribuição de partículas, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e estabilidade durante a estocagem por 65 dias.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Vitamina D

A Vitamina D, também conhecida como a vitamina do sol, foi inicialmente identificada como uma vitamina essencial para o desenvolvimento normal do corpo saudável e manutenção do nível de cálcio (HOLICK, 2004b). A vitamina D pode ser obtida pela alimentação ou ser produzida pelo organismo mediante síntese na pele a partir da exposição à luz solar (radiação ultravioleta entre 290 e 315 nm) (HOLICK et al., 2011). Esta vitamina apresenta-se em duas formas: como vitamina D₃ (colecalfiferol) e vitamina D₂ (ergocalciferol).

Vitamina D₃ (colecalfiferol) é produzida na pele depois de exposição à luz solar. A Vitamina D₃ é sintetizada na pele, pela ação dos raios ultravioleta (UV) durante a exposição solar converte-se a pró-vitamina D₃ ou 7-deidrocolesterol levando a formação de um composto de transição denominado pré-vitamina D₃ (HOLICK, 1981). A pré-vitamina D₃ formada absorve a radiação ultravioleta e além de sintetizar a vitamina D, também dá origem a outros compostos sem atividade biológica como o taquisterol e o lumisterol, pela própria ação da temperatura corporal da pele (PENTEADO, 2003) sendo que a formação desses compostos inertes explica a não intoxicação pela vitamina D em casos de excessiva exposição solar (HOLICK, 1995).

Vitamina D₂ (ergocalciferol) encontrado em vegetais como leveduras e principalmente em cogumelos comestíveis obtida após a irradiação do ergosterol (HOLICK, 2007; LEE et al., 2008). O ergosterol (pró-vitamina D₂), presente nos vegetais e fungos, é convertido em vitamina D₂ (ergocalciferol) sob ação de raios ultravioletas (reação de fotólise), que promove uma reestruturação intramolecular caracterizada por abertura do anel β entre os carbonos 9 e 10, formação de uma dupla ligação entre os C₁₀ e C₁₉ e hidrogenação do carbono 9 (HOLICK, 2004a). Sendo ambas conhecidas como vitamina D. Sendo uma vitamina lipossolúvel, são muito poucos alimentos que contêm quantidades significativas de vitamina D₃ (BYRDWELL, 2009), e apenas alguns alimentos são fortificados com vitamina D.

Segundo Penteado (2003) os nomes oficiais das formas de vitamina D, de acordo com IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), são: Vitamina D₂: 9,10 seco (5Z, 7E) - 5,7,10 (19) 22 - ergostatetraeno – 3 β -ol e da Vitamina D₃: 9,10 seco (5Z, 7E) - 5,7,10 (19) - colestratrieno – 3 β -ol. A estrutura molecular da vitamina D está ligada aos hormônios esteróides, tecnicamente a vitamina D é um seco-esteroide, por possuir um anel ciclopentanoperidrofenantreno de esteroides, que por sua vez é composto por 4 anéis (A,B,C e D) e sofre uma quebra na ligação entre os carbonos 9 e 10 (C₉ - C₁₀) do anel B desta estrutura (NORMAN, 1987) como mostra a Figura 1. Os anéis C e D são rígidos e a cadeia se apresenta na conformação linear (OKAMURA et al., 1995). Os anéis são derivados do colesterol, que forma a estrutura dos esteróides (CHIELLINI; DELUCA, 2011). A denominação seco deve-se à ruptura do anel B e às denominações de E e Z são usadas quando as configurações forem trans ou cis respectivamente (PENTEADO, 2003).

Figura 1 – Estrutura molecular da vitamina D₂ (ergocalciferol) e vitamina D₃ (colecalciferol)

Fonte: (A) NORMAN, A W. Studies on the vitamin D endocrine system in the avian. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 117, p. 797–807, June. 1987. (B) DELUCA, H. F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 80, p. 1689–1696, 2004.

As estruturas de vitamina D diferem entre si em relação às cadeias laterais que estão ligadas a C₁₇. A vitamina D₂ apresenta uma dupla ligação entre C₂₂ e C₂₃ e um grupo metila (CH₃) no C₂₄. Além disso, por apresentar um carbono a mais, sendo 28 carbonos na sua estrutura em comparação com a vitamina D₃ (NORMAN, 1987; OKAMURA et al., 1995).

2.1.1 Metabolismo da vitamina D

Independente de qual seja origem adquirida da vitamina D (cutânea, alimentaria, farmacológica), é biologicamente inerte para se tornar biologicamente ativa, a vitamina D sofre duas hidroxilações no organismo. O colecalciferol sintetizado na pele ou proveniente da dieta, e o ergocalciferol ingerido unem-se a uma proteína ligadora de vitamina D formando um complexo proteína-vitamina D (DBP- Vitamin D Binding Protein) (HOLICK; MACLAUGHLIN; DOPPELT, 1981), e são transportadas através da circulação ao fígado, onde é submetido à primeira hidroxilação pela enzima 25-hidroxilase (no carbono 25 na molécula de vitamina D) levando a formação de 25-hidroxivitamina D (25OHD₃) ou calcidiol o metabolito circulante majoritário da vitamina D no organismo. Os níveis circulantes de 25OHD₃ é utilizado como avaliação da concentração da vitamina D no sangue (HOLICK, 2007). No entanto o metabolito 25OHD₃ não apresenta a atividade biológica necessária para as funções biológicas realizadas pela vitamina D, sendo necessária nova hidroxilação, portanto retorna ao sistema circulatório e é transportado aos rins. Uma vez nos rins ocorre à segunda hidroxilação formando o metabolito 1,25-dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂D₃) ou Calcitriol metabolito biologicamente ativa da vitamina D (HOLICK, 2004; LEVENTIS; PATEL, 2008). Após ser formada 1,25(OH)₂D₃ é transportado para seus principais tecidos alvo (intestino delgado e ósseo), em que é responsável pela absorção intestinal do cálcio e a mobilização de cálcio nos ossos e uma série de processos biológicos (HOLICK, 1994), conforme demonstrando na Figura 2.

Figura 2 – Metabolismo da vitamina D₃ (representação do processo de vitamina D até a sua ativação)

Fonte: HOLICK, M. F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 80, p. 1678–1688, 2004a.

A síntese de vitamina D realizada através da pele é muito variável dependendo de inúmeros fatores como pigmentação da pele, cultura, aumento da idade, tipo de vestuário, uso de protetor solar, nutrição, situação geográfica do país, poluição atmosférica, hábitos culturais e estação do ano (CHEN et al., 2007). A ingestão de vitamina D é importante quanto menor é a exposição solar (VAN SCHOOR; LIPS, 2011) mas a quantidade de vitamina D produzida na pele depende de fatores como a estação do ano, hora do dia e da latitude (WACKER; HOLIACK, 2013). O aumento de teor de pigmentação de melanina na pele irá reduzir a eficiência da fotossíntese da vitamina D, pois a melanina absorve fótons UV

competindo com o 7- dehidrocolesterol, sendo necessária maior exposição à luz solar para a formação da vitamina, deixando esses indivíduos mais propensos a desenvolver a deficiência de vitamina D. Com aumento da idade há uma diminuição de pró-vitamina D₃ na epiderme onde a maior parte de pre-vitamina D₃ ocorre, reduzindo a concentração da vitamina D, a espessura da pele diminui linearmente. O efeito da latitude, estação do ano e hora do dia, são fatores que estão relacionados ao aumento da incidência de raquitismo, durante os meses de inverno e seu declínio durante o verão e outono. Fatores como a diminuição de atividades ao ar livre, a poluição do ar também impede a incidência de radiação UV proveniente do sol, aumento do uso de roupas e enfraquecimento do sol contribuem para este fenômeno. O uso de protetor solar diminui a produção cutânea de vitamina D (HOLICK, 1994, 2004b; TSIARAS; WEINSTOCK, 2011; HAHAM et al., 2012). Além disso, fatores hormonais e genéticos podem variar os níveis de vitamina D. Todos esses aspectos ressaltam a importância da suplementação desta vitamina.

2.1.2 Funções da vitamina D

As funções biológicas da vitamina D são exercidas através de sua ligação a receptores nucleares de vitamina D (RVD), que regulam a transcrição do DNA em RNA, semelhante aos receptores esteroides, hormônios tireoidianos e retinoides. Os receptores são expressos em diversos tipos de células: epitélios do intestino delgado e tubular renal, osteoblastos, células hematopoiéticas, epidérmicas e pancreáticas, linfócitos, miócitos e neurônios (SZODORAY et al., 2008; MARQUES et al., 2010).

A vitamina D é um hormônio fundamental para a manutenção da homeostase do cálcio e do fósforo, no metabolismo do osso, a pressão arterial e a reabsorção renal de cálcio (HOLICK, 1994; LIND et al., 1995). A principal função da vitamina D consiste em uma adequada mineralização dos ossos no organismo, atuando em três localizações intestino delgado, os ossos e os rins. Sendo o único hormônio conhecido por induzir as proteínas envolvidas na absorção intestinal do cálcio e

fósforo; nos ossos facilitando a mineralização óssea, especialmente na fase de crescimento e nos rins auxiliando a reabsorção do cálcio e fósforo do túbulo renal (DELUCA, 2004).

Inúmeras células e tecidos no organismo possuem receptores de vitamina D: tais como as do cérebro, pâncreas, fígado, coração, estômago, tecido mamário, cólon, pele, pulmão, células do sistema imunológico, intestino, as gônadas, rins, ossos e glândulas paratireoides (HOLICK, 2005). Os receptores de vitamina D também estão presentes em alguns tecidos não relacionados, células β pancreáticas, todos os tipos de células imunológicas, células epiteliais, células vasculares lisas e cardiomiócitos em sistema cardiovascular (WANG, 2014). A vitamina D é, portanto, muito importante para o funcionamento normal de nosso organismo.

2.1.3 Deficiência de vitamina D

Estima-se que 1 bilhão de pessoas em todo o mundo têm deficiência ou insuficiência de vitamina D (HOLICK, 2007), sendo mais comum em afrodescendentes do que em brancos, devido à maior pigmentação da pele que age como um filtro para os raios ultravioletas; em obesos, em decorrência da vitamina D estar solubilizada no tecido adiposo; em regiões de maiores latitudes, por serem menos ensolaradas durante a maior parte do ano; em povos que apresentam hábitos culturais como dieta deficitária em vitamina D e uso de vestimentas que cobrem a maior parte do corpo (SOUZA, 2013). Assim sendo, a deficiência de vitamina D é reconhecida como um problema mundial, para crianças e adultos (HOLICK, 2007; STRATULAT et al., 2015).

A deficiência de vitamina D esta associada com baixos níveis de cálcio pela inadequada mineralização ou desmineralização óssea, um estímulo que leva um aumento na produção de hormônio paratireoide (PTH) (WACKER; HOLICK, 2013).

Níveis elevados de PTH levam ao aumento da reabsorção óssea mobilizando cálcio ionizado na corrente sanguínea, essa deficiência de vitamina D leva ao hiperparatiroidismo secundário que pode agravar a osteoporose e o risco de fratura (HOLICK, 2004b, 2007).

Em crianças a deficiência severa de vitamina D provoca desmineralização óssea que pode causar raquitismo e deformações na estrutura óssea, afetando o crescimento ósseo pelas fraturas. Em adultos a deficiência de vitamina D pode levar a osteomalacia, fraqueza, dor muscular e aumento de fraturas (HOLICK, 2004b; LEE et al., 2008).

A deficiência de vitamina D traz como consequência o desenvolvimento de doenças autoimunes não transmissíveis. Tem sido demonstrado uma relação entre deficiência de vitamina D e a prevalência de algumas doenças autoimunes, como esclerose múltipla (EM), artrite reumatoide (AR), diabetes melitus insulino-dependente (DMID), lúpus eritematoso sistêmico (LES), doença inflamatória intestinal (DII) e diabetes melitus tipo I (DMTI) (SZODORAY et al., 2008; MARQUES et al., 2010), doenças cardíacas, doenças imunológicas, doenças cardiovasculares (HAHAM et al., 2012; HOLICK, 2004b).

A vitamina D e seus análogos não só previnem o desenvolvimento de doenças autoimunes como também poderiam ser utilizados no seu tratamento. Sugere-se que a suplementação de vitamina D tem sido terapeuticamente efetiva em vários modelos animais experimentais com doenças como: artrite induzida por colágeno, lúpus eritematoso sistêmico, doença inflamatória intestinal, diabetes melitus tipo I, encefalomielite alérgica e tireoidite autoimune, doenças cardiovasculares (HOLICK, 2007; ARNISON; AMITAL; SHOENFELD, 2007; MARQUES et al., 2010 GIBSON et al., 2015). Além de outras pesquisas que mostraram seus benefícios em grandes populações de pacientes com doenças autoimunes como AR, EM, DMTI (SZODORAY et al., 2008).

Como a deficiência/insuficiência de vitamina D é repetidamente reportada na literatura a ingestão adequada, tendo como base as Ingesta dietética de referencia (DRIs), não era suficiente para manter o PTH em níveis adequados e para a

prevenção de diversas doenças não transmissíveis (MERKE et al., 1989). A recomendação de ingestão de vitamina D para indivíduos com 25-OHD₃ abaixo de 55 nmol/L (22 ng/mL) fosse de 125 µg/dia (5.000 UI/dia), e para indivíduos com 25-OHD₃ acima de 55 nmol/L fosse de 95 µg/dia (3.800 UI/dia), com a finalidade de manter os níveis séricos da 25-OHD₃ (ALOIA et al., 2008).

Em Novembro de 2010, o *Institute of Medicine* (IOM) reportou um breve relatório sobre recomendações de ingestão para cálcio e vitamina D e doses diárias para cada faixa etária (ROSS et al., 2011), mencionados na Tabela 1. As quantidades de vitamina D são apresentadas normalmente em µg, sendo que 1 µg é equivalente a 40 UI.

A Organização Mundial de Saúde (OMS), recomenda a ingestão diária de vitamina D de 5 µg (200 UI) para crianças e adultos até 50 anos (inclusive mulheres grávidas e lactante), 10 µg (400 UI) a partir de 51 até 65 anos e 15 µg (600 UI) para pessoas com mais de 65 anos (FAO; WHO, 2004). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária recomenda a ingestão diária de vitamina D de 10 µg (400 UI) para adultos. A ingestão dietética de vitamina D varia de acordo com os países.

Martini et al., (2013) mostraram na avaliação de adolescentes, adultos e idosos de uma amostra representativa da cidade de São Paulo, que nenhum indivíduo ingeria a quantidade recomendada de vitamina D para sua faixa etária, mesmo aqueles com maior renda familiar e nível educacional.

Holick et al., (2011) publicaram uma diretriz para avaliação, tratamento e prevenção da deficiência de vitamina D, revisada e apoiada pela Sociedade de Endocrinologia dos Estados Unidos.

Tabela 1 – Recomendações da ingestão diária de vitamina D para indivíduos

Faixa etária	Necessidade média estimada UI/dia (µg/dia)	Ingestão dietética recomendada UI/dia (µg/dia)	Máximo admitido UI/dia (µg/dia)
0-6 meses	400 (10)	400 (10)	1000 (25)
6-12 meses	400 (10)	400 (10)	1500 (37,5)
1-3 anos	400 (10)	600 (15)	2500 (62,5)
4-8 anos	400 (10)	600 (15)	3000 (75)
9-13 anos	400 (10)	600 (15)	4000 (100)
14-18 anos	400 (10)	600 (15)	4000 (100)
19-30 anos	400 (10)	600 (15)	4000 (100)
31-50 anos	400 (10)	600 (15)	4000 (100)
51-70 anos (homens)	400 (10)	600 (15)	4000 (100)
51-70 anos (mulheres)	400 (10)	600 (15)	4000 (100)
>70 anos	400 (10)	800 (20)	4000 (100)
14-18 anos (gestante/lactante)	400 (10)	600 (15)	4000 (100)
19-50 anos (gestante/lactante)	400 (10)	600 (15)	4000 (100)

Fonte: Institute of Medicine. Report Release: Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D, 2010.

2.1.4 Suplementação da vitamina D

Os alimentos que contém vitamina D naturalmente em quantidades significativas são muito limitados. As principais fontes são alimentos de origem animal e seus derivados como ovos (gemas), óleo de fígado de bacalhau, alguns peixes gordurosos como sardinhas, salmão, cabala e no atum enlatado (WACKER; HOLICK, 2013). O conteúdo de vitamina D em alimentos não fortificados é geralmente baixo, com exceção do Salmão e da sardinha. A vitamina D torna-se um fator nutricional importante na ausência de absorção dos raios ultravioleta.

A fortificação de alimentos com vitamina D₃ é um fator nutricional importante, especialmente em condições de restrição de luz solar (HOLICK; CHEN, 2008). A fortificação de alimentos ou suplementação de vitamina D é comum em países onde a irradiação solar é deficiente devido a estação do ano, latitude. Os alimentos normalmente fortificados são alguns produtos de panificação, cereais e principalmente o leite para crianças.

Nos Estados Unidos, existe produção de um grande número de alimentos com vitamina D tais como leite, margarina, cereais, massas, iogurte e queijo entre outros (HOLDEN; LEMAR, 2008). Na Austrália existe a fortificação obrigatória de alimentos do tipo margarinas e a fortificação voluntária de leite em pó, iogurte e queijos (HOLICK et al., 2011). A adição de vitamina D pode corrigir uma deficiência ambiental existente (menor exposição à radiação ultravioleta) sendo possível a fortificação de alimentos com ergocalciferol ou colecalciferol, solução para prevenir doenças relacionadas com a falta dessas vitaminas.

A vitamina D é um nutriente essencial para a saúde humana e de grande importância na prevenção de doenças. São dois compostos químicos: a vitamina D₂ (ergocalciferol) e vitamina D₃ (colecalciferol), que estão ligados ao metabolismo lipídico. Sendo vitaminas lipossolúveis, são substâncias solúveis em gordura e muito sensível a vários fatores ambientais. Por exemplo, luz, calor, oxigênio e umidade do ar poderiam induzir rapidamente isomerização ou oxidação de vitamina D₃ e, em

seguida, afetar negativamente a sua estrutura química e benefícios fisiológicos (BALLARD et al., 2007; LUO; TENG; WANG, 2012). A aplicação de microencapsulação tem sido utilizada com diversas finalidades na indústria de alimentos e farmacêutica, para melhorar a estabilidade de compostos susceptíveis à degradação por fatores ambientais (presença de oxigênio, luz, pH etc). O interesse na técnica de *spray chilling* tem crescido em função do seu baixo custo, da simplicidade e rapidez do processo.

Como as fontes dietéticas naturais de vitamina D são escassas, tem sido necessária sua suplementação, já que a vitamina D₃ é susceptível a decomposição na presença do oxigênio atmosférico, luz, pH e condições ácidas. Neste sentido, a aplicação da técnica de microencapsulação pode proteger os materiais que são sensíveis das condições adversas do meio e interação com outros compostos, estabilizando o produto, aumentando a vida útil e promovendo sua liberação controlada.

2.2 Microencapsulação

Microencapsulação é o processo de empacotamento com finas coberturas poliméricas de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas extremamente pequenas (DESAI; PARK, 2005; FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008) com o objetivo de proteger os materiais que são sensíveis às condições adversas do meio tais como luz, oxigênio, umidade, temperatura e interações com outros compostos, estabilizando o produto, aumentando sua vida útil e promovendo sua liberação controlada em condições pré-estabelecidas (SHAHIDI; HAN, 1993).

O material encapsulado é denominado recheio, núcleo ou material ativo, e aquele utilizado como cobertura também pode ser chamado de material de parede, agente encapsulante, matriz ou carreador (GIBBS et al., 1999)

As estruturas obtidas pela microencapsulação podem ser diferenciadas de acordo com a distribuição do material encapsulado na matriz, sendo denominadas microcápsulas ou micropartículas. Nas micropartículas o material encapsulado distribui-se por todo volume da partícula, podendo permanecer uma parte na superfície da matriz (SCHROOYEN; VAN DER MEER; KRUIF, 2001). E as microcápsulas são as partículas constituídas por um material ativo que é totalmente recoberto pelo agente encapsulante e encontra-se localizado na parte central, caracterizando-se o tipo reservatório. Esta pode apresentar mais de um núcleo o material de parede pode ser único, ter camadas ou uma mistura de componentes. Na Figura 3 são apresentadas estruturas representando uma micropartícula e uma microcápsula.

Figura 3 – Apresentação de estruturas obtidas na microencapsulação

Fonte: SUAVE, J. et al. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v. 7, n. 2, p.12–20, 2006.

As cápsulas ou partículas obtidas por microencapsulação podem ser classificadas de acordo com o seu tamanho em microcápsulas, macrocápsulas e nanocápsulas. A forma assim como o tamanho das partículas é variável em função do agente encapsulante e da técnica de encapsulação (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

Muitos materiais são utilizados como agente encapsulante dentre eles carboidratos (goma arábica, amidos, amidos modificados, ágar, alginato, quitosana, maltodextrinas, xarope de milho, ciclodextrina, celulose e derivados), lipídios (ácidos graxos, ceras, álcoois graxos, parafinas, óleos e gorduras hidrogenadas), proteínas (glúten, caseína, gelatina, albumina e peptídeos), poliésteres naturais (poli(hidroxialcanoatos), P(3HB), P(3HV) e seus copolímeros, polímeros sintéticos (poliacrilatos, copolímeros de polietileno, PDLA e PCL) (JACKSON; LEE, 1991; SUAVE et al., 2006). A escolha do agente encapsulante depende de uma série de fatores como a técnica de microencapsulação para obtenção das micropartículas, o tamanho de partículas, as propriedades físico-químicas do material, escala e custo de produção (RÉ, 2000). Além de propriedades como aumento de estabilidade, mecanismo de liberação desejado, mascaramento de gosto agradável, baixa viscosidade, possuir baixa higroscopicidade e apresentar propriedades emulsificantes (SHAHIDI; HAN, 1993; YAJIMA et al., 1996; MASCHKE et al., 2007).

Os mecanismos de liberação do material ativo microencapsulado variam de acordo com a natureza do agente encapsulante, sendo que normalmente ocorrem devido a mecanismos como: variação de temperatura e de pH, solubilidade do meio, biodegradação, difusão, ruptura mecânica, permeabilidade seletiva e gradiente de concentração existente em relação ao meio de liberação (BAKAN, 1973; BRANNON-PEPPAS, 1993).

Existem vários métodos que podem ser utilizados para microencapsulação, sendo que a seleção do método depende da aplicação que será dada à microcápsula, do tamanho desejado, do mecanismo de liberação e das propriedades físico-químicas tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante (JACKSON; LEE, 1991).

Os métodos de microencapsulação são vários, os métodos mais utilizados podem ser agrupados em métodos físicos (*spray drying*, *spray chilling/cooling*, leito fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, injeção, co-cristalização e liofilização), método químicos (inclusão molecular, polimerização interfacial) e métodos físico-químicos (emulsificação, coacervação simples e complexa, pulverização em agente formador de reticulação e lipossômico) (UDDIN; HAWLADER; ZHU, 2001; DESAI; PARK, 2005; ZUIDAM; SHIMONI, 2010; GAMBOA; GONÇALVES; GROSSO, 2011; ZIANI; FANG; MCCLEMENTS, 2012; DONG et al., 2013; NEO et al., 2013).

A tecnologia de microencapsulação vem sendo utilizada pela indústria por vários motivos, como para transformar um agente ativo líquido em pó, melhorar a segurança (reduzir volatilidade de aromas), regular as propriedades de componentes ativos (tamanho de partícula, solubilidade e cor), mascarar sabores indesejáveis e controlar a liberação do ativo encapsulado (ZUIDAM; NEDOVIC, 2010), aumentar a vida de prateleira, reduzir a toxicidade do material ativo, protegê-lo de umidade, luz e calor (JACKSON; LEE, 1991). A microencapsulação é uma tecnologia amplamente utilizada e apresenta interesse em diferentes áreas como cosmética, agrícola, farmacêutica, veterinária e recentemente na indústria de alimentos. Shahidi e Han (1993) mencionam os principais motivos para aplicação da microencapsulação na indústria de alimentos: reduzir a reatividade do núcleo com fatores ambientais, diminuição da taxa de transferência do material do núcleo para o exterior, facilitação da manipulação do material encapsulado, promover a liberação controlada, mascaramento de sabor e odor desagradáveis do núcleo e promover a diluição homogênea do material encapsulado em uma formulação alimentícia.

Na indústria de alimentos existe grande variedade de materiais que podem ser encapsulados tais como ácidos, bases, sais, vitaminas, aminoácidos, pigmentos, óleos essenciais, corantes, enzimas, microrganismos (JACKSON; LEE, 1991; SHAHIDI; HAN, 1993; AUGUSTIN et al., 2001; DESAI; PARK, 2005).

2.3 *Spray Chilling*

Não há uma única denominação na literatura com relação à técnica de *spray chilling*, denominada também pelos sinônimos: *spray congealing* (MASCHKE et al., 2007; ALBERTINI et al., 2008; ILIĆ et al., 2009) e *spray cooling* (GOUIN, 2004) e diferenciada apenas pelo ponto de fusão do material encapsulante. Esta técnica vem recebendo especial atenção do ponto de vista de segurança, rapidez e alto desempenho em relação às demais técnicas. A microencapsulação por *spray chilling* tem muita vantagem para encapsulação de alimentos, pois é considerado um processo físico, rápido, seguro e de baixo custo, não necessita solvente na formulação ou altas temperaturas tornando-se uma técnica viável ambientalmente e vantajosa para encapsulação de compostos bioativos termolábeis, estes são alguns dos atrativos associados ao processo de obtenção de micropartículas lipídicas sólidas por *spray chilling* que despertam o interesse por novos estudos (ALBERTINI et al., 2008).

Na área de alimentos esta técnica é ideal para encapsular recheios solúveis em água tais como vitaminas, minerais, enzimas, acidulantes, algumas essências e sais orgânicos e inorgânicos que têm aplicações em produtos de panificação, misturas para sopa e alimentos que contenham um alto teor de gordura entre outras aplicações (DZIEZAK, 1988). A elaboração de partículas por este método tem sido aplicada em diversos segmentos, como o farmacêutico, de cosméticos, agrícola, veterinário e alimentício (CHAMBI et al., 2008).

Spray congealing é um dos métodos utilizados para a produção de micropartículas esféricas em que o material ativo está distribuído uniformemente dentro de todo o volume da partícula (ILIĆ et al., 2009) a produção de micropartículas por este método tem sido desenvolvida em vários segmentos industriais como farmacêutico, cosmético, agrícola e alimentício (CHAMBI et al., 2008).

No processo de produção das micropartículas lipídicas sólidas por *spray chilling*, o carreador quase sempre de natureza lipídica é fundido geralmente a 10 °C acima do seu ponto de fusão, o material ativo é incorporado ao agente carreador fundido. Essa incorporação pode ser mediante dissolução, dispersão ou emulsão. A mistura resultante entre carreador e material ativo posteriormente é atomizada, uma mangueira promove a alimentação conectado a béquero contendo o material a ser atomizado ao bico de atomização, mediante auxílio de uma bomba peristáltica é utilizada facilitando a infusão e o controle de vazão. O bico atomizador que tem conexão com interior da câmara de resfriamento é responsável pela pulverização do carreador formando pequenas gotas que se solidificam rapidamente ao entrar em contato com ar frio ou N₂, transformando à formação de micropartículas lipídicas solidas. As micropartículas são coletadas em um recipiente abaixo da câmara de resfriamento, enquanto as micropartículas muito finas são transportadas pelo ar ao ciclone onde são coletadas em outro recipiente (CHAMBI et al., 2008; OKURO, MATOS; FAVARO-TRINDADE, 2013; FAVARO-TRINDADE, OKURO; MATOS; 2015), como é mostrado na Figura 4.

Figura 4 – Esquema de um equipamento Spray Chiller

Fonte: OKURO, P. K.; MATOS, F.E.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Technological challenges for spray chilling encapsulation of functional food ingredients. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 51, n. 2, p. 171–182, 2013.

Na técnica de *spray chilling* o agente encapsulante é normalmente de natureza lipídica, como óleo vegetal fracionado ou hidrogenado, ceras, triacilgliceróis e seus derivados com alto ponto de fusão (DESAI; PARK, 2005; MADENE et al., 2006; VOS et al., 2010; FINI et al., 2011). Os materiais utilizados como excipientes farmacêuticos são bem tolerados fisiologicamente, os triacilgliceróis são susceptíveis à ação de lipases e apresentam alta biocompatibilidade o que minimiza a possibilidade de toxicidade (FINI et al., 2011). A escolha do material de encapsulação depende das propriedades dos compostos, o grau de estabilidade requerido durante o processamento e armazenagem, as propriedades dos componentes dos alimentos, a facilidade de atomização e temperatura da fusão (MADENE et al., 2006).

Spray chilling é um processo muito semelhante ao *spray drying* com a exceção do fluxo de energia, com algumas modificações e adaptações transformando o mesmo equipamento versátil aos dois processos. No caso de *spray drying* a energia é aplicada à gota forçando a evaporação do solvente, o que resulta na secagem do material atomizado com circulação de ar quente, utilizando altas temperaturas e para *spray chilling* a energia é removida da gotícula com a injeção de ar frio para a solidificação do encapsulante, utilizando temperaturas inferiores ao ponto de fusão do material de parede (KILLEN, 1993).

As variáveis mais importantes do processo são a temperatura do material fundido, a temperatura do ar de resfriamento, a pressão e a temperatura do ar de atomização, e o fluxo de alimentação da mistura fundida (ILIĆ et al., 2009). O tamanho da partícula depende do material ativo, da viscosidade da mistura fundida, da configuração do disco e da velocidade rotacional (ZUIDAM; SHIMONI, 2010). O tamanho das micropartículas está associado com a viscosidade da mistura fundida, que pode ser regulada através da temperatura ou a quantidade de sólidos dispersos (MASCHKE et al., 2007). A pressão da atomização também tem influência no tamanho da partícula (ILIĆ et al., 2009).

A maioria dos agentes encapsulantes ou matrizes não têm todas as propriedades para ser aplicado, um revestimento adicional pode ser aplicado às micropartículas obtidas por *spray chilling* para garantir a completa cobertura da

partícula e eliminar interações indesejáveis circundantes à mesma, durante o armazenamento e incorporação (LAKKIS, 2007).

Numerosas aplicações de micropartículas têm sido investigadas ou desenvolvidas tais como, o mascaramento de sabor e odor (AKIYAMA et al., 1993; YAJIMA et al., 1999; SHENG; DEUTSCH; CRAIG, 2006), desenvolvimento de sistemas de liberação controlada (PASSERINI et al., 2003; ALBERTINI et al., 2004), proteção de fármacos contra condições ambientais adversas (ALBERTINI et al., 2009), melhoria de perfil de dissolução de drogas pouco solúveis (FINI et al., 2002), proteção de material ativo do ambiente externo tais como umidade, oxigênio, luz, pH, ação de enzimas (MATOS et al., 2015; SALVIM et al., 2015; PELISSARI et al., 2016) otimização de dissolução de medicamentos pouco solúveis, modulação da liberação do composto, melhora das propriedades de fluxo, manipulação, entre outras aplicações (ILIC et al., 2009).

2.4 Microencapsulação de vitamina D₃

A tecnologia de encapsulação tem provado ser uma excelente ferramenta para proteger os ingredientes alimentares sensíveis de degradação e possibilita a investigadores desenvolver novas formulações de alimentos com soluções melhoradas (MOURTZINOS et al., 2008; SCHROOYEN; VAN DER MEER; DE KRUIF, 2001). A importância e as vantagens desta tecnologia são inegáveis na indústria de alimentos, como indicado por vários estudos (DZIEZAK, 1988; SHAHIDI; HAN, 1993; YULIANI et al., 2004; AUGUSTIN; SANGUANSRI, 2007).

A indústria de alimento funcional tornou-se uma força motriz para o progresso da tecnologia de encapsulamento e uma variedade de ingredientes alimentares funcionais já foram encapsuladas tais como vitaminas, aromas, enzimas, acidulantes, corantes, microrganismos e minerais (DZIEZAK, 1988; JACKSON; LEE, 1991; SHAHIDI; HAN, 1993; SCHROOYEN; VAN DER MEER; DE KRUIF, 2001;

MADENE et al., 2006). A encapsulação com novos ingredientes alimentares pode fornecer benefícios à saúde.

Dentre os diversos avanços recentes da indústria de alimentos e nutracêuticos, a encapsulação de compostos bioativos lipofílicos tem recebido enorme atenção por ser uma tecnologia capaz de um meio adequado para aumentar a estabilidade e preservar esses compostos durante o armazenamento (HUANG; YU; RU, 2010). A incorporação de vitaminas lipossolúveis em alimentos pode torná-los alimentos funcionais ou nutracêuticos para sua aplicação em produtos alimentícios e medicamentos, já que facilitaria sua absorção no intestino.

O benefício da microencapsulação pode levar a uma maior eficiência, e liberação controlada de nutracêuticos, aumentando assim a bioatividade e diminuindo efeitos colaterais (GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010). Encapsulação constitui uma abordagem promissora para preservar suas propriedades ao longo do tempo.

A encapsulação pode ser utilizada para prevenir/reduzir a liberação oral de componentes que têm propriedades de sabor indesejáveis e que tem o potencial de permitir a distribuição direcionada de bioativos dentro do trato gastrointestinal (AUGUSTIN; SANGUANSRI; OLIVER, 2010), compostos sensíveis, ou aditivos voláteis como vitaminas e aromas podem ser transformados em ingredientes estáveis através de microencapsulação (DESAI; JIN PARK, 2005).

Ozturk et al. (2015) estudaram a influência do tipo de óleo veicular na biodisponibilidade de vitamina D₃ encapsulada por nanoemulsão, usando saponina de quillaja (surfactante natural) em um modelo gastrointestinal. Os autores observaram que nanoemulsões preparadas com triglicerídeos de cadeia longa (provenientes de óleo de milho ou de peixe) foram os mais eficazes no aumento a biodisponibilidade de vitamina D₃. Estes resultados são importantes para formulação de sistemas de distribuição baseados em nanoemulsão com vitaminas lipossolúveis e outros nutracêuticos lipofílicos.

Wang et al. (2015) também avaliaram a microencapsulação de vitamina A, D₃, E, K₂, coenzima Q₁₀ e curcumina usando coacervação complexa em óleo de atum e relataram alta eficiência e rendimento de encapsulação com um índice de estabilidade significativamente melhorado. A técnica escolhida foi apropriada para estabilizar vários ingredientes bioativos lipofílicos.

Luo, Teng e Wang (2012) prepararam nanopartículas de zeína revestidas com carboximetilquitosano (CMCS) para encapsular vitamina D₃, usando um método de separação de fases de baixa energia e revestido com CMCS simultaneamente. Ligação de hidrogênio, interação eletrostática e interação hidrofóbica foram consideradas como as principais forças que facilitaram a formação de nanopartículas. Estes autores mencionam que a eficiência de encapsulação foi satisfatória depois do revestimento CMCS. Assim, a encapsulação de nutrientes hidrofóbicos em nanopartículas complexas de zeína/CMCS poderia apresentar a propriedade de liberação controlada e melhorar a estabilidade de nutrientes lábeis.

Já Teng, Luo e Wang (2013) encapsularam vitamina D₃ em complexos formados por carboximetil quitosana e proteína de soja e obtiveram valores de eficiência de encapsulação da ordem de 96% nos complexos formados.

Há poucos estudos envolvendo a microencapsulação da vitamina D₃ e não foram encontrados trabalhos que tenham investigado a microencapsulação da vitamina D₃ pela técnica de *spray chilling* na literatura.

3 Material e métodos

3.1 Materiais

Para a produção das micropartículas usou-se vitamina D₃ (Galena, Índia) como material ativo, gordura vegetal (TRI CS 48 – Triângulo Alimentos, Brasil) com ponto de fusão de 46-49°C como carreador, lecitina de soja (Phospholipon®90G - Phospholipid GmbH, Germany) e cera de abelha (Candelila, GM Ceras, SP/Brasil) como aditivos.

Para as determinações analíticas foram usados colecalciferol 98% (Sigma, EUA), metanol grau cromatográfico (Panreac, Barcelona/ Espanha), acetonitrila grau cromatográfico (Panreac, Barcelona/Espanha), etanol absoluto grau analítico (Synth, Brasil) e água reagente tipo I (Direct-Q UV3 – Millipore, EUA).

3.2 Tratamentos

Três tratamentos foram estabelecidos: sem aditivos (T1), com adição de 1% de cera de abelha (T2), com 1% de lecitina de soja (T3) e carreador lipídico puro (T4). Foram atomizadas soluções contendo o carreador fundido à temperatura de 65 °C (T1, T3 e T4) e 90 °C (T2) e os demais ingredientes em câmara fria (13±1 °C) para produção das micropartículas. Cada tratamento foi preparado em duplicata conforme as proporções mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Composição dos tratamentos.

Tratamento	Carreador (g/100g)	Aditivo (g/100g)	Vitamina D ₃ (g/100g)
T1	99,9	0	0,1
T2	98,9	1	0,1
T3	98,9	1	0,1
T4	100	0	0

T1: apenas gordura e vitamina; T2: gordura, vitamina e cera; T3: gordura, vitamina e lecitina de soja; T4: carreador lipídico puro.

Fonte: Própria autoria.

3.3 Métodos

3.3.1 Produção das microcápsulas por *Spray Chilling*

As micropartículas lipídicas sólidas foram produzidas através da técnica de *spray chilling* seguindo metodologia descrita em Matos (2013). Para o preparo das soluções a gordura vegetal foi pesada em um béquer, fundida a 65 °C (15°C acima do ponto de fusão) em banho maria (Marconi, MA184) adicionou-se a lecitina de soja, após o material completamente fundido foi adicionada a vitamina D₃ em pó, em seguida homogeneizou-se mistura em Ultra-Turrax IKA®T25 (Staufen/Alemanha) a 5000 rpm, por 1 min, a mistura foi mantida sob agitação. A produção das micropartículas compostas pela mistura do carreador lipídico e vitamina D₃ foi

realizada de maneira semelhante. Já para produção das micropartículas do carreador, cera e vitamina, o carreador e a cera foram fundidos a 90 °C em banho-maria, seguindo o mesmo procedimento mencionado para as etapas posteriores. Para produção das micropartículas constituídas apenas do carreador, a gordura foi fundida a 65 °C e posteriormente atomizada.

Para obtenção das micropartículas lipídicas sólidas (MLS) as misturas foram atomizadas em câmara fria ($13\pm1^{\circ}\text{C}$) utilizando-se um bico atomizador duplo fluido ($\varnothing$ 1,2 mm), à pressão de ar de 2,2 kgf/cm² em um spray da Labmaq do Brasil (Brasil) adaptado como *spray chiller* (Figura 4). A vazão foi controlada mediante uma bomba peristáltica Masterflex (Illinois-Estados Unidos) a 50 mL/min.

As MLS obtidas foram armazenadas em frasco de vidro cobertos com papel alumínio, protegidas da degradação da luz, e estocadas a 10 e 25 °C. Totalizando 3 tratamentos (Tabela 1) com duas repetições de cada processo de encapsulação e triplicata de todas as análises.

3.3.2 Caracterização das micropartículas

3.3.2.1 Análise morfológica das partículas

A análise morfológica das micropartículas foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas sobre stubs de alumínio com fita de carbono dupla face (Ted Pella, Inc., Redding, Estados Unidos), examinadas por meio do microscópio eletrônico de varredura (TM 3000 Tabletop Microscope Hitachi, Tóquio-Japão). As imagens foram captadas com aceleração de voltagem de 5 kV, com corrente de 1750 mA.

3.3.2.2 Tamanho médio e distribuição de tamanho da partícula

O tamanho médio e a distribuição de tamanho das MLS foram determinados por difração de raio laser, através do analisador de partículas Shimadzu Sald-201V (Tokyo /Japão). As micropartículas foram dispersas em álcool etílico (Synth, Brasil) (1% peso/peso) e estabilizadas por 3 minutos antes da análise para evitar aglomeração. Esta análise foi realizada em triplicata.

3.3.2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização das MLS e dos ingredientes puros, foram realizadas utilizando o equipamento Perkin Elmer FT-IR Spectrometer (Massachusetts/EUA) com o auxílio de software Spectrum One versão 5.3.1. Fizeram-se 16 varreduras, através de espectroscopia de infravermelho na região de 4000 a 600 cm^{-1} .

3.3.2.4 Quantificação de Vitamina D₃ por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A vitamina D₃ foi quantificada em condições analíticas modificadas de acordo com a metodologia descrita por Staffas e Nyman (2003). Utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Prominence, Japão) controlado por software LC Solution (Versão 1.25) e equipado com bomba de fase móvel quaternária, degaseificador online, injetor automático, compartimento de coluna termostaticado e detector por arranjo de diodos. A coluna analítica com fase

estacionária de octadecilsilano (250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno e 4,6 µm de diâmetro de partícula –Shimadzu, Shim-Pack VP-ODS, Japão) foi mantida a 35 °C. Metanol e acetonitrila foram usados como fase móvel na proporção respectiva de 90:10 (v/v) com fluxo constante de 1,60 mL.min⁻¹. Injetou-se 10 µL das amostras com detecção espectrofotométrica em 265 nm e tempo total de corrida igual a 10 min. A identificação foi realizada por comparação com o tempo de retenção (7,30 min.) da substância padrão de vitamina D₃ (Sigma-Aldrich, EUA). A quantificação foi realizada por padronização externa a partir das áreas obtidas de análises em triplicata de 7 níveis de concentrações da vitamina D₃ (Sigma-Aldrich, EUA) preparadas entre 0,5 e 15,0 microgramas mL⁻¹. A equação da regressão linear foi obtida pelo método dos mínimos quadrados com auxílio do software Excel® (Microsoft, EUA).

3.3.2.5 Avaliação da estabilidade da vitamina D₃ livre e microencapsulada

Para avaliação da estabilidade da vitamina D₃ das MLS e livre foram estabelecidos dois parâmetros de temperatura de armazenamento: 10 e 25 °C. As amostras foram estocadas em frascos de vidro fechados recobertos por papel alumínio por 65 dias com análises nos tempos 1, 15, 27 e 65 dias. Periodicamente a vitamina era quantificada em alíquotas que eram retiradas das amostras estocadas.

Para quantificar vitamina D₃ encapsulada utilizou-se metanol. Pesou-se em triplicata 0,15 g da amostra em tubo de centrifuga de 15 mL. Após a adição de 5 mL de metanol, o tubo foi agitado em vortex (Phoenix, AP56, Brasil) por 10 seg e mantido em banho ultrassônico (Unique, Ultracleaner 1400, Brasil) a 30 °C por 5 min. Em seguida, o tubo foi centrifugado (Eppendorf, 5430R, Alemanha) por 5 min a 4000 rpm (23 °C) e o extrato metanólico transferido para um balão volumétrico de 10 mL. Repetiu-se o processo de adição de metanol por uma vez a fim de garantir que a extração da vitamina D₃ fosse a máxima possível, o sobrenadante também foi transferido para o balão volumétrico, o qual foi completado com metanol para seu

volume final. A solução foi filtrada em membrana de nylon 0,45 µm 13 mm diâmetro interno (d.i.) para um vial de 2 mL com tampa e septo e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para quantificação da Vitamina D₃ livre pesou-se em triplicata 10 miligramas da substância em balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com metanol e a concentração diluída 100 vezes para análise por CLAE.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e o valor encontrado no primeiro dia foi considerado como tempo zero e 100% de estabilidade para realização dos cálculos nos tempos seguintes.

3.3.3 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente ao nível 5% de significância, por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey usando a versão 9.1.3 do programa SAS (Statistical Analysis System) (SAS, 1995).

4 Resultados e discussão

4.1 Caracterização dos pós

Os pós obtidos após atomização eram finos, brancos e apresentavam a mesma aparência para todas as formulações (Figura 5).

Figura 5 – Amostras obtidas por *spray chilling* contendo partículas carregadas de vitamina D₃. (T1: apenas gordura e vitamina; T2: gordura, vitamina e cera; T3: gordura, vitamina e lecitina de soja)

Fonte: Própria autoria.

As concentrações de vitamina D₃ em cada tratamento podem ser visualizadas na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração de Vitamina D₃ nos tratamentos logo após o preparo das partículas.

Tratamento	Concentração de vitamina D ₃ µg/100g de partícula
T1	80068,50
T2	79296,89
T3	79221,00
T4	0

T1: apenas gordura e vitamina; T2: gordura, vitamina e cera; T3: gordura, vitamina e lecitina de soja; T4: gordura.

4.2 Análise morfológica das MLS

As imagens das MLS carregadas de vitamina D₃ são apresentadas na (Figura 6).

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das MLS com adição de cera de abelha ou lecitina de soja não indicaram alterações na aparência superficial quando comparadas ao T1.

As micropartículas independentes da formulação apresentaram formato esférico, o que facilita a acomodação das partículas, o escoamento e a aplicação do pó. As partículas esféricas obtidas por *spray chilling* possuem boas propriedades de fluxo (ILIĆ et al., 2009). Esta característica também foi observada por diversos autores que utilizaram a técnica de *spray chilling* para encapsular outros materiais (MASCHKE et al., 2007; CHAMBI et al., 2008; MCCARRON; DONNELLY; AL-KASSAS, 2008; ILIĆ et al., 2009, PEDROSO et al. 2012; OKURO et al. 2014; MATOS-Jr et al., 2015, SALVIM et al., 2015; PELISSARI et al., 2016).

Além do formato esférico as partículas produzidas apresentaram superfície lisa. Estas características podem estar associadas ao fato de que o processo de *spray chilling* não envolve evaporação de solventes, processo comumente observado em outras técnicas de microencapsulação, como *spray drying*. As MLS produzidas por *spray chilling* são geralmente densas e não porosas (ILIĆ et al., 2009).

As partículas apresentaram diâmetros variados e aglomerações, porém as imagens dos tratamentos (T1 e T3) mostraram mais aglomerados do que o tratamento (T2). As partículas apresentaram superfície lisa e adesão de partículas muito pequenas.

Todos os tratamentos apresentaram aglomeração, com pequenas partículas aderidas à superfície de partículas maiores. A distribuição das partículas de diferentes tamanhos e a aglomeração favorecem a acomodação das partículas no

pó, pois partículas pequenas podem se acomodar entre os espaços deixados pelas maiores, o que reduz o volume ocupado pelo produto, reduzindo custo com embalagem, facilitando o transporte e estocagem do material.

A presença de aglomeração é um fenômeno físico e pode ser descrita como a colagem de partículas sólidas. Pode ser considerada positiva, pois pós que apresentam este tipo de estruturação causam menor formação de poeira e apresentam melhor fluxo (BARBOSA CÁNOVAS et al., 2005). Este fenômeno é ocasionado por vários fatores que podem contribuir para as propriedades dos pós e obtenção de produtos aglomerados como o tamanho de partícula. A principal finalidade do alargamento do tamanho de partícula por aglomeração é de modificar ou melhorar certas propriedades físicas de pós-alimentares, tais como a densidade, a fluidez, para melhorar a dispersão e reduzir a formação de poeira (MUKHERJEE; BHATTACHARYA, 2006). Porém, esta aglomeração pode desfavorecer a avaliação de tamanho e distribuição de partícula.

Figura 6 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas lipídicas carregadas de vitamina D₃ (A e B - T1) (C, D - T2) (E e F - T3), observadas com aumento de 500x (A, C, E) e 1000x (B, D, F). T1: apenas gordura e vitamina; T2: gordura, vitamina e cera; T3: gordura, vitamina e lecitina de soja.

Fonte: Própria autoria.

4.3 Tamanho médio e distribuição do tamanho das partículas

O tamanho médio das partículas foi apresentado na Tabela 4. As MLS apresentaram tamanho médio entre 83,0 a 98,6 μm , o que está dentro do esperado para micropartículas produzidas por *spray chilling*.

Tabela 4– Diâmetro médio de volume (DMV) das micropartículas lipídicas sólidas carregadas com vitamina D₃ produzidas por *spray chilling*

FORMULAÇÃO	DMV* (μm)
T1	83,0 $\pm$ 6,0 ^b
T2	94,0 $\pm$ 1,0 ^{ab}
T3	88,0 $\pm$ 4,0 ^{ab}
T4	98,6 $\pm$ 2,0 ^a

* Média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas por uma mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. T1: apenas gordura e vitamina; T2: gordura, vitamina e cera; T3: gordura, vitamina e lecitina de soja; T4: amostra obtida pela atomização da gordura pura.

Fonte: Própria autoria.

Não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos contendo a vitamina, porém o T1 diferiu significativamente da amostra controle produzida apenas com gordura. Este resultado permite inferir que a incorporação da vitamina resultou em redução do tamanho de partícula e que adição dos aditivos – cera e lecitina - tornou a aumentar o tamanho das partículas, de forma que os tamanhos médios de T2 e T3 não diferiram do T4.

A variação determinada para este parâmetro costuma ser explicada pela diferença na viscosidade da alimentação que interfere diretamente no tamanho da partícula (ALBERTINI et al., 2008). Desta forma, possivelmente as partículas

produzidas apenas com a vitamina (T1) apresentaram alimentação com viscosidade menor que as alimentações preparadas para as partículas produzidas apenas com gordura. Porém, este parâmetro não foi analisado, o que dificulta a avaliação. Tal comportamento pode ser justificado pela influência da velocidade de Ultra-Turrax durante o preparo do tratamento (T1) poderia ter alterado a viscosidade e provocado variações no tamanho da partícula.

A distribuição de tamanho das micropartículas foi monocaudal para todos os tratamentos com maior frequência de partículas entre 80 e 100 μm (Figura 7).

O tamanho das partículas tem grande importância na textura dos alimentos, em todos os tratamentos foram observados diâmetros menores que 100 μm . O aspecto sensorial de alimentos pode ser diretamente influenciado pela adição de partículas em sua formulação, micropartículas com diâmetros menores podem evitar um impacto sensorial negativo (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2009).

Inúmeros parâmetros podem influenciar o tamanho médio das partículas obtidas por *spray chilling*, entre eles parâmetros de processo, com destaque para pressão de atomização e temperatura (MASCHKE et al., 2007), taxa de alimentação, o carreador lipídico, material ativo, viscosidade, tipo e tamanho de atomizador (ALBERTINI et al., 2008; ILIĆ et al., 2009; MASCHKE et al., 2007), composição lipídica da matriz, condições de armazenamento, entre outros. Isso porque estes se correlacionam com o processo de cristalização lipídica (HEURTAULT et al., 2003). Tanto é que na literatura constam relatos da obtenção de micropartículas com tamanho médio na faixa de 13-50 μm (SAVOLAINEN et al., 2002; CHAMBI et al., 2008; LEONEL et al., 2010; RIBEIRO; ARELLANO; GROSSO, 2012; ALVIM et al., 2013) e 50-300 μm (RODRIGUEZ et al., 1999; MASCHKE et al., 2007; ALBERTINI et al., 2008; ILIĆ et al., 2009). Os valores de tamanhos médios de partícula obtidos nesse trabalho estão na faixa do que é citado na literatura como satisfatório para micropartículas produzidas por *spray chilling*.

Figura 7 – Distribuição de tamanho das micropartículas (T1: apenas gordura e vitamina; T2: gordura, vitamina e cera; T3: gordura, vitamina e lecitina de soja)

Fonte: Própria autoria.

4.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier – FTIR

A análise de espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier permite detectar possíveis modificações das propriedades físico-químicas e interações entre material ativo, carreador e os componentes das formulações. Os espectros obtidos dos ingredientes utilizados tais como vitamina D₃, lecitina de soja, cera de abelha, gordura, e das micropartículas (T1, T2 e T3) são apresentados nas Figuras 8 e 9.

Espectroscopia FTIR é amplamente utilizado na indústria de alimentos para fornecer informações valiosas sobre a estrutura e identificação de grupos funcionais químicos dentro do material. Além disso os autores manifestam o conhecimento sobre as interações que podem ser úteis para promover a elaboração de alimentos

saudáveis e que pode atender às necessidades de pessoas que têm restrições alimentares, mantendo as propriedades tecnológicas e sensoriais do produto (MOSER; CORNELIO; NICOLETTI TELIS, 2013).

Para a vitamina D₃ os picos característicos foram obtidos em 1463, 1740, 2850, 3000 e 3292 cm⁻¹. O pico em 3292 cm⁻¹ é atribuído a ligação de hidrogênio O–H. Em 3000 cm⁻¹ com a cadeia acil C–H. O espectro obtido neste trabalho para a vitamina D₃ livre diferiu um pouco do apresentado por Teng, Luo e Wang (2013). Estes autores reportaram apenas que trabalharam com Vitamina D grau analítico, mas não apresentaram a marca da vitamina, ou qualquer outra informação a respeito.

Para a lecitina de soja os picos característicos foram em 1042, 2851 e 2919 cm⁻¹, sendo o primeiro correspondente às ligações com o fósforo (P=O) (SILVERSTEIN et al., 2006). Para a cera de abelha os picos característicos 2851 e 2919 cm⁻¹, que estão relacionados com a presença de compostos carbonilados. Outro pico característico da cera foi 1172 cm⁻¹ que está relacionada com a presença de ésteres (RITTER et al., 2001). Os picos característicos obtidos para gordura pura utilizada como material carreador foram 2851, e 2919 cm⁻¹ que estão relacionados com a presença de compostos carbonilados, outro pico característico foi 1170 cm⁻¹ com a presença de ésteres no composto lipídico (SILVERSTEIN et al., 2006). Essas características dos espectros também observaram Matos Jr. (2013) e Oliveira (2014) que utilizaram gordura como carreador no processo de *spray chilling*.

Os espectros obtidos para as MLS foram semelhantes aos da gordura, cera, lecitina e vitamina D₃, o que era esperado, pois esses materiais são muito semelhantes do ponto de vista químico. A única diferença entre os espectros foi o pico a 3292 cm⁻¹, que apareceu exclusivamente no espectro da vitamina D₃. Como este pico está ausente nas MLS, supõem-se que a vitamina está imobilizada no interior da matriz lipídica, o que é interessante para sua proteção.

Figura 8 - Espectros de infravermelho dos ingredientes das partículas

Figura 9 - Espectros de infravermelho das micropartículas. Onde T1: apenas gordura e vitamina; T2: gordura, vitamina e cera; T3: gordura, vitamina e lecitina de soja

Fonte: Própria autoria.

4.5 Avaliação da estabilidade da vitamina D₃ livre e microencapsulada

A estabilidade da vitamina D₃ livre é apresentada na Tabela 5 e Figura 10. A temperatura influenciou na estabilidade desta vitamina, de forma que quanto maior a temperatura de estocagem, maior sua degradação. À temperatura de refrigeração (10 °C) a vitamina livre foi bastante estável, tendo sido observada retenção de 95% ao longo de 65 dias de estocagem. A 25 °C a retenção ao longo de 65 dias foi cerca de 60%. Já a partir de sétimo dia de estocagem houve degradação significativa ($p < 0,05$) para as duas condições de estocagem.

Tabela 5– Estabilidade da vitamina D₃ livre armazenada por 65 dias, nas temperaturas de 10 e 25 °C, expressa em % de retenção

Temperatura °C	Tratamento	DIAS				
		1	7	15	27	65
10	Vitamina D ₃	100 ± 0,00 ^{Aa}	98,23 ± 0,46 ^{Ba}	97,44 ± 0,33 ^{Ca}	96,61 ± 0,21 ^{Da}	95,46 ± 0,10 ^{Ea}
25	Vitamina D ₃	100 ± 0,00 ^{Aa}	93,87 ± 0,40 ^{Bb}	92,50 ± 0,28 ^{Cb}	88,25 ± 0,14 ^{Db}	60,85 ± 0,25 ^{Eb}

Média ± Desvio padrão. Médias na mesma linha letra maiúscula e na mesma coluna letra minúscula, não diferem entre si ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Figura 10 – Estabilidade da vitamina D₃ livre estocada a 10 e 25 °C avaliada por 65 dias

Fonte: Própria autoria.

A estabilidade da vitamina D₃ microencapsulada é apresentada na Tabelas 6-7 e Figura 11. Exceto para o T2, a temperatura de estocagem também apresentou influência significativamente na estabilidade da vitamina D₃ encapsulada na maioria dos dias de estocagem (Tabela 6).

Os resultados dos tratamentos (T1, T2 e T3) foram semelhantes e não houve diferença significativa ($P>0,05$) na temperatura de 10 °C. Já para os tratamentos armazenados a 25 °C a degradação da vitamina D₃ foi maior nas MLS produzidas nos tratamentos T3 e T1 (Tabela 7).

Os resultados foram satisfatórios. A 10 °C a vitamina D₃ presente nas partículas se apresentou estável com valores superiores a 87% para os três tratamentos ao longo de 65 dias de estocagem. A 25 °C os três tratamentos apresentaram estabilidade ao longo de 65 dias com valores superiores a 71%. Esses resultados são promissores e mostram a viabilidade da técnica de *spray chilling* na produção de MLS carregadas com vitamina D₃.

Partículas produzidas com cera (T2) apresentaram os melhores resultados à temperatura ambiente, em comparação à vitamina livre e aos demais tratamentos,

com a cera presente na estrutura da MLS a perda da vitamina D₃ foi de menor de 14% depois de 65 dias, enquanto na forma livre, em T1 e T3 as perdas foram de aproximadamente, 40, 33 e 29%, respectivamente, no mesmo período. Este resultado permite inferir que a cera atuou como um modulador na partícula o que provavelmente promoveu a formação de estruturas cristalinas que garantiram melhor empacotamento ou acomodação dos cristais e portanto maior proteção à vitamina.

Os resultados obtidos neste trabalho foram mais satisfatórios que os reportados por Abbasi et al. (2014), quando avaliaram a estabilidade de vitamina D₃ encapsulada em nanopartículas produzidas com isolado protéico de soro (WPI) ao longo de 7 dias e observaram que o teor residual de vitamina D₃ reduziu para 47%, 39% e 34% após 2, 4, e 7 dias, respectivamente.

Tabela 6– Retenção (%) da vitamina D₃ microencapsulada em período de 65 dias, nas temperaturas de 10 e 25°C. Combinação temperatura - tratamento e tratamento - dia

Temperatura°C	Tratamento	DIAS			
		1	15	27	65
10	T1	100 ± 0,00 A;a	89,86 ± 3,53 B;a	89,70 ± 8,30 B;a	87,99 ± 6,61 B;a
25	T1	100 ± 0,00 A;a	87,84 ± 5,17 B;a	77,61 ± 6,90 C;b	77,45 ± 10,51 C;b
10	T2	100 ± 0,00 A;a	93,19 ± 2,25 B;a	92,20 ± 3,31 B;a	90,18 ± 2,23 B;a
25	T2	100 ± 0,00 A;a	91,17 ± 2,71 B;a	85,99 ± 8,80 B;b	86,27 ± 5,21 B;a
10	T3	100 ± 0,00 A;a	91,20 ± 4,83 B;a	86,86 ± 3,84 B;a	87,11 ± 6,81 B;a
25	T3	100 ± 0,00 A;a	83,16 ± 4,75 B;b	77,61 ± 6,91 B;b	71,80 ± 1,98 C;b

Média ± Desvio padrão. Médias na mesma linha letras maiúscula e na mesma coluna letra minúscula, não diferem entre si ($p < 0,05$). Três tratamentos foram estabelecidos: **T1**: Vitamina D₃ e gordura; **T2**: Vitamina D₃, gordura e Cera; **T3**: Vitamina D₃, gordura e lecitina.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 7– Retenção (%) da vitamina D₃ microencapsulada em período de 65 dias, nas temperaturas de 10 e 25°C. Combinação temperatura - tratamento e temperatura - dia

Temperatura°C	Tratamento	DIAS			
		1	15	27	65
10	T1	100 ± 0,00 A;a	89,86 ± 3,53 B;a	89,70 ± 8,30 B;a	87,99 ± 6,61 B;a
10	T2	100 ± 0,00 A;a	93,19 ± 2,25 B;a	92,20 ± 3,31 B;a	90,18 ± 2,23 B;a
10	T3	100 ± 0,00 A;a	91,20 ± 4,83 B;a	86,86 ± 3,84 B;a	87,11 ± 6,81 B;a
25	T1	100 ± 0,00 A;a	87,84 ± 5,17 B;a,b	77,61 ± 6,90 C;b	77,45 ± 10,51 C;b
25	T2	100 ± 0,00 A;a	91,17 ± 2,71 B;a	85,99 ± 8,80 B;a	86,27 ± 5,21 B;a
25	T3	100 ± 0,00 A;a	83,16 ± 4,75 B;b	77,61 ± 6,91 B;b	71,80 ± 1,98 C;b

Média ± Desvio padrão. Médias na mesma linha letras maiúscula e na mesma coluna letra minúscula, não diferem entre si ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Figura 11 - Estabilidade da Vitamina D₃ microencapsulada estocada a 10 °C (A) e 25 °C (B) e avaliada por 65 dias

Fonte: Própria autoria.

5 Conclusões

De acordo com os objetivos propostos e os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que é possível produzir micropartículas lipídicas sólidas carregadas com vitamina D₃ utilizando a técnica de *spray chilling*.

A técnica de *spray chilling* mostrou-se eficiente na microencapsulação de vitamina D₃ e propicia a obtenção de micropartículas esféricas, semelhantes morfológicamente - independentemente do aditivo utilizado, e aglomeradas.

Os tamanhos médios das partículas obtidas estão dentro da amplitude de valores que é citada na literatura como satisfatória, que são apropriados para um estudo futuro aplicado em alimentos, que não devem interferir negativamente na textura e características dos alimentos, medicamentos e alimentos fortificados em que podem ser aplicados. A distribuição das partículas foi monocaudal.

A temperatura ambiente, a estabilidade da vitamina D₃ microencapsulada comparada com a da vitamina D₃ livre foi consideravelmente maior, demonstrando que a técnica estudada é uma alternativa promissora para manutenção da estabilidade da vitamina D₃.

Para um estudo futuro seria interessante a aplicação de vitamina D₃ encapsulada em produtos alimentícios e o estudo de sua absorção, pois o veículo lipídico deve facilitar sua absorção no intestino, já que a vitamina é lipossolúvel.

Referências

- ABBASI, A. et al. Stability of vitamin D₃ encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate. **Food Chemistry**, v. 143, p. 379–383, 2014.
- AKIYAMA, Y. et al. pH-Independent controlled-release microspheres using polyglycerol esters of fatty acids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Hoboken, v. 83, p. 1600–1609, 1994.
- ALBERTINI, B. et al. Effect of Aerosil® on the properties of lipid controlled release microparticles. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 100, p. 233–246, 2004.
- ALBERTINI, B. et al. New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 69, p. 348–357, 2008.
- ALOIA, J. F. et al. Vitamin D intake to attain a desired serum 25-hydroxyvitamin D. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 87, n. 6, p. 1952–1958, 2008.
- ALVIM, I. D. et al. Use of the spray chilling method to deliver hydrophobic components: physical characterization of microparticles. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, p. 34–39, 2013.
- ARNSON, Y.; AMITAL, H.; SHOENFELD, Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 66, p. 1137–1142, 2007.
- AUGUSTIN, M. A. et al. Microencapsulation of food ingredients. **Food Australia**, North Ryde, v. 53, n. 6, p. 220–223, 2001.
- AUGUSTIN, M. A.; SANGUANSRI, L.; OLIVER, C. M. Functional properties of milk constituents: Application for microencapsulation of oils in spray-dried emulsions – a minireview. **Dairy Science & Technology**, Paris, v. 90, p. 137–146, 2010.
- BAKAN, J.A. Microencapsulação of foods and related products. **Food Technology**, Chicago, v. 27, n. 11, p. 34–44, 1973.
- BALLARD, J. M. et al. Degradation of vitamin D₃ in a stressed formulation: the identification of esters of vitamin D₃ formed by a transesterification with triglycerides. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 43, p. 142–150, 2007.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. et al. Size enlargement. In: CANOVAS, G. V. B. et al. **Food powders: physical properties processing and functionality**. New York: Kluwer Academic/Plenum, p. 175–198, 2005.

BRAITHWAITE, M. C. et al. Nutraceutical-based therapeutics and formulation strategies augmenting their efficiency to complement modern medicine: An overview. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 82–99, 2014.

BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release in the food and cosmetics industries. In: EI-NOKALY, M. A.; PIATT, D. M.; CHARPENTIER, B. A. (Eds.). **Polymeric delivery systems: properties and applications**. New York: Oxford University Press, 1993. p. 42-52.

BYRDWELL, W. C. Comparison of analysis of vitamin D3 in foods using ultraviolet and mass spectrometric detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, p. 2135–2146, 2009.

CHAMBI, H. N. M. et al. Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular mass: production, characterisation and release profiles. **Food Research International**, Kidlington, v. 41, p. 229–236, 2008.

CHEN, T. C. et al. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Maryland Heights, v. 460, p. 213–217, 2007.

CHIELLINI, G.; DELUCA, H. F. The importance of stereochemistry on the actions of vitamin D. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Bussum, v. 11, p. 840–859, 2011.

DELUCA, H. F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 80, p. 1689–1696, 2004.

DESAI, K. G. H.; JIN PARK, H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, New York, v. 23, p. 1361–1394, 2005.

DONG, Y. et al. Scalable ionic gelation synthesis of chitosan nanoparticles for drug delivery in static mixers. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 94, n. 2, p. 940–945, 2013.

DZIEZAK, J. D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, Chicago, n. 42, p. 136-151, 1988.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; OKURO, P.K.; MATOS Jr, F.E. Encapsulation via Spray chilling/cooling/congealing. In: MUNMAYA K. M. (Org.). **Handbook of Encapsulation and controlled release**. Boca Raton: CRC Press, 2015, v. 1, p. 71-88.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G.A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, p. 103–112, 2008.

FINI, A. et al. Ultrasound-compacted and spray-congealed indomethacin polyethyleneglycol systems. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 247, p. 11–22, 2002.

FINI, A. et al. Theophylline-loaded compritol microspheres prepared by ultrasound assisted atomization. **Journal of Pharmaceutics Science**, Hoboken, v. 100, n. 2, p. 743–757, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Vitamin and mineral requirements in human nutrition**. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 1998. p. 1–20.

GAMBOA, O. D.; GONÇALVES, L. G.; GROSSO, C. F. Microencapsulation of tocopherols in lipid matrix by spray chilling method. **Procedia Food Science**, Amsterdam, v. 1, p. 1732–1739, 2011.

GANDER, B. et al. Thermodynamic approach to protein microencapsulation into poly(D,L-lactide) by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 129, n. 95, p. 51–61, 1996.

GIBBS, B. F. et al. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Abingdon, v. 50, p. 213–224, 1999.

GIBSON, C. C. et al. Dietary vitamin D and Its metabolites non-genomically stabilize the endothelium. **Plos One**, San Francisco, v. 10, p. e-0140370, 2015.

GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 146, n. 3, p. 276–290, 2010.

GOUIN, S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, Kidlington, v. 15, p. 330–347, 2004.

HAHAM, M. et al. Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein micelles. **Food & Function**, Cambridge, v. 3, p. 737, 2012.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 23, p. 1670–1677, 2009.

HEURTAULT, B. et al. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 24, p. 4283–4300, 2003.

HOLDEN, J. M.; LEMAR, L. E. Assessing vitamin D contents in foods and supplements: challenges and needs. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 88, p. 551S–553S, 2008.

HOLICK, M. F.; MACLAUGHLIN, J. A.; DOPPELT, S. H. Regulation of cutaneous previtamin D₃ photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator. **Science**, New York, v. 211, n. 1980, p. 590–593, Sept. 1981.

HOLICK, M. F. The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system. **The Journal of Investigative Dermatology**, London, v. 77, n. 1, p. 51-58, 1981.

HOLICK, M. F. McCollum Award Lecture, 1994: Vitamin D-new horizons for the 21st century. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 60, p. 619-630, 1994.

HOLICK, F. Environmental factors that influence production of vitamin D₃ the cutaneous. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 61, p. 638S–45S, 1995.

HOLICK, M. F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 80, p. 1678–1688, 2004a.

HOLICK, M. F. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 79, p. 362-371, 2004b.

HOLICK, M. F. The influence of vitamin D on bone health across the life cycle: the vitamin d epidemic and its health consequences. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 135, p. 2739S–2748S, 2005.

HOLICK, M. Vitamin D deficiency. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 357, p. 266–81, 2007.

HOLICK, M. F.; CHEN, T. C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 87, p. 1080S–6S, 2008.

HOLICK, M. F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Chevy Chase, v. 96, p. 1911–1930, July. 2011.

HUANG, Q. R.; Yu, H. L.; Ru, Q. Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals Using Nanotechnology. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 75, n. 1, p. R50–R57, 2010.

ILIĆ, I. et al. Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 381, p. 176–183, 2009.

Institute of Medicine. Report Release: Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D, 2010.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

KILLEEN, M. J. The process of spray drying and spray congealing. **Pharmaceutics Engineering**, Tampa, v. 13, p. 56-64, 1993.

LAKKIS, J.M. Marketing perspective of encapsulated technologies . In: LAKKIS, J. M. **Encapsulation and controlled release technologies in food systems**. Blackwell Publishing, Iowa, p. 217-218, 2007.

LAPP, J. L. Vitamin D: bone health and beyond. **American Journal of Lifestyle Medicine**, Thousand Oaks, v. 3, p. 386–393, 2009.

LEE, J. H. et al. Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? **Journal of the American College of Cardiology**. New York, v. 52, n. 24, p. 1949–1956, 2008.

LEONEL, A. J. et al. Production and characterization of lipid microparticles produced by spray cooling encapsulating a low molar mass hydrophilic compound. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, p. 276–281, 2010.

LEVENTIS, P.; PATEL, S. Clinical aspects of vitamin D in the management of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, Oxford, v. 47, p. 1617–1621, Aug. 2008.

LIND, L. et al. Vitamin D is related to blood pressure and other cardiovascular risk factors in middle-aged men. **American Journal of Hypertension**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 894–901, 1995.

LUO, Y.; TENG, Z.; WANG, Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, p. 836–843, 2012.

MADENE, A. et al. Flavour encapsulation and controlled release - a review. **International Journal of Food Science and Technology**, Chichester, v. 41, p. 1–21, 2006.

MARQUES, C. D. L. et al. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 67-80, 2010.

MARTINI, L. A. et al. Prevalence and correlates of calcium and vitamin D status adequacy in adolescents, adults, and elderly from the health survey—São Paulo. **Nutrition**, New York, v. 29, p. 845–850, 2013.

MASCHKE, A. et al. Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 65, p. 175–187, 2007.

MATOS Jr., F. E. **Desenvolvimento, caracterização e aplicação de microcápsulas de ácido ascórbico obtidas por spray chilling**. 2013. 150 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2013.

MATOS JR, F.E. et al. Development and characterization of solid lipid microparticles loaded with ascorbic acid and produced by spray congealing. **Food Research International**, v. 67, p. 52-59, 2015.

MERKE, J. et al. Identification and regulation of 1, 25-dihydroxyvitamin d₃ receptor activity and biosynthesis of 1, 25-dihydroxyvitamin d₃ assay of vdr activity. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 83, p. 1903–1915, June. 1989.

MCCARRON, P. A; DONNELLY, R. F.; AL-KASSAS, R. Comparison of a novel spray congealing procedure with emulsion-based methods for the micro-encapsulation of water-soluble drugs in low melting point triglycerides. **Journal of Microencapsulation**, Abingdon, v. 25, p. 365–378, Sept. 2008.

MOSEKILDE, L. Vitamin D requirement and setting recommendation levels : long-term perspectives. **Nutrition Reviews**, Washington, v. 66, suppl. 2, p. S170-7, 2008.

MOSER, P.; CORNELIO, M. L.; NICOLETTI TELIS, V. R. Influence of the concentration of polyols on the rheological and spectral characteristics of guar gum. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 53, n. 1, p. 29–36, 2013.

MOURTZINOS, I. et al. Encapsulation of nutraceutical monoterpenes in beta-cyclodextrin and modified starch. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 73, n. 1, p. 89–94, 2008.

MUKHERJEE, S.; BHATTACHARYA, S. Characterization of agglomeration process as a function of moisture content using a model food powder. **Journal of Texture Studies**, Hoboken, v. 37, n. 0821, p. 35–48, 2006.

NEO, Y. P. et al. Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: a physicochemical study based on zein-gallic acid system. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 136, n. 2, p. 1013–1021, 2013.

NICOLAYSEN, B. Y. R. Studies upon the mode of action of vitamin d . compounds in muscles , liver and kidneys as influenced by different levels of vitamin d and phosphorus in the diet . **Biochemical Journal**, London, v. 30, p. 1329–1337, 1936.

NORMAN, A W. Studies on the vitamin D endocrine system in the avian. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 117, p. 797–807, June. 1987.

OLIVEIRA, M. S. **Production and characterization of solid lipid microcapsules loaded with protein hydrolysate obtained by spray chilling.** (2014). 66f. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

OKAMURA, W.H. et al. Chemistry and conformation of vitamin D molecules. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 53, n. 1-6, p. 603-613, 1995.

OKURO, P. K.; MATOS, F.E.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Technological challenges for spray chilling encapsulation of functional food ingredients. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 51, n. 2, p. 171–182, 2013.

OZTURK, B. et al. Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D3 bioaccessibility. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 187, p. 499–506, 2015.

PASSERINI, N. et al. Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 88, p. 263–275, 2003.

PEDROSO, D.L., et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in cocoa butter using spray chilling technology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 777–783, 2013.

PELISSARI, J.R. et al. Production of solid lipid microparticles loaded with lycopene by spray chilling: Structural characteristics of particles and lycopene stability. **Food and Bioproducts Processing**, v.98, p. 86-94, 2016.

PENTEADO, M. V. C. (Org.). **Vitaminas**: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri: Manole, 2003.

RE, M. I. Cápsulas inteligentes. **Ciencia Hoje**, Rio de Janeiro, v. 27, n.162, p. 24-29, 2000.

RIBEIRO, M. D. M.; ARELLANO, D. B.; GROSSO, C. R. F. The effect of adding oleic acid in the production of stearic acid lipid microparticles with a hydrophilic core by a spray-cooling process. **Food Research International**, Kidlington, v. 47, n. 1, p. 38–44, 2012.

RISCH, S.J. Encapsulation: overview of uses and techniques. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. Washington, DC: ACS, 1995, p. 2–7. (ACS Symposium. Series, 590).

RITTER, B. et al. Detection of coating waxes on apples by differential scanning calorimetry. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 212, p. 603–607, 2001.

RODRIGUEZ, L. et al. Description and preliminary evaluation of a new ultrasonic atomizer for spray-congealing processes. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.183, p.133–143, 1999.

ROSS, R. P. et al. Novel cultures for cheese improvement. **Trends in Food Science and Technology**, Kidlington, v. 11, p. 96–104, 2000.

ROSS, A. C. et al. The 2011 Report on dietary reference intakes for calcium and vitamin d from the institute of medicine : what clinicians need to know. v. 96, p. 53-58, 2011.

SALVIM, M. O. et al. Production and structural characterization of solid lipid microparticles loaded with soybean protein hydrolysate. **Food Research International**, v. 76, p. 689-696, 2015.

SAVOLAINEN, M. et al. Evaluation of controlled-release polar lipid microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 244, n. 1-2, p. 151-161, 2002.

SAS Institute, Inc. **SAS User's Guide**. Statistics, Version 6.11. Cary, NC: SAS Institute, Inc., 1995.

SCHEDL, H. P. et al. Calcium and sodium transport and vitamin D metabolism in the spontaneously hypertensive rat. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 73, p. 980–986, Apr. 1984.

SCHROOYEN, P. M.; VAN DER MEER, R.; DE KRUIF, C. G. Microencapsulation: its application in nutrition. **The Proceedings of the Nutrition Society**, New Zeland, v. 60, p. 475–479, 2001.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v. 33, n. 6, p. 501–547, 1993.

SHENG, Q.; DEUTSCH, D.; CRAIG, D. Q. M. An investigation into the interaction between taste masking fatty acid microspheres and alkaline buffer using thermal and spectroscopic analysis. **Journal of Pharmaceutical Science**, Hoboken, v. 95, n. 5, p. 1022–1028, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC. 2006.490 p.

SOUZA, C.G. **A importância da vitamina D na prevenção de quedas em idosos**. 2013. 37 f. Trabalho de Conclusão do Curso (Especialização em Saúde Pública) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SZODORAY, P. et al. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. **Scandinavian Journal of Immunology**, Chichester, v. 68, p. 261–269, 2008.

STAFFAS, A.; NYMAN, A. Determination of cholecalciferol (vitamin D3) in selected foods by liquid chromatography: NMKL collaborative study. **Journal of AOAC International**, Rockville, v. 86, n. 2, p. 400–406, 2003.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v. 7, n. 2, p.12–20, 2006.

TAYLOR, M. J.; TANNA, S.; SAHOTA, T. In vivo study of a polymeric glucose-sensitive insulin delivery system using a rat model. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Hoboken, v. 99, n. 5, p. 4215–4227, 2010.

TENG, Z., LUO, Y.C.; WANG, Q. Carboxymethyl chitosan–soy protein complex nanoparticles for the encapsulation and controlled release of vitamin D3. *Food Chemistry*, v. 141, n. 1, p. 524–532, 2013.

TSIARAS, W. G.; WEINSTOCK, M. A. Factors influencing vitamin d status. **Acta Dermato-Venereologica**, Sweden, v. 91, n. 2, p. 115–124, 2011.

UDDIN, M.S.; HAWLADER, M.N.A; ZHU, H.J. Microencapsulation of ascorbic acid: effect of process variables on product characteristics. **Journal of Microencapsulation**, Abingdon, v. 18, n. 2, p. 199–209, 2001.

VAN SCHOOR, N. M.; LIPS, P. Worldwide vitamin D status. **Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 671–680, 2011.

VOS, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 20, n. 4, p. 292–302, 2010.

WANG, C. Vitamin D deficiency (VDD): the culprit of cardiometabolic. **Jornal de Pediatria**, São Paulo, v. 90, n. 1, p. 2013–2015, 2014.

WANG, B. et al. Microencapsulation of tuna oil fortified with the multiple lipophilic ingredients vitamins A, D3, E, K2, curcumin and coenzyme Q10. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 19, p. 893–901, 2015.

WACKER, M.; HOLICK, M. F. Vitamin D-effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. **Nutrients**, Basel, v. 5, p. 111–148, 2013.

YAJIMA, T., UMEKI, N., ITAI, S. Optimum spray congealing conditions for masking the bitter taste of clarithromycin in wax matrix. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 47, n. 2, p. 220–225, 1999.

YAJIMA, T. et al. Particle design for taste -masking using a spray congealing technique. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 44, n. 1, p. 187-191, 1996.

YULIANI, S. et al. Application of microencapsulated flavor to extrusion product. **Food Reviews International**, New York, v. 20, n. 2, p. 163–185, 2004.

ZIANI, K.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation of functional lipophilic components in surfactant-based colloidal delivery systems: vitamin E, vitamin D, and lemon oil. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 134, n. 2, p. 1106–1112, 2012.

ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, E. Overview of microencapsulation for use in food products or process and methods to make them. In: ZUIDAM, N. J.; NEDOVIC, V. A. (Eds.). **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**. New York: Springer, 2010. cap. 2, p. 3–30.