



**YASMIM FERNANDA DA SILVA**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO FERRO  
PRODUZIDAS POR *SPRAY CHILLING***

**LAVRAS - MG**

**2022**

**YASMIM FERNANDA DA SILVA**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS  
CONTENDO FERRO PRODUZIDAS POR *SPRAY CHILLING***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Diego Alvarenga Botrel  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFPA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Yasmim Fernanda da.

Produção e caracterização de micropartículas lipídicas  
contendo ferro produzidas por spray chilling / Yasmim Fernanda da  
Silva. - 2022.

61 p. : il.

Orientador(a): Diego Alvarenga Botrel.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Spray cooling. 2. Sulfato ferroso. 3. Cinética de liberação. I.  
Botrel, Diego Alvarenga. II. Título.

**YASMIM FERNANDA DA SILVA**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS  
CONTENDO FERRO PRODUZIDAS POR *SPRAY CHILLING***

**PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF LIPIDIC MICROPARTICLES  
CONTAINING IRON PRODUCED BY *SPRAY CHILLING***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2022.

Profa. Dra. Lizzy Ayra Alcantara Verissimo – UFLA

Profa. Dra. Joyce Maria Gomes da Costa – UFVJM

Prof. Dr. Diego Alvarenga Botrel  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2022**

*Aos meus pais por toda força e incentivo.*

*São meus maiores exemplos.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus; sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais Ilda e Carlos, que sempre estiveram do meu lado, me dando total apoio. Ao meus irmãos Vinicius e Renato por todo incentivo.

Ao meu namorado, Franklin, pelo carinho, incentivo, ajuda, pela companhia e compreensão de sempre.

Às minhas cunhadas Dannyelle e Marcia por sempre vibrarem comigo a cada conquista!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Diego Alvarenga Botrel. Obrigada por toda ajuda e pelos ensinamentos.

Agradeço as professoras Dra. Lizzy Ayra Alcantara Verissimo e Dra. Joyce Maria Gomes da Costa, obrigada por aceitar o convite em participar desta banca e contribuir com esta dissertação.

Aos amigos do departamento, em especial a Dona Creuza pelas ajudas nas análises e as conversas do dia a dia.

Agradeço o pessoal do laboratório de embalagens e encapsulação, em especial a Jayne Figueiredo por toda ajuda com as análises, paciência em me ensinar as metodologias, de responder minhas mensagens a qualquer hora e não foram poucas. E também as conversas boas que tivemos! Você é 10!

A todos os meus amigos, que direta ou indiretamente, apoiaram-me, auxiliaram e torceram por mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de mestrado. À FAPEMIG, ao CNPq e à Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade.

*“A persistência é o caminho do êxito”  
(Charles Chaplin)*

## RESUMO

A deficiência de micronutrientes é um grande problema de saúde global, causado principalmente por dietas pobres em nutrientes essenciais. A deficiência de ferro é considerada o distúrbio nutricional mais prevalente no mundo. Para combater a falta de micronutrientes na dieta, podem ser aplicadas estratégias de fortificação de alimentos. No entanto, a fortificação direta de alimentos com ferro pode resultar em alterações sensoriais indesejáveis na cor, odor e sabor dos alimentos. Neste contexto, o uso de processos de encapsulação pode ajudar a evitar ou mascarar alterações sensoriais indesejadas em alimentos fortificados e, ao mesmo tempo, reduzir a interação deste elemento com componentes alimentares aumentando ainda a sua biodisponibilidade. Entre as diversas técnicas utilizadas para microencapsulação, a técnica de spray chilling, também conhecido como spray cooling ou spray congealing, vem recebendo atenção especial devido às suas vantagens em relação às demais técnicas, dentre elas o uso de baixas temperaturas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi produzir micropartículas contendo ferro, encapsulado em matriz lipídica, utilizando a técnica de spray chilling e avaliar suas propriedades e as características de liberação do ativo. Foram avaliadas formulações com diferentes proporções de cera de abelha e manteiga de cacau. As micropartículas lipídicas obtidas por spray chilling foram avaliadas por meio de difratometria por Raio-X, tamanho de partículas, rendimento, eficiência de retenção e morfologia de superfície. Foi avaliado o efeito de diferentes temperaturas (10, 20, 30 e 40 °C) no perfil de liberação de ferro presente nas micropartículas. A cinética de liberação foi avaliada usando os modelos de ordem zero, primeira ordem, Korsmeyer-Peppas e Higuchi. A liberação do ferro em um sistema simulado gastrointestinal também foi estudada. As micropartículas obtiveram valores de *short spacings* os quais indicam característica polimórfica  $\beta'$ . Os diâmetros médios das micropartículas lipídicas variaram de 25,9 a 31,4  $\mu\text{m}$ . O rendimento do processo alcançou valores de até 75,0%. A eficiência da microencapsulação obtida foi, em média, 75,2%. A análise por microscopia eletrônica de varredura mostrou que as superfícies das micropartículas que continham manteiga de cacau apresentaram formas irregulares, aglomeradas e de tamanho variado. A menor liberação do ferro foi observada no tratamento 4, constituído de cera de abelha e manteiga de cacau na proporção de 1:1 m/m. A presença de manteiga de cacau reduziu a intensidade de liberação de ferro pelas micropartículas lipídicas. O mecanismo de liberação observado na cinética de liberação, foi a difusão e relaxamento, e o modelo que melhor se ajustou aos dados obtidos foi o modelo de ordem zero. Os resultados mostraram que a matriz lipídica foi capaz de proteger e evitar a liberação em meio gástrico simulado, permitindo a liberação mais significativa em meio intestinal simulado com percentuais de 36,1% a 56,3%. As micropartículas carregadas com sulfato de ferroso produzidas por spray chilling mostraram-se como um sistema promissor para o carregamento de ferro com potencial aplicação em alimentos.

**Palavras-chave:** Encapsulação. Sulfato ferroso. Cinética de liberação. Spray cooling.

## ABSTRACT

Micronutrient deficiency is a major global health problem, mainly caused by diets lacking in essential nutrients. Iron deficiency is considered the most prevalent nutritional disorder in the world. To combat the lack of micronutrients in one's diet, food fortification strategies can be applied. However, direct fortification of foods with iron can result in undesirable sensory changes in the color, odor, and taste of foods. In this context, the use of encapsulation processes may help to avoid or to mask unwanted sensory changes in fortified foods and, at the same time, it may reduce the interaction of this element with food components, further increasing its bioavailability. Among the various techniques used for microencapsulation, the spray chilling technique, also known as spray cooling or spray congealing, has been receiving special attention due to its advantages over other techniques, including the use of low temperatures. Therefore, the objective of this work was to produce microparticles containing iron, encapsulated in a lipid matrix, using the spray chilling technique, and to evaluate its properties and the characteristics of iron release. Formulations with different proportions of beeswax and cocoa butter were evaluated. Lipid microparticles obtained by spray chilling were evaluated by X-ray diffraction, particle size, yield, retention efficiency and surface morphology. The effect of different temperatures (10, 20, 30 and 40 °C) on the iron release profile present in the microparticles was evaluated. Release kinetics was evaluated using zero-order, first-order, Korsmeyer-Peppas and Higuchi models. Iron release in a simulated gastrointestinal system was also studied. The microparticles obtained short spacing values which indicate a  $\beta'$  polymorphic characteristic. The mean diameters of the lipid microparticles ranged from 25.9 to 31.4  $\mu\text{m}$ . The process yield reached values of up to 75.0%. The efficiency of the microencapsulation obtained was, on average, 75.2%. Scanning electron microscopy analysis showed that the surfaces of the microparticles containing cocoa butter had shapes which were irregular, agglomerated, and varied in size. The lowest iron release was observed in treatment 4, consisting of beeswax and cocoa butter in a proportion of 1:1 m/m. The presence of cocoa butter reduced the intensity of iron release by the lipid microparticles. The release mechanism observed in the release kinetics was diffusion and relaxation, and the model that best fitted the data obtained was the zero-order model. The results showed that the lipid matrix was able to protect and prevent the release in the simulated gastric medium, allowing a more significant release in the simulated intestinal medium with percentages from 36.1% to 56.3%. The microparticles loaded with ferrous sulfate produced by spray chilling proved to be a promising system for carrying iron with potential application in foods.

**Keywords:** Encapsulation. Ferrous sulfate. Release kinetics. Spray cooling.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1– ESTRUTURA DO FERRO HEME.....	18
FIGURA 2 - TIPOS DE MECANISMOS DE LIBERAÇÃO PARA INGREDIENTES ALIMENTÍCIOS ENCAPSULADOS .....	29
FIGURA 3 - SPRAY CHILLER. (A) SISTEMA DE AQUECIMENTO DA AMOSTRA. (B) SISTEMA DE AQUECIMENTO DO AR COMPRIMIDO. (C) SISTEMA DE RESFRIAMENTO DO AR (-5°C A 20°C).	32
FIGURA 4 – ASPECTO VISUAL DAS MICROPARTICULAS LIPIDICAS PRODUZIDAS CONTENDO FERRO .....	38
FIGURA 5 - MICROGRAFIAS DE PARTÍCULAS DE FERRO.....	40
FIGURA 6 – DIFRATOGRAMA DO SULFATO FERROSO. ....	44
FIGURA 7– DIFRATOGRAMA DOS MATERIAIS DE PAREDE, MANTEIGA DE CACAU (MC) E CERA DE ABELHA (CA). ....	45
FIGURA 8 – DIFRATOGRAMA DAS MICROPARTICULAS CONTENDO FERRO.....	46
FIGURA 9– PERCENTUAL DE LIBERAÇÃO DO FERRO DAS MICROPARTICULAS NAS DIFERENTES TEMPERATURAS. ....	48
FIGURA 10– PERCENTUAL DE FERRO LIBERADO DE MICROPARTICULAS LIPIDICAS EM SOLUÇÃO GÁSTRICA E SOLUÇÃO INTESTINAL SIMULADA. ....	51

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESUMO DE TRABALHOS ENVOLVENDO A TECNOLOGIA DE SPRAY CHILLING PARA MICROENCAPSULAÇÃO DE MICRONUTRIENTES.....	22
TABELA 2 - TIPOS DE LIPÍDIOS USADOS USADOS NA MICROENCAPSULAÇÃO POR SPRAY CHILLING E SUAS PROPRIEDADES .....	24
TABELA 3 - DESCRIÇÃO DOS TRATAMENTOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS.....	33
TABELA 4 - CONSTITUENTES DE PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES DE FLUIDOS DE DIGESTÃO SIMULADOS.....	36
TABELA 5 - CONDIÇÕES DO AMBIENTE E RENDIMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS.....	37
TABELA 6 - DIÂMETRO DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS E O ÍNDICE DE POLIDISPERSIBILIDADE .....	41
TABELA 7 - EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS PRODUZIDAS POR SPRAY CHILLING. ....	43
TABELA 8 - PERCENTUAL DE LIBERAÇÃO DO FERRO DAS MICROPARTICULAS NO TEMPO DE 240 MINUTOS NAS DIFERENTES TEMPERATURAS.....	49
TABELA 9 - PARÂMETROS DOS MODELOS CINÉTICOS OBTIDOS PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DO SULFATO DE FERROSO NAS TEMPERATURAS DE 10 °C, 20 °C, 30 °C E 40 °C. ....	50

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Ferro e sua importância .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.1</b>	<b>O micronutriente Ferro.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Deficiência de ferro.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Fortificação e enriquecimento de alimentos com ferro .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Encapsulação por Spray Chilling.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Agentes encapsulantes .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Manteiga de cacau .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Cera de abelha .....</b>	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>Polimorfismo.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5</b>	<b>Liberação Controlada.....</b>	<b>28</b>
<b>2.6</b>	<b>Cinética de Liberação.....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>Preparo das soluções.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3</b>	<b>Processo de obtenção das micropartículas lipídicas por spray chilling .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4</b>	<b>Planejamento experimental.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5</b>	<b>Caracterização das micropartículas lipídicas.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Morfologia de Superfície por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .</b>	<b>33</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Tamanho e distribuição de partículas.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Eficiência de Retenção.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5.4</b>	<b>Determinação do teor de Ferro .....</b>	<b>34</b>
<b>3.5.5</b>	<b>Difração de Raios-X.....</b>	<b>34</b>
<b>3.6</b>	<b>Liberação Controlada.....</b>	<b>35</b>
<b>3.7</b>	<b>Avaliação in vitro das micropartículas em soluções simuladas gástrica e intestinal.....</b>	<b>35</b>
<b>3.8</b>	<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Caracterização das micropartículas lipídicas.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Condições do processo e rendimento .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Tamanho e distribuição de partículas.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Eficiência de retenção.....</b>	<b>42</b>

<b>4.1.4</b>	<b>Difração de Raios-X (DRX).....</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Liberação Controlada.....</b>	<b>46</b>
<b>4.3</b>	<b>Modelos Cinéticos de Liberação .....</b>	<b>49</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação in vitro.....</b>	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A deficiência de micronutrientes é um grande problema de saúde global, causado principalmente por dietas pobres em nutrientes essenciais (DARNTON-HILL, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a deficiência de ferro é o distúrbio nutricional mais prevalente no mundo. Afetam cerca de 2 bilhões de pessoas, principalmente mulheres e crianças, em países em desenvolvimento ( DIOSADY et al, 2019).

Para combater a desnutrição de micronutrientes, podem ser aplicadas estratégias de baixo custo como: fortificação ou enriquecimento de alimentos e suplementação de dieta. No entanto, a fortificação direta de alimentos com ferro pode resultar em alterações sensoriais indesejáveis na cor, odor e sabor dos alimentos (GAUCHERON, 2000). Além disso, o ferro pode interagir com os componentes do produto o que pode diminuir sua biodisponibilidade, que é definida como a proporção de um nutriente que é absorvido e utilizado nas funções corporais normais (HURRELLE E GLI, 2010 ).

Neste contexto, o uso de processos de encapsulação de ferro pode ajudar a evitar ou mascarar alterações sensoriais indesejadas em alimentos fortificados, ao mesmo tempo, reduzir a interação deste elemento com componentes alimentares e ainda aumentar a sua biodisponibilidade (GHARIBZAHEDI e JAFARI, 2017; GERA et al., 2012; ZLOTKIN et al. 2001). Dentre as diversas técnicas de microencapsulação, a técnica de *spray chilling* vem se destacando. O processo consiste na formação de micropartículas lipídicas sólidas por meio da atomização de ingredientes ativos que podem ser de origem hidrofílica ou hidrofóbica, dissolvidos ou dispersos em materiais encapsulantes de lipídios fundidos ( ORIANI et al. 2016). As gotículas se solidificam ao entrar em contato com um fluxo de ar frio, dando origem a micropartículas lipídicas sólidas com características de um produto em pó (SORITA et al. 2021).

Os benefícios do processo por *spray chilling* se dão pela a proteção proporcionada pela matriz lipídica ao composto ativo frente ao oxigênio e à umidade, resultando em maior estabilidade e potencializando melhor a biodisponibilidade do ativo, permitindo uma liberação controlada do material ativo, redução na higroscopicidade dos ativos hidrofílicos, além de ser uma técnica relativamente de menor custo e de fácil reprodutibilidade (ABBAS et al. 2012).

Por outro lado, uma das desvantagens dessa técnica de microencapsulação é a quantidade significativa de material ativo que permanece localizado na superfície das micropartículas, ou se difunde durante a estocagem. Essa limitação está diretamente relacionada

ao tipo de partícula formada (matriz) e ao fenômeno de polimorfismo dos óleos e gorduras vegetais, o qual consiste na capacidade de um lipídio sólido apresentar a mesma composição química, no entanto, delinear diferentes estruturas cristalinas e empacotamentos moleculares (CHEN, MCCLEMENTS e DECKER, 2011).

A cinética de liberação do ativo também pode ser influenciada por fatores, como: as forças osmóticas, a difusão lenta da água através das imperfeições do material de parede, os mecanismos de ruptura das partículas, entre outros (GOUIN, 2004). Contudo, a liberação pode ser melhorada pela modificação da estrutura cristalina do material de recobrimento. Modelos matemáticos têm sido usados principalmente para prever a liberação temporal dos compostos bioativos encapsulados (PEPPAS e NARASIMHAN, 2014).

Com base neste contexto, o objetivo deste trabalho foi produzir micropartículas de ferro encapsulados em matrizes lipídicas, utilizando a técnica de *spray chilling* e avaliar suas propriedades, como tamanho de partículas, eficiência de retenção, difração de raio -x e microscopia eletrônica de varredura. Neste trabalho foram avaliadas formulações com diferentes proporções de cera de abelha e manteiga de cacau e submetidas ao estudo da liberação controlada do componente ativo ferro em diferentes temperaturas.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Ferro e sua importância**

#### **2.1.1 O micronutriente Ferro**

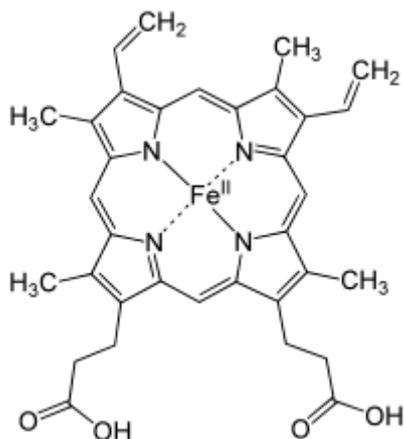
O ferro é um elemento-chave e um nutriente essencial no corpo humano e é um componente importante da hemoglobina, que forma uma ligação reversível instável com o oxigênio. Além disso, a deficiência de ferro afeta o crescimento e o desenvolvimento humano (DA MA et al, 2022). A ingestão insuficiente de ferro na dieta é uma causa importante da deficiência de ferro. A absorção de ferro no intestino depende do estado nutricional do ferro no corpo e das características da dieta por exemplo, o teor de ferro, forma e biodisponibilidade (SANT-RAYN, MU. 2021).

Nos alimentos, o ferro existe na forma heme e não heme. O ferro heme (figura 1) é derivado predominantemente de hemoglobina e mioglobina das carnes, sua absorção é eficiente e em grande parte não influenciada por outros componentes da dieta (GROTTO, 2010; GULEC, ANDERSON e COLLINS, 2014). Por outro lado, o ferro não-heme é encontrado em alimentos de origem vegetal como, por exemplo, hortaliças folhosas verde-escuras (brócolis, couve e espinafre) e leguminosas (feijão e lentilha), é geralmente insolúvel, e sua biodisponibilidade influenciada por muitos componentes dietéticos (FILIPONI et al, 2019). Contudo, o ferro desses alimentos é geralmente presente em níveis relativamente baixos ou não são absorvidos completamente (FULGONI et al. 2011).

O mecanismo de absorção do ferro heme difere daquele do ferro não heme. A hemoglobina é catabolizada no lúmen intestinal e a molécula heme é absorvida pelo enterócito como uma metaloporfirina intacta, sendo a internalização realizada por endocitose. Uma vez absorvido, o ferro é liberado do anel porfirínico por ação da heme oxigenase (MACHADO et al. 2005).

Já o denominado ferro não heme está ligação não ocorre. A absorção do ferro não heme pelos enterócitos pode ocorrer por três mecanismos: mecanismo paracelular que é inespecífico, não-regulado e tem uma baixa afinidade pelo ferro; mecanismo transcelular de difusão passiva, parcialmente regulado; e mecanismo de transporte altamente regulado, envolvendo carreador, glicoproteína, ácidos graxos e/ou um complexo protéico (MACHADO et al. 2005).

Figura 1– Estrutura do ferro heme.



Fonte: (Fennema, 2010)

Para tratamentos e prevenção da deficiência de ferro são usadas diversos compostos contendo ferro não heme, como sulfato ferroso, gluconato ferroso, lactato ferroso, fumarato ferroso, ferro elementar, entre outros (WARD e CRICHTON, 2016). Para fortificantes de ferro solúveis em água, o sulfato ferroso é o mais usado, por apresentar os maiores teores de ferro, maior biodisponibilidade relativa e o menor custo por mg de ferro. Esse composto tem como desvantagens as alterações sensoriais que provocam nos alimentos (DARY e HURRELL, 2006).

### 2.1.2 Deficiência de ferro

Globalmente, ferro, iodo, vitamina A e zinco são os micronutrientes mais deficitários da dieta humana (BAILEY, W. e BLACK, 2015). As populações mais suscetíveis a deficiências desses micronutrientes são crianças e mulheres grávidas (FULGONI et al. 2011; KEAST et al. 2013; MALPALI et al. 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016) informou que a deficiência causada por ferro é a mais prevalente no mundo.

Pessoas com deficiência de ferro apresentam níveis sistêmicos inadequados de ferro, isso pode eventualmente levar à anemia ferropriva, uma condição em que o corpo sofre de baixos níveis de hemoglobina, causando escassez de oxigênio (ROEMHILD et al. 2021). A deficiência de ferro ou a anemia por deficiência de ferro pode ser devido à diminuição da ingestão de ferro, aumento da demanda de ferro, perda crônica de sangue ou diminuição da absorção intestinal, pode ser tornar mais complexa quando ela é mascarada por doenças inflamatórias crônicas (ROEMHILD et al. 2021).

A Organização Mundial da Saúde estima que a prevalência de anemia em crianças menores de cinco anos no Brasil, varia de 30 a 70%, sendo as maiores prevalências (>50%) observadas em crianças com idade abaixo de 24 meses. Na América Latina e no Caribe este índice é de 39,5% e a prevalência global em crianças menores de cinco anos é de 47% (BRASIL, 2008). Estudos regionais no Brasil mostram uma tendência de aumento na prevalência em crianças, de modo que a anemia é considerada a carência nutricional nacional mais predominante, superando a desnutrição energético-proteica (VIEIRA e FERREIRA, 2010).

Para mulheres em idade fértil, a deficiência de ferro pode representar risco de morte, tanto para elas, quanto para seus filhos durante o período pré-natal e comprometer o desenvolvimento físico e mental de crianças, prejudicando a capacidade de aprendizagem na infância refletindo no desempenho intelectual de adultos (SZARFAC, 2010). As gestantes têm maior risco de desenvolver deficiência de ferro e anemia por deficiência de ferro pelas altas demandas fisiológicas próprias e da unidade feto-placentária, difíceis de serem supridas apenas pela dieta, além da perda sanguínea que pode ocorrer durante o parto (BRASIL, 2014).

Contudo, a produção de alimentos enriquecidos com ferro é uma política pública adotada por muitos países para combater a deficiência de ferro (OMS, 2012). No Brasil foram adotadas duas grandes ações de combate da deficiência de ferro: o enriquecimento obrigatório de farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico desde 2002, conforme consta na atualização da Resolução RDC nº 150 de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa (BRASIL, 2017) e a implementação do Programa Nacional de Suplementação de Ferro (PNSF) para crianças e gestantes (BRASIL, 2013).

### **2.1.3 Fortificação e enriquecimento de alimentos com ferro**

As fontes para veiculação de nutrientes podem ser naturais ou industrializadas. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, dentre os alimentos processados pode-se diferenciar os produtos de acordo com as seguintes classificações:

Alimento fortificado ou enriquecido de nutrientes: todo alimento ao qual foi adicionado de um ou mais nutrientes essenciais contidos naturalmente ou não no alimento, com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo e/ou prevenir ou corrigir deficiências demonstradas em um ou mais nutrientes, na alimentação da população ou em grupos específicos, de acordo com a Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1998).

Suplemento alimentar: Suplementos vitamínicos e/ou de minerais são alimentos que

servem para contemplar com estes nutrientes a dieta diária de uma pessoa saudável, em casos onde sua ingestão a partir da alimentação, seja insuficiente ou quando a dieta requerer suplementação. Devem conter um mínimo de 25%, e no máximo até 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitaminas e ou minerais, na porção diária indicada pelo fabricante, não podendo substituir os alimentos, nem serem considerados como dieta exclusiva, de acordo com a Portaria n ° 32, de 13 de janeiro de 1998, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1998).

Vários produtos se apresentam fortificados com ferro, como por exemplo os cereais matinais, leite, bebidas à base de soja, condimentos e café. Contudo, a utilização deste mineral em matrizes alimentares apresenta alguns desafios, que precisam ser superados, tais como, variações na biodisponibilidade do ferro, alterações sensoriais e indesejáveis de cor, formação de sedimentos e seu efeito sobre a oxidação lipídica (SUGIARTO, YE e SINGH, 2009; ARCANJO, A. 2009).

Vários compostos a base de ferro podem ser utilizados na fortificação, porém há problemas técnicos na seleção desses componentes. Compostos com biodisponibilidade relativamente alta, como o sulfato ferroso que é comumente utilizado, provocam alterações sensoriais indesejáveis, enquanto outros compostos mais aceitáveis são pouco absorvidos (HURRELL et al. 2006).

Com isso, a técnica de microencapsulação visa aprisionar o ferro, mascarando assim seu sabor e proporcionando menor interação com outros componentes, além disso, é possível criar um sistema de liberação controlada, melhorando a sua absorção (ARAÚJO, A. 2011).

## **2.2 Encapsulação por Spray Chilling**

As técnicas de microencapsulação consistem na imobilização de um ou mais compostos por um ou mais material de parede, que possam proteger o ativo contra fatores externos, tais como; a luz, elevada concentração de oxigênio, calor e umidade. O desenvolvimento de um sistema para a proteção do ativo inibe a evaporação de compostos voláteis, acoberta sabores e odores desagradáveis nos alimentos e, ao mesmo tempo, retarda a liberação antecipada do ativo prolongando o efeito da ação do componente no meio aplicado (RAY et al. 2016; COMUNIAN e TRINDADE, 2016).

Existem vários métodos de microencapsulação, sendo que a escolha do método ideal depende de alguns fatores. Segundo Trindade (2008), métodos disponíveis podem ser agrupados da seguinte maneira: métodos físicos, químicos e físico-químicos, sendo o *Spray*

*Chilling* um método físico.

O método *Spray Chilling* é baseado na solidificação de um fluido (contendo lipídios fundidos de alto ponto de fusão como materiais encapsulantes) pulverizado em uma câmara de resfriamento.

Em detalhes, o resfriamento por spray consiste em duas etapas. A primeira etapa requer a encapsulação do composto ativo em uma matriz lipídica, geralmente um lipídio fundido ou uma emulsão de água em óleo (BERTONI, A. e PASSERINI, 2019). Na segunda etapa, essa mistura é pulverizada na forma de gotículas, geralmente por um bico atomizador aquecido, para manter a temperatura adequada e evitar a recristalização dos compostos lipídicos. Quando o material pulverizado entra em contato com um ambiente resfriado (injeção de ar frio ou nitrogênio líquido), com temperatura abaixo do ponto de fusão do lipídio, ocorre uma transferência de calor entre o lipídio e o ar frio, levando à solidificação da matriz e resultando na formação de partículas lipídicas sólidas (FIGUEIREDO, J. et al. 2022). As partículas são coletadas em um recipiente abaixo da câmara de resfriamento, enquanto as partículas muito finas são transportadas pelo ar para um ciclone e coletadas em outro recipiente (CONSOLI et al. 2016).

Essa tecnologia permite a obtenção de pós gordurosos, facilitando a manipulação e a incorporação em diferentes matrizes alimentares, além de contribuir com menores custos de transporte e armazenamento devido ao menor volume (FIGUEIREDO, J. et al. 2022). Além disso, micropartículas lipídicas sólidas podem ser adicionadas aos alimentos para resolver problemas relacionados a eventos de cristalização e atuar como agentes estruturantes (TRINDADE, F. et al. 2016; LANDIM, N. et al. 2021).

O conhecimento dos efeitos dos parâmetros do processo na técnica de *spray chilling* é importante para obter resultados satisfatórios. Vários fatores podem interferir no processo e, até o momento, existem poucos estudos sobre o efeito das variáveis do processo de *spray chilling* nas características das micropartículas (FIGUEIREDO, J. et al. 2022). Trindade et al., (2021) relatam algumas dos principais fatores que podem ser otimizados no processo de *spray chilling*, são eles:

- A temperatura de fusão dos compostos lipídicos;
- A temperatura do ar de atomização;
- A temperatura da câmara de resfriamento;
- A pressão do ar de atomização; e
- A vazão de alimentação da mistura fundida

Existem vários desafios atuais da tecnologia de *spray chilling* na produção de ingredientes alimentícios quando comparados a outros processos. Os desafios incluem a busca por materiais encapsulantes de origem lipídica que atendam às características de um agente encapsulante ideal, como grau alimentício, ponto de fusão, estabilidade oxidativa, manutenção da estrutura encapsulante ao longo do armazenamento e uso, e aplicabilidade das micropartículas produzidas por *spray chilling* em diferentes matrizes alimentícias, bem como a biodisponibilidade *in vitro* e *in vivo* (FIGUEIREDO, J. et al, 2022).

Micropartículas lipídicas sólidas têm sido propostas para a liberação de fármacos, enzimas, probióticos, vitaminas, minerais, aromas, antioxidantes, antimicrobianos com diversas finalidades (MC CLEMENTS, 2020).

Na literatura encontra-se alguns estudos utilizando a tecnologia de *spray chilling* para encapsular micronutrientes (Tabela 1). No caso do micronutriente ferro, existem estudos com outras técnicas de encapsulação, porém, há escassez de estudos específicos para microencapsular o ferro através do *spray chilling*. Wegmüller et al (2006), microencapsularam pirofosfato férrico, iodo e palmitato de retinol em gordura de palma para fortificação de sal. Observaram que o encapsulamento da vitamina A adicionada como palmitato de retinol apresentou excelente estabilidade em sal. Ao usar um tamanho de partícula pequeno e um maior nível de fortificação, a baixa biodisponibilidade de ferro regular foi compensada. O estudo mostrou a alta eficácia de todos os 3 micronutrientes no sal fortificado com as microcápsulas e indicaram que a tripla fortificação do sal com um único composto podem ser uma nova e simples estratégia de fortificação.

Tabela 1 - Resumo de trabalhos envolvendo a tecnologia de *spray chilling* para microencapsulação de micronutrientes.

<b>Material de encapsulamento</b>	<b>Material ativo</b>	<b>Referência</b>
Gordura vegetal	Vitamina B12	Chalella et al. (2019)
Óleo de palma refinado e gordura de palma totalmente hidrogenada	Ácido ascórbico	Carvalho et al. (2019)
Gordura vegetal e cera de abelha	Vitamina D3	Paucar et al. (2016)
Ácido láurico e ácido oleico	Ácido ascórbico	Sartori et al. (2015)
Gordura interesterificada de óleo de palma e óleo de milho	Ácido ascórbico	Matos et al. (2017)
Ácido esteárico e gordura hidrogenada	Ácido ascórbico	Alvim et al. (2016)
Gordura de palma totalmente hidrogenada	Ferro, Iodo e Vitamina A	Wegmüller et al (2006)

### **2.3 Agentes encapsulantes**

Uma seleção cuidadosa do material encapsulante deve ser feita para todas as técnicas de microencapsulação (BOTREL, F. et al. 2014). Eles também devem preservar os compostos bioativos da decomposição durante as condições de processamento e armazenamento, e não interagir quimicamente com outros agentes ativos incorporados ao sistema (CONSOLI et al. 2016).

Em seu estudo de revisão Figueiredo et al, (2022) explica que a seleção do material encapsulante depende do ingrediente ativo a ser encapsulado. Por exemplo, para um ingrediente sensível a altas temperaturas, devem ser usados lipídios com um ponto de fusão que não interfira com as propriedades do material encapsulado enquanto protege contra o ambiente externo. Ray et al, (2016) listou alguns requisitos para os materiais encapsulantes:

- Estabilidade nas condições de operação do equipamento;
- Possuir capacidade de dispersar ou emulsionar o material de recheio e de manter as emulsões estáveis;
- Capacidade de aprisionar em sua estrutura o material ativo durante as etapas de processamento e armazenamento;
- Devem proporcionar proteção máxima ao material ativo contra condições ambientais adversas (por exemplo, oxigênio, calor, luz e umidade).

Normalmente, um único material de encapsulamento não é capaz de atender a todos esses requisitos, portanto, geralmente são utilizadas misturas desses materiais (ORIANI et al., 2018 ).

Os materiais utilizados como encapsulantes são lipídios sólidos e líquidos, como ceras, parafinas, ácido esteárico, monoglicerídeos, diglicerídeos, óleos e gorduras (SUAVE et al. 2006; BARROSO et al., 2021). A tabela 2 demonstra alguns tipos de lipídios e suas propriedades.

Tabela 2 - Tipos de lipídios usados na microencapsulação por *spray chilling* e suas propriedades

<b>Lipídios</b>	<b>Composição química</b>	<b>Propriedades</b>	<b>Exemplos</b>
Ácidos graxos	Ácidos graxos de cadeia longa	Ponto de fusão = 60-90 ° C	Ácido palmítico, ácido esteárico, ácido láurico. Tripalmitato de glicerila (Dynasan 116),
Triglicerídeos	Triglicerídeos monoácidos	Ponto de fusão = 46-73 ° C	trimiristato de glicerila, trilaurato de glicerila
Ceras	Ésteres de ácidos graxos de cadeia longa e álcoois.	Ponto de fusão = 62-86 ° C	Cera de carnaúba, cera de candelila, cera de abelha, parafina sólida, cera de farelo de arroz
Óleos vegetais hidrogenados e não hidrogenados	Mistura de triglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfolipídios	Hidrogenado - ponto de fusão = 60-71 ° C	Soja hidrogenada ou não hidrogenada e óleo de palma
Álcool gorduroso	Mistura de álcoois graxos	Não hidrogenado - ponto de fusão = 13 ° C	álcool laurílico, álcool estearílico, álcool oleílico

Fonte: Figueiredo (2022).

### 2.3.1 Manteiga de cacau

A manteiga de cacau é uma gordura vegetal premium utilizada como principal material estruturante na fabricação de chocolate. A manteiga de cacau desempenha um papel fundamental na reologia fluida do chocolate, na desmoldagem, brilho, floração, propriedades de fusão, liberação de sabor, etc. (RIOS, P. et al. 2014).

Devido às suas propriedades e sua alta relevância nas indústrias de alimentos, higiene pessoal, cosmética e farmacêutica (SODDU et al. 2014), a manteiga de cacau tem sido usada como modelo em diversos estudos. Por exemplo, além de seu impacto direto na fabricação de chocolate, o estudo da manteiga de cacau em nanoescala permitiu o desenvolvimento de

nanossistemas de entrega. Essas nanoestruturas podem encapsular diferentes compostos usados nas indústrias alimentícia e farmacêutica, como vitaminas, ingredientes de medicamentos para alimentos, antioxidantes, antimicrobianos, aromatizantes e medicamentos (KHOSH, et al. 2020).

Quimicamente, a manteiga de cacau é composta por aproximadamente 30 triacilgliceróis (TAGs) diferentes e por uma pequena quantidade de di-monoacilgliceróis, além de outros componentes menores, como fosfolipídios, glicolipídios e ácidos graxos livres. Três principais ácidos graxos são encontrados na composição da manteiga de cacau: ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0) e ácido oléico (C18:1) (COHEN, 2004). A manteiga de cacau também contém antioxidantes, como catequinas e procianidinas (TERROSO et al. 2016).

Saldaña et al, (2002) afirmam que a cor predominante da manteiga é amarela e a mesma é fundida a uma temperatura que gira em torno de 35°C. Para alguns autores, o ponto de fusão da manteiga varia de 26 a 36°C, o que depende do tipo de cristal que vai ser formado durante o seu resfriamento.

Na literatura existem trabalhos que utilizaram manteiga de cacau como material encapsulante. Bocanegra, et al, (2005) produziram microcápsulas de manteiga de cacau contendo uma solução aquosa ou uma emulsão óleo-em-água através de jatos coaxiais eletrificados e obteve encapsulamento bem-sucedido nas características de tamanho e distribuição de partículas, corrente adimensional versus vazão adimensional, distribuição normalizada do tamanho das gotas de manteiga de cacau microencapsulada e a vazão da manteiga de cacau (encapsulado/líquido externo); e Pedroso, et al, (2013) microencapsularam *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus* em manteiga de cacau usando tecnologia de *spray chilling*, e verificaram que o processo de encapsulação protege *L. acidophilus* dos fluidos gastrointestinais.

### **2.3.2 Cera de abelha**

A cera de abelha é um produto complexo secretado na forma líquida por glândulas especiais de cera no abdômen de abelhas operárias mais jovens (com idade entre 12 e 18 dias, ou seja, no final do período em que as abelhas atuam como enfermeiras) (CHAUVIN, 1968). Em contato com o ar, solidifica-se em escamas (que as abelhas modelam com mandíbulas para construir os favos de mel, acrescentando pólen e própolis). A sua densidade a 15°C é cerca de 0,960 kg/m<sup>3</sup> a 0,970 kg/m<sup>3</sup> e funde a temperaturas entre 63°C e 65°C

(BOGDANOV, 2004; BOGDANOV, 2009) .

Quimicamente, a cera de abelha é uma mistura complexa de monoésteres lineares e ramificados saturados e insaturados, hidrocarbonetos, ácidos graxos e álcoois livres e outras substâncias menores exógenas produzidas pelas abelhas. Contém 27 a 40% de monoésteres, distribuídos em ésteres alquila do ácido palmítico e oleico; 9 a 23% de hidroximonoésteres, compostos por ésteres do ácido hidroxipalmítico e diolésteres do ácido palmítico; 7 a 16% diésteres de diois e ésteres de hidroxiácidos acilados; 3,9% hidroxieésteres; 11 a 28% hidrocarbonetos, sendo aproximadamente 12,8% alcanos e 2,9% alcenos; 1 a 18% ácidos graxos livres saturados não ramificados, 4 a 8% de outras substâncias e menos de 0,3% de álcoois graxos livres. Fisicamente, possui ponto de fusão entre 61 a 65°C, sendo insolúvel em água e álcool frio, muito solúvel em éter e clorofórmio. A coloração varia de branca a amarelo escuro, dependendo da contaminação com pólen encontrado no mel, podendo ainda se tornar escura pelo uso e conseqüente acúmulo de impurezas, chegando a quase preta pelo fervura excessiva (EFSA, 2007; FNAP, 2009; NUNES et.al. 2012; ZHU, et al. 2010) .

A composição da cera de abelha pode variar entre as diferentes famílias e diferentes raças de abelhas, porque é provável que a produção de cera esteja intimamente relacionada à genética e dieta das abelhas (BUCHWAR, B. et al. 2006) .

A cera de abelha tem encontrado uma utilização cada vez mais ampla na indústria de alimentos, incluindo estabilizante, agente de vidragem, texturizador em goma de mascar e transportador de aditivos alimentares (EMIN e MUTAFA, 2015) e organogelador para estruturação de óleo (MOGHTADAEI et al 2018).

Alguns estudos utilizaram a cera de abelha como material encapsulante. Sorita et al, (2021) microencapsularam curcumina utilizando como materiais encapsulantes cera de abelha, cera de carnaúba e triglicerídeos de cadeia média, Paucar et al, (2016) utilizaram gordura vegetal e cera de abelha para microencapsular vitamina D3.

## **2.4 Polimorfismo**

O polimorfismo é a capacidade de um material encontrar-se sob o formato de distintos arranjos cristalinos, com diferentes empacotamentos moleculares, sendo as formas polimórficas  $\alpha$ ,  $\beta'$  e  $\beta$  aquelas comumente encontradas em lipídios (SATO e UENO, 2011).

Essas formas polimórficas podem ser identificadas por padrões de Difração de Raio X, onde, fornece informações sobre a fase cristalina da amostra pela presença de picos de difração

(SANTOS et al., 2020) e consiste na determinação das distâncias entre os grupos alquilas paralelos dos TAGs, conhecidas como *short spacings* (CURI et al. 2002). Quando a forma polimórfica do ingrediente ativo e do agente encapsulante é mantida, os picos são formados nos mesmos ângulos de difração, enquanto polimorfos diferentes levam à formação de ângulos diferentes, o que também pode ser observado no caso de amorfização, ou seja, ausência de picos de refração agudos, chamados de halo amorfo. Por fim, a redução da cristalinidade pode ser detectada pela formação de picos de difração menos nítidos e menos intensos (BERTONI, , e PASSERINI, 2019).

Os cristais  $\alpha$  apresentam o empacotamento hexagonal, e são formados rapidamente durante o resfriamento. São elementos altamente instáveis e apresentam vida curta. Os cristais na forma com empacotamento ortorrômbico –  $\beta'$  formam estruturas com estabilidade intermediária, sendo capazes de englobar elevada porção de óleo líquido na rede cristalina. A forma  $\beta$  proporciona um empacotamento mais estável com estrutura triclinica, ou seja, é constituído de cadeias planas e paralelas, acarretando em maior ponto de fusão e calor latente (MARANGONI, 2005; MARTINI et al. 2006; McCLEMENTS e DECKER, 2010).

As gorduras são monotrópicas, ou seja, sua transformação polimórfica acontecerá sempre no sentido do cristal mais estável. A estabilidade termodinâmica e o ponto de fusão das três formas aumentam na seguinte ordem:  $\alpha < \beta' < \beta$  (McCLEMENTS e DECKER, 2010). A velocidade de transformação das transições polimórficas é dependente do grau de homogeneidade dos TAGs. Os lipídios com menor diversidade de TAGs tendem a se converter rapidamente na forma polimórfica  $\beta$ , enquanto as gorduras com composição variada de TAGs tendem a se estabelecer na forma polimórfica do tipo  $\beta'$ . Os fatores que podem afetar a formação das diferentes estruturas polimórficas incluem o tipo de formulação, a taxa de resfriamento, o calor de cristalização e o nível de agitação (SATO, 2001; RIBEIRO et al. 2015).

O polimorfo em que os TAGs cristalizam afeta muito seu comportamento de fusão; ou seja, quanto mais estável o polimorfo formado, mais densamente os TAGs se empacotam e, portanto, maior a densidade, ponto de fusão e entalpia de fusão do cristal resultante.

As ceras de abelha são parcialmente cristalinas, em temperatura ambiente, a parte cristalina das ceras de abelhas é organizada principalmente seguindo uma estrutura ortorrômbica, mas uma pequena quantidade é constituída por uma estrutura monoclinica. Durante o aquecimento, várias transições polimórficas no estado sólido foram relatadas em relação à fase ortorrômbica até o ponto de fusão (KAMEDA, T. 2005; KOTEL'NIKOVA e PLATONOVAE F., 2007).

Segundo Schoening, (1980) e Kameda, (2005) a cera de abelha compreende uma parte

amorfa e duas partes cristalinas. De fato, hidrocarbonetos e monoésteres parecem cristalizar seguindo uma estrutura ortorrômbica enquanto ácidos livres e diésteres têm uma estrutura monoclínica (GAILLARD, Y. et al. 2011). Todos os valores encontrados na caracterização das transições polimórficas da cera de abelha se relacionam com a estrutura ortorrômbica (GAILLARD, Y. et al. 2011; ATTAMA, A. et al. 2006).

O polimorfismo da manteiga de cacau é muito discutido na literatura técnica devido a sua grande influência nas propriedades físicas e sensoriais do chocolate (COHEN, 2004). Estudos confirmam a existência de até seis formas cristalinas na manteiga de cacau. Variando de (I - VI) e também como  $\gamma$  (ponto de fusão a 17°C),  $\alpha$  (pontos de fusão 21°C-24°C),  $\beta'$  (ponto de fusão 28°C) e  $\beta$  (pontos de fusão de 34°C-35°C) (Veríssimo 2012). Sendo, V e  $\beta'$  as formas polimórficas mais desejáveis devido ao seu impacto nas características texturais e visuais do chocolate (pequenos cristais semelhantes a agulhas, ponto de fusão ~ 31–34 °C) (PEYRONEL et al. 2014; CO et al. 2019).

A estrutura polimórfica tem influência direta na eficiência de microencapsulação e na liberação do núcleo durante o armazenamento, devido à reorganização do cristal em uma forma polimórfica mais estável (RIBEIRO, A. et al. 2012).

## **2.5 Liberação Controlada**

A liberação controlada é definida como um processo pelo qual um ou mais agentes ativos podem ser liberados em um momento e local apropriado, sendo considerada, portanto, uma propriedade extremamente importante nos processos de encapsulação (SILVA et al. 2014). A microencapsulação e a liberação controlada são aplicadas na indústria de alimentos com o objetivo de assegurar a manutenção das características nutritivas e sensoriais dos alimentos, além de prolongar o período de armazenamento (DIMA, et al. 2016).

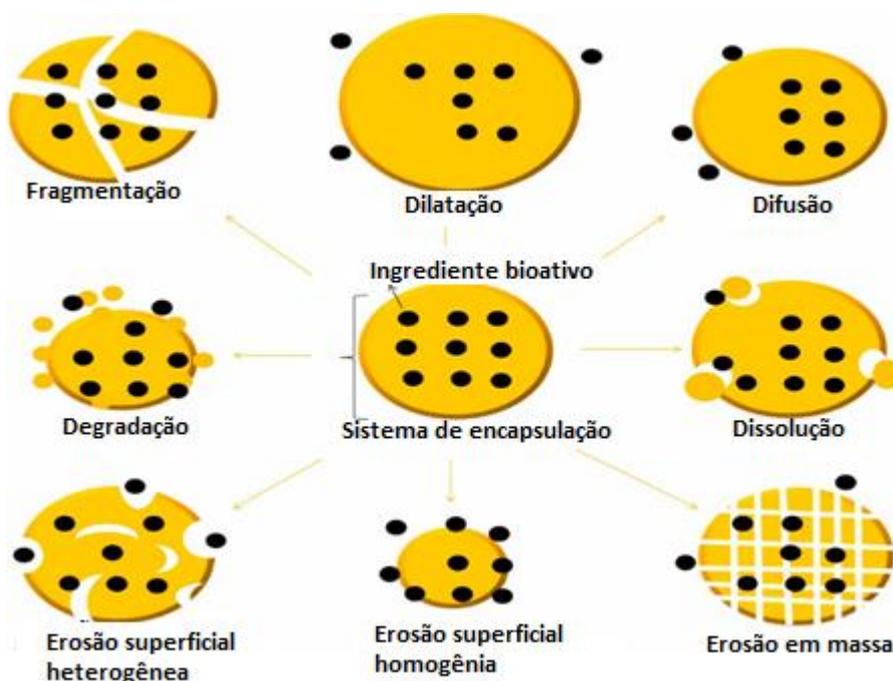
Geralmente, a definição clara da biodisponibilidade e bioacessibilidade pode ser eficaz para uma melhor compreensão dos conceitos de liberação. Portanto, bioacessibilidade é definida como a porção de ingredientes ativos que é liberada de sua localização original nos alimentos para o trato gastrointestinal (TGI) para absorção luminal (JAFARI e MCCLEMENTS, 2017). Nesse sentido, biodisponibilidade é definida como a porção de ingredientes ingeridos que entra no sistema circulatório e é acessível para atividades biológicas (FLORES e KONG, 2017).

Como explica Boostani e Jafari. 2021, existem diferentes termos e definições para

liberação. A liberação pode ocorrer imediatamente ou modificada; em relação à liberação imediata, ocorre logo após o uso; no entanto, no caso de liberação modificada, ocorre por um período prolongado de tempo após o uso ou em um local específico (PERRIE e RADES, 2012). Os sistemas de liberação controlada são um tipo de sistema de liberação modificada que se destina a atingir uma concentração específica independente das condições do local alvo (BOOSTANI, S. e JAFARI. S.,2021).

A partir das microparticulas uma série de mecanismos de liberação têm sido sugeridos (figura 2).

Figura 2 - Tipos de mecanismos de liberação para ingredientes alimentícios encapsulados



Fonte: (Boostani. S. e Jafari. S. M., 2021)

Na tecnologia de *spray chilling*, a liberação do ingrediente ativo geralmente ocorre por erosão e lixiviação da matriz, devido à sua natureza hidrofóbica (TRINDADE, C. et al., 2021) ou por difusão (CHALELLA, M. et al. 2019 ; PAUCAR, et al, 2016).

O perfil de liberação é definido como os eventos de liberação de compostos encapsulados do carreador mostrando curvas de concentração-tempo específicas no local alvo. Os perfis de liberação são afetados principalmente pela natureza dos mecanismos de liberação (BOOSTANI, S. e JAFARI. S., 2021).

## 2.6 Cinética de Liberação

A cinética de liberação é frequentemente discutida qualitativamente por meio de curvas de concentração versus tempo, com relação específica à porcentagem de liberação após um determinado intervalo de tempo (BOOSTANI, S. e JAFARI. S., 2021). Através da cinética de liberação, a ordem e o mecanismo de liberação das micropartículas podem ser descritos e avaliados na forma de diversos modelos matemáticos (ANSARIFAR et al., 2017; CAMPELO, P. et al., 2017; ZANDI et al., 2017).

Os modelos de Ordem Zero, Primeira Ordem, Korsmeyer e Peppas e Higuchi foram usados para determinar a cinética de liberação (FLORES, F. P.e KONG, F., 2017), representados, respectivamente, pelas Equações 1, 2, 3 e 4.

$$Q_t = Q_0 + K * t \quad (\text{ordem zero}) \quad (1)$$

$$Q_t = Q_0 + e^{-k*t} \quad (\text{primeira ordem}) \quad (2)$$

$$Q_t = Q_0 + K^n \quad (\text{Korsmeyer e Peppas}) \quad (3)$$

$$Q_t = Q_0 + K * \sqrt{t} \quad (\text{Higuchi}) \quad (4)$$

Onde:  $Q_t$  é a quantidade de ativo liberado no tempo (t),  $Q_0$  é a quantidade de ativo liberado no tempo zero (t=0), K é a constante da taxa de liberação, n é o expoente de liberação e caracteriza mecanismo de transporte (Korsmeyer - Peppas). O valor n pode ser variado, Caso I, para  $n < 0,43$  o mecanismo de transferência de massa ocorre de acordo com a lei de Fick, ou seja, a difusão das moléculas segue um gradiente de potencial químico; quando  $0,43 < n < 0,85$  o sistema de liberação é anômalo (ou não Fickiano), e a liberação ocorre por difusão e relaxamento das cadeias; Caso II, se n for igual a 0,85 indica que a liberação é controlada pela molhabilidade; e o Super caso quando  $n > 0,85$  no qual ocorre uma aceleração na liberação provocado pela erosão ou mobilidade das cadeias (CAMPELO, P. et al. 2018).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

O sulfato de ferro II (NEON Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil) foi utilizado como material ativo. Os lipídios utilizados para a produção das micropartículas lipídicas foram cera de abelha (GM CERAS, São Paulo, Brasil) com ponto de fusão de 64 °C e manteiga de cacau

(SATTVA SUPER ALIMENTOS, São Paulo, Brasil) com ponto de fusão de 35 °C. Além disso, foi utilizado o emulsificante polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) (Danisco, Copenhage, Dinamarca). As enzimas pepsina, pancreatina, lipase e sais biliares foram adquiridas da Sigma e os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

### **3.2 Preparo das soluções**

As misturas lipídicas foram pesadas de acordo com o planejamento experimental descrito no item 3.4, derretidos e reservados. Um total de 10 g de sulfato ferroso foram adicionados em 10 ml de água (30 °C) até ser completamente dissolvido e adicionados em 200 g das misturas lipídicas junto com 8 g de PGPR. A mistura foi agitada em um agitador magnético com aquecimento (Gehaka, São Paulo) por 5 minutos a 75 °C para homogeneização.

### **3.3 Processo de obtenção das micropartículas lipídicas por spray chilling**

O equipamento utilizado na produção das micropartículas lipídicas (MPLs) contendo sulfato ferroso foi um *Spray Chiller* (Labmaq do Brasil, Ribeirão Preto, Brasil) com um bico atomizador de duplo fluido, equipado com aquecedor do ar comprimido e da amostra de alimentação e um sistema de resfriamento do ar (figura 3).

Figura 3 - Spray chiller. (a) Sistema de aquecimento da amostra. (b) Sistema de aquecimento do ar comprimido. (c) Sistema de resfriamento do ar (-5°C a 20°C).



(fonte: própria autora)

As temperaturas das amostras, do ar comprimido e de resfriamento em todos tratamentos foram de 87 °C, 100 °C e -2 °C, respectivamente. O fluxo do ar comprimido de 35 L.min-1 e a pressão do ar de 500 kPa foram usados de acordo com a recomendação do fabricante. A média da temperatura de saída da câmara foi  $15,5 \pm 2^\circ\text{C}$ . No final do processo, as MPLs foram recolhidas do pote coletor e da câmara de resfriamento e foram armazenadas em sacos plásticos de polietileno fechados e envoltos de papel laminado e mantidas a 3 °C até a realização das análises.

Os tratamentos foram conduzidos em duplicata e o rendimento do total do processo, que leva em consideração as micropartículas coletadas na câmara e pote coletor, foi calculado de acordo com a equação 5 e o rendimento somente do coletor foi calculado de acordo com a equação 6..

$$\text{Rendimento total do processo (\%)} = \frac{\text{quantidade coletada total}}{\text{quantidade atomizada}} \times 100 \quad (5)$$

$$\text{Rendimento pote coletor (\%)} = \frac{\text{quantidade coletada no pote coletor}}{\text{quantidade atomizada}} \times 100 \quad (6)$$

### 3.4 Planejamento experimental

O experimento foi conduzido com duas repetições, e as medidas das análises foram realizadas em duplicata em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). A quantidade de agente encapsulante utilizada nos experimentos foi de 200 g, variando-se a proporção de acordo com o tratamento, conforme demonstra a Tabela 3.

Tabela 3 - Descrição dos tratamentos utilizados na produção de micropartículas lipídicas.

<b>Tratamentos</b>	<b>Materiais carreadores</b>	<b>Proporção de material carreador (m/m)</b>
T1	cera de abelha	-
T2	cera de abelha + manteiga de cacau	3:1
T3	cera de abelha + manteiga de cacau	2:1
T4	cera de abelha + manteiga de cacau	1:1

### **3.5 Caracterização das micropartículas lipídicas**

#### **3.5.1 Morfologia de Superfície por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A análise da morfologia das partículas foi realizada, por meio da observação de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram inseridas em stubs de alumínio com fita dupla-face de carbono, metalizadas em aparelho evaporador de ouro (SCD 050) e observadas no microscópio eletrônico de varredura (LEO EVO 40 XVP, Carl Zeiss) do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras.

#### **3.5.2 Tamanho e distribuição de partículas**

O diâmetro da partículas e a distribuição do diâmetro (indicado pelo índice de polidispersidade, PDI) foram determinados por dispersão dinâmica de luz em um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Inc., Worcestershire, Reino Unido). O álcool isopropílico foi usado como dispersante para evitar a dispersão múltipla, bem como a dispersão e interação entre partículas. Todas as medições foram feitas em triplicata e os valores médios foram relatados.

### 3.5.3 Eficiência de Retenção

A Eficiência de Retenção (ER) foi determinada a partir da adição de 180 mg de MPLs, contendo ferro, em tubos com tampa de polipropileno em 10 ml de clorofórmio para rompimento das micropartículas, liberação do composto e assim, quantificação de todo o ativo presente. Em seguida, foram adicionados 10 mL de água destilada aos tubos, submetendo-os à agitação por 1 min em um agitador vortex (Kasvi, São José do Pinhais, Brasil), por duas vezes, com descanso de 10 min entre as agitações. Posteriormente, os tubos foram levados a centrifugação por 10 min a 10.000 rpm, seguindo a metodologia descrita por Leonel et al. (2010), com algumas adaptações. A quantidade de ferro presente na amostra foi determinada ao final da centrifugação pelo método descrito no Item 3.5.4. A ER das MPLs foi obtida a partir da Equação 7, ou seja, como a razão entre a quantidade total de ferro presente nas micropartículas lipídicas ( $Fe_T$ ) e a quantidade inicial de ferro adicionada nas misturas lipídicas ( $Fe_A$ ), em base úmida.

$$ER (\%) = \frac{Fe_T}{Fe_A} \times 100 \quad (7)$$

### 3.5.4 Determinação do teor de Ferro

Uma curva padrão ( $R^2 = 0,9997$ ) foi preparada com concentrações de sulfato ferroso variando de 0,5 a 2,0 mg/L. O teor de ferro foi quantificado, utilizando-se 0,5 mL de solução de ácido ascórbico, 2 mL de solução de fenatrolina e 5 mL de solução de acetato de amônio e 1 ml de alíquota da amostra. Para a determinação do teor de ferro nas MPLs as absorbâncias das soluções foram lidas em espectrofotômetro (Bel photonics, São Paulo) com comprimento de onda de 440 nm. A preparação das soluções e o teor de ferro seguiu a metodologia descrita na norma 13934 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) com modificações.

### 3.5.5 Difração de Raios-X

Os possíveis picos indicativos de cristalinidade e formas polimórficas das MPLs e dos materiais de parede foram determinados por Difração de Raios-X. As análises foram realizadas em difratômetro Philips (PW 1710, Holanda), utilizando a geometria Bragg-Brentano ( $\theta:2\theta$ ) com radiação de Cu- $k\alpha$  ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ , tensão de 30 kV e corrente de 30 mA). As medidas foram obtidas com passos de  $0,02^\circ$  em  $2\theta$  e tempo de aquisição de 1,20 segundos, com

varreduras de 4 a 70° (escala 2 $\theta$ ). A quantidade de cada polimorfo foi estimada pela intensidade relativa do *short spacings* (SCHENCK e PESCHAR, 2004; MARANGONI, 2005). A análise foi feita em uma única repetição.

### **3.6 Liberação Controlada**

A liberação controlada do ferro, medida em % foi determinada a cada 30 min, durante um período de 4 horas, em meio aquoso em temperaturas de 10, 20, 30 e 40 °C. O procedimento descrito por Ribeiro et al. (2012) foi seguido, com modificações. As análises foram realizadas dispersando 100 mg da amostra em 10 mL de uma solução Tween 80 (1 g / L) em frascos de 50 mL. As amostras foram agitadas a 100 rpm em banho incubador com agitador orbital (Ethik Technology, São Paulo, Brasil). Após cada intervalo de 30 min, 1mL de alíquota de cada tratamento foram retiradas e filtradas em papel de filtro e o teor de ferro no filtrado foi determinado espectrofotometricamente, conforme descrito no item 3.5.4. Os testes e determinações em cada intervalo foram realizados em duplicata.

### **3.7 Avaliação in vitro das micropartículas em soluções simuladas gástrica e intestinal**

Soluções gástricas, intestinal e bile foram utilizadas para determinar a digestibilidade in vitro das micropartículas contendo ferro. Estas soluções foram preparadas em 250 mL de água cada com os constituintes descritos na TABELA 4. A preparação das soluções e os procedimentos das fases foi realizado de acordo com Minekus, et al (2014) com modificações.

Tabela 4 - Constituintes de preparação de soluções de fluidos de digestão simulados.

Constituintes	Solução gástrica (SSG)	Solução intestinal (SSI)	Bile
	pH 1,3 a 1,32	pH 8,1 a 8,3	pH 8,2 a 8,4
NaCl	1,376 g	3,506 g	2,629 g
KCl	0,412 g	0,282 g	0,188 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>2</sub>	0,133 g	-	-
CaCl <sub>2</sub>	0,1995 g	-	-
NH <sub>4</sub> Cl	0,153 g	-	-
NaHCO <sub>3</sub>	-	1,694 g	0,075 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	40 mg	-
MgCl <sub>2</sub>	-	25 mg	-
HCl	3,25 mL	0,09 mL	0,075 mL
Pepsina	1,25 g	-	-
Pancreatina	-	4,5 g	-
Lipase	-	1,5 g	-
Sais biliares	-	-	15 g

Na fase gástrica, foi separado 6 mL da SSG e transferido para tubos Falcon de 50 mL, em seguida foi adicionado 1,5 g de MPLs contendo ferro. Amostras foram incubadas durante 2 h a 37°C com uma velocidade de agitação de 200 rpm. Após o intervalo de tempo uma alíquota de 1 mL foi retirada e o ferro foi quantificado com descrito no item 3.5.4.

Na fase intestinal, após a retirada da primeira alíquota da fase gástrica, foi adicionada a solução SSG, 12 mL de SSI e 6 mL de solução de sais biliares. Amostras foram incubadas durante 2 h a 37°C com uma velocidade de agitação de 200 rpm. Após o intervalo de tempo uma alíquota de 1 mL foi retirada e o ferro foi quantificado com descrito no item 3.5.4.

### 3.8 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de *Tukey* com nível de significância de 5%, utilizando software *Minitab* (Minitab 16.1.0, Minitab Inc., State College, PA, EUA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1 Caracterização das micropartículas lipídicas

### 4.1.1 Condições do processo e rendimento

As condições de processamento das MPLs contendo ferro estão apresentadas na Tabela 5, assim como os seus respectivos rendimentos de processo.

Tabela 5 - Condições do ambiente e rendimento do processo de produção de micropartículas

Tratamentos	Temperatura ambiente - ar condicionado (°C)	Temperatura de resfriamento (°C)	Temperatura de saída da câmara (°C)	Rendimento pote coletor (%)	Rendimento total (%)
T1	16	-2	18±1,00	12,50±1,40 <sup>c</sup>	75,00±2,98 <sup>a</sup>
T2			15±0,00	24,10±0,90 <sup>a</sup>	75,00±0,93 <sup>a</sup>
T3			17±0,50	18,75±2,10 <sup>b</sup>	73,74±1,95 <sup>a</sup>
T4			15±1,00	20,50±0,70 <sup>b</sup>	74,55±1,66 <sup>a</sup>

Os valores apresentados dos rendimentos são médias de duas repetições. Letras minúsculas diferentes em cada coluna representam diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

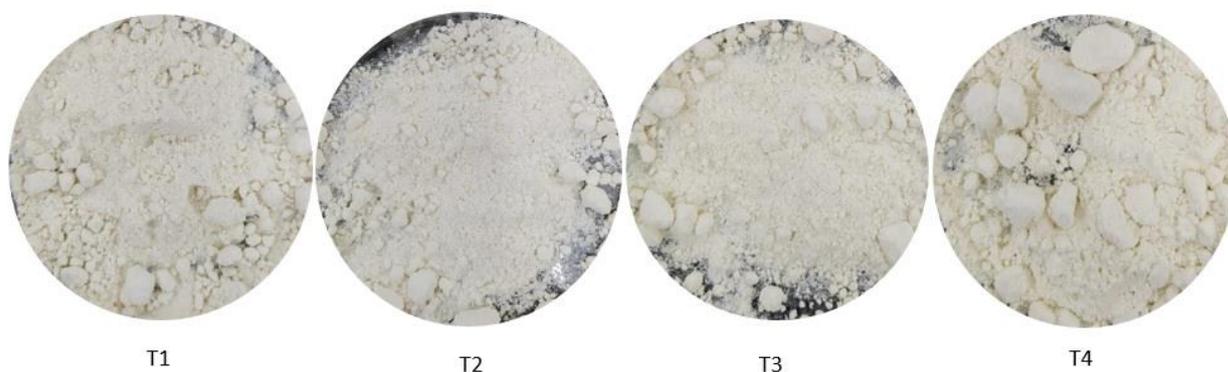
Os valores encontrados para o rendimento total, em que foi considerada a soma das partículas coletadas no pote coletor e na câmara do equipamento, variaram de 73,74 a 75,00 %, enquanto que, para o rendimento no pote coletor foram encontrados valores de 12,50 a 24,10 %. Nas avaliações do rendimento total não houve diferença significativa entre as amostras ( $p \leq 0,05$ ).

Sartori et al. (2015) produziram micropartículas lipídicas a partir de emulsões constituídas do ácido graxo láurico e oleico para microencapsular ácido ascórbico por *spray chilling*. Os autores encontram valores de rendimento total entre de 64 a 73 % e atribuíram os menores valores de rendimentos a aderência das partículas na superfície do equipamento. Carvalho, et al (2019) encontraram valores de rendimento total de até 81% e rendimento do pote coletor foram encontrados valores de 21,39 a 29 % para produção de MPLs por *spray chilling*, constituídas de ácido ascórbico microencapsuladas com óleo de palma refinado e gordura de palma totalmente hidrogenada. Chalella, et al (2019) produziram MPLs com gordura

vegetal para encapsular vitamina B12 e obtiveram rendimento total entre 69,60 a 79,90 %. Portanto, os valores de rendimento encontrados no presente trabalho estão próximos dos dados relatados nas literaturas citadas.

As características visuais das amostras se mantiveram semelhantes com pós finos, com alguns grumos (Figura 4). Durante a manipulação, o tratamento com apenas cera de abelha se manteve mais firme e não grudento. Enquanto tratamentos contendo manteiga de cacau ficaram bastante grudento, o que dificultou a manipulação, sendo que o T4 e T3 foram os tratamentos que mais apresentaram grumose mais grudento quando comparados aos tratamentos T1 e T2. Esse fenômeno está relacionado ao ponto de fusão mais baixo. Oriani et al, 2016 explicaram os problemas que podem ser causados durante e após o uso do *spray chilling* com o uso individual de lipídios de baixo ponto de fusão, como é o caso da manteiga de cacau, que apresenta ponto de fusão de 35 °C. Após a formação das micropartículas, uma alta adesão do pó, aglomeração e baixa fluidez das micropartículas são verificadas.

Figura 4 – Aspecto visual das micropartículas lipídicas produzidas contendo ferro



Legenda: T1: Cera de abelha; T2: Cera de abelha + Manteiga de cacau (3:1) ;T3: Cera de abelha + manteiga de cacau (2:1); T4:Cera de abelha + manteiga de cacau (1:1).

#### 4.1.2 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens de MEV das MPLs contendo ferro são mostradas na Figura 5. Em geral, as superfícies das micropartículas que contém manteiga de cacau apresentaram formas irregulares, aglomeradas e de tamanho variado.

Sabe-se que a temperatura de fusão dos constituintes são 64 e 35 ° C para a cera de abelha e manteiga de cacau, respectivamente. A adição da manteiga de cacau reduziu moderadamente a temperatura de fusão dos tratamentos, ocasionando o aumento do efeito de

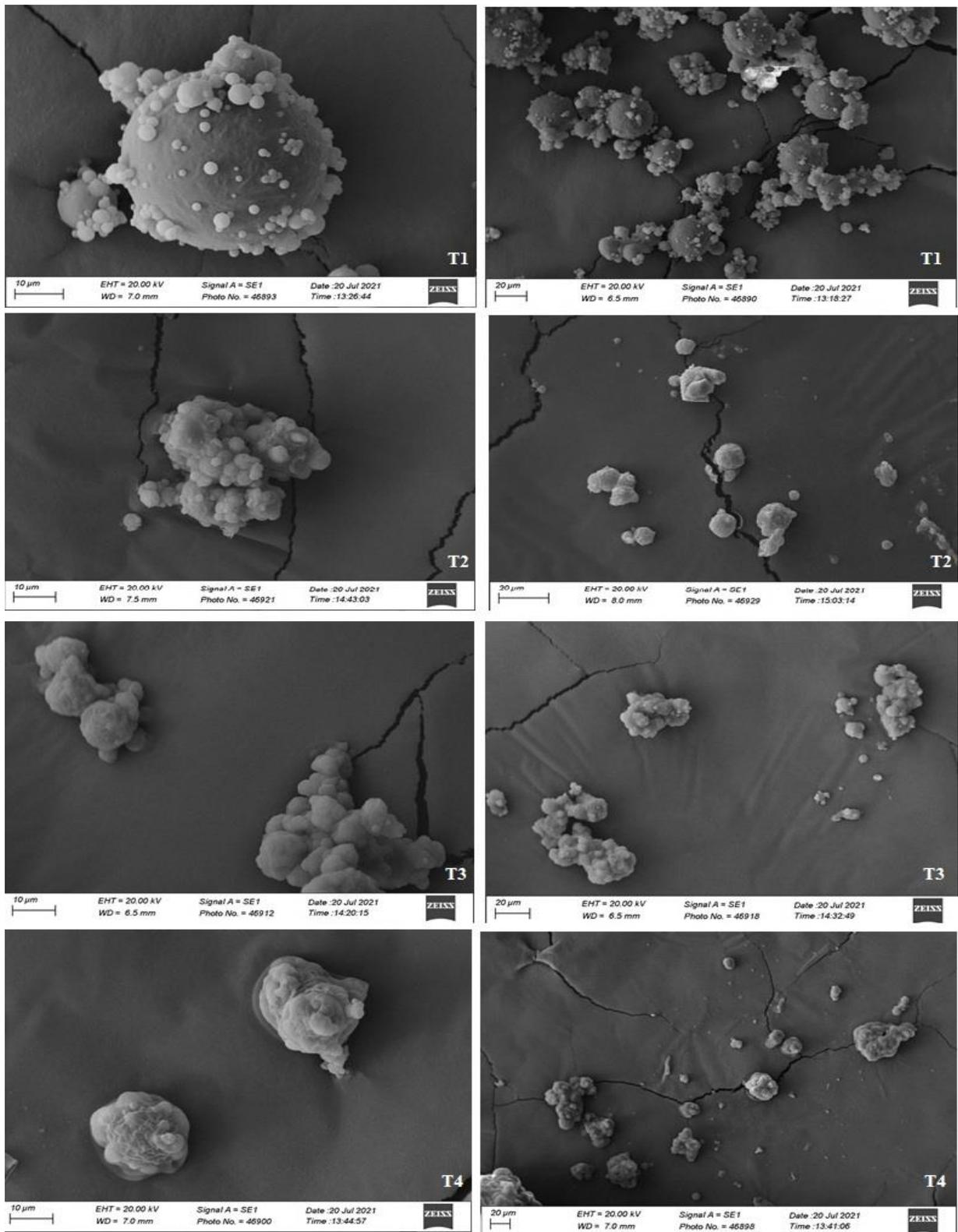
agrupamento, em comparação com o tratamento que utilizou apenas cera de abelha. Oriani et al. (2016) atribuíram essa alteração no comportamento morfológico ao ponto de fusão das MPLs durante sua solidificação no processo de atomização.

As partículas menores permaneceram aderidas na superfície das partículas maiores. As partículas maiores retardaram ou inibiram a cristalização completa das partículas. Partículas que não se cristalizam por completo são capazes de se juntar e formar aglomerados (SAVOLAINEN, 2003).

Sorita et al, 2021 produziram micropartículas com cera de abelha, cera de carnaúba e miglyol contendo curcumina como composto ativo. Os autores relataram que a formulação composta por cera de abelha e miglyol, nomeadamente os lípidios com as temperaturas de fusão mais baixas apresentaram o efeito de aglomeração. Entretanto, incorporação de cera de carnaúba à composição da mistura (mistura lipídica com maior temperatura de fusão) levou à redução do efeito de aglomeração.

Pelissari et al. (2016), em seus estudos, utilizaram a técnica de *spray chilling* para a microencapsulação de licopeno, utilizando como material de parede um composto de gorduras vegetais hidrogenadas e interesterificadas de algodão, soja e palma. Foram obtidas partículas de formato esférico, com aglomerações, diâmetros variáveis, superfície áspera com alguns poros, mas sem fissuras.

Figura 5 - Micrografias das partículas lipídicas produzidas contendo ferro, nos diferentes tratamentos avaliados



Legenda: T1: Cera de abelha; T2: Cera de abelha + Manteiga de cacau (3:1); T3: Cera de abelha + manteiga de cacau (2:1); T4: Cera de abelha + manteiga de cacau (1:1).

### 4.1.3 Tamanho e distribuição de partículas

A Tabela 6 apresenta os valores de diâmetros médios e o índice de polidispersibilidade das MPLs produzidas nas formulações estudadas

Tabela 6 - Diâmetro das micropartículas lipídicas e o índice de polidispersibilidade

Tratamentos	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	Índice de polidispersidade (PDI)
T1	25,88 $\pm$ 1,66 <sup>b</sup>	0,590 $\pm$ 0,015 <sup>a</sup>
T2	27,86 $\pm$ 2,09 <sup>b</sup>	0,582 $\pm$ 0,028 <sup>a</sup>
T3	31,42 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>	0,588 $\pm$ 0,026 <sup>a</sup>
T4	29,75 $\pm$ 1,42 <sup>a</sup>	0,584 $\pm$ 0,062 <sup>a</sup>

Letras minúsculas diferentes em cada coluna representam diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Foi observado que o diâmetro variou de 25,88 a 31,42  $\mu\text{m}$ . A obtenção do diâmetro médio em uma faixa relativamente estreita provavelmente está relacionada ao uso das mesmas condições de operação do processo para realizar todos os tratamentos.

Não houve diferença significativa entre nos tratamentos T4 e T3 que contém manteiga de cacau em proporções maiores, respetivamente, enquanto os tratamentos com maior teor de cera de abelha apresentam os menores diâmetro. Esses resultados demonstram a influência do tipo de material lipídico. Tal comportamento pode ser correlacionado pela influência da viscosidade da suspensão atomizada no tamanho de partícula como sugerido por Maschke et al, (2007) e Albertini et al (2008). Dados da literatura mostram valores para viscosidade na temperatura 80 °C da manteiga de cacau 15,8 mPa.s e da cera de abelha de 8,9 mPa.s, respectivamente (LANDFELD, A. et al. 2009; BUCIO, A. et al. 2021).

Tais valores obtidos para o diâmetro das partículas, são compatíveis com a menor faixa de diâmetro usual obtido para micropartículas lipídicas produzidas por *spray chilling*, cujo o tamanho pode variar entre 10 a 100  $\mu\text{m}$  (LOPES, et al, 2015 e OKURO, et al. 2013).

Segundo, Carvalho et al., (2019); Consoli et al., (2016) e Oriani et al., (2018), muitos fatores influenciam o diâmetro das partículas e os principais são o tipo de bocal de atomização, a pressão de atomização, a taxa de alimentação, a natureza e proporção do composto ativo e da matriz e a viscosidade do líquido fundido a ser atomizado.

Sartori et al. (2015) apresentaram valores para diâmetro variando entre 18,00 e 67,00  $\mu\text{m}$  para partículas produzidas por *spray chilling*. Alvim et al. (2013) produziram partículas pelo método *spray chilling* encapsulando fitoesteróis e observaram valores de diâmetro entre 13,80 e 32,20  $\mu\text{m}$ .

Os tratamentos apresentaram polidispersidade, o valor de PDI permaneceu abaixo de 0,6, com valor médio de 0,587 indicando uma distribuição estreita e homogênea do tamanho das partículas nos tratamentos. Mesmo que o tamanho da partícula aumentou, o valor de PDI permaneceu abaixo de 0,6, indicando a homogeneidade das partículas nas formulações (TANG, et al. 2012).

#### **4.1.4 Eficiência de retenção**

A retenção de compostos bioativos em um processo de encapsulação é o parâmetro mais importante pois define se o processo conseguiu proteger o material ativo durante o processamento e armazenamento. As propriedades estruturais do material encapsulante são os principais fatores associados à capacidade de retenção dos ativos na encapsulação (SILVA, E. e MEIRELES, A., 2015). As MPLs produzidas neste estudo apresentaram valores de eficiência de retenção variando de 69,09 a 81,61% (Tabela 7).

A redução da concentração da cera de abelha acarretou em um aumento nas concentrações de ferro nas MPLs. A escolha e a definição dos materiais lipídicos carreadores influenciam de forma significativa a eficiência de retenção, em função de sua capacidade de solidificação e conseqüente formação das estruturas solidificadas.

Souto et al, (2004) relataram que a incorporação de diferentes lipídios, preferencialmente lipídios líquidos e lipídios sólidos na matriz pode levar a uma perturbação maciça da ordem cristalina, e a matriz resultante de partículas lipídicas terá grandes imperfeições na rede cristalina, assim deixando espaço suficiente para acomodar as moléculas do ativo, levando assim a uma melhor capacidade de carregamento e eficiência de aprisionamento. Em contrapartida, o uso de lipídios de alto ponto de fusão sozinhos pode contribuir para a liberação do ingrediente ativo durante o armazenamento (MULLER et al, 2002).

Os menores diâmetros de partículas podem também ter contribuído para menores valores de eficiência dos tratamentos 1 e 2. Quanto menor o tamanho das micropartículas, geralmente menor a eficiência, pois maior será a área superficial e maior a possibilidade de presença de material ativo na superfície (OKURO et al., 2013 ). Material ativo na superfície é mais susceptível a alterações e, no caso do ferro, ficaria mais livre para interagir com outros componentes de alimentos onde será aplicado.

Tabela 7 - Eficiência de retenção das micropartículas lipídicas produzidas por *spray chilling*.

Tratamentos	Eficiência de Retenção (%)
T1	69,09±2,18 <sup>b</sup>
T2	70,26±1,93 <sup>b</sup>
T3	79,70±1,62 <sup>a</sup>
T4	81,61±0,98 <sup>a</sup>

Os valores apresentados na eficiência de retenção são médias de duas repetições. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Matos-Jr et al. (2017) obtiveram valores para a eficiência de encapsulação de 68,2 a 72,5 % ao microencapsularem ácido ascórbico a partir de emulsões utilizando como materiais de parede o PATH e o óleo de palmiste. Leonel et al. (2010) também microencapsularam solução de glicose em diferentes concentrações e utilizaram como carreador lipídico misturas dos ácidos graxos: esteárico, oleico e gordura vegetal hidrogenada e a eficiência variou de 78,3 a 97,8 %. Sorita et al, (2021) encontraram eficiência de encapsulamento de até 85% a partir da atomização de soluções contendo curcumina utilizando como materiais carreadores cera de abelha, cera de carnaúba e triglicerídeos de cadeia média.

Os valores de ER obtidos neste estudo são próximos aos apresentados em trabalhos envolvendo microencapsulação por *spray chilling*. Apesar da técnica de *spray chilling* proporcionar eficiência altas, alguns fatores podem influenciar significativamente nesses resultados, como por exemplo: tipo e proporção dos materiais encapsulantes, assim como sua temperatura de fusão e a quantidade de material ativo (TRINDADE et al., 2016 ; OKURO, et al. 2013).

Carvalho, et al. (2019), relatam em seu trabalho que os valores de eficiência dificilmente atingem 100 %, visto que a perda do composto ativo começa antes do processo de encapsulação e, também, devido à insolubilidade do ativo hidrofílico em um meio hidrofóbico. Adicionalmente, durante o processo de atomização o ativo pode ter ficado retido no recipiente utilizado, no agitador magnético, na mangueira de atomização e no corpo do equipamento.

#### 4.1.4 Difração de Raios-X (DRX)

As figuras 6 e 7 mostram difratogramas do material ativo e dos materiais de parede. O sulfato de ferro apresentou dois principais picos intensos cristalinos em  $2\theta = 18^\circ$  e  $27,48^\circ$ . A

cera de abelha apresentou dois picos intensos cristalinos em  $2\theta = 18,5^\circ$  e  $27,38^\circ$ , semelhantes também ao relatados por Dinker et al., 2017 na literatura no estudo do desempenho térmico da cera de abelha como material de armazenamento térmico, e no trabalho de Pasqualim, (2015) que microencapsulou ácido salicílico utilizando cera de abelha. A manteiga de cacau também apresentou dois picos cristalinos  $2\theta = 23,87^\circ$  e  $19,41^\circ$ .

Figura 6 – Difratoograma do sulfato ferroso.

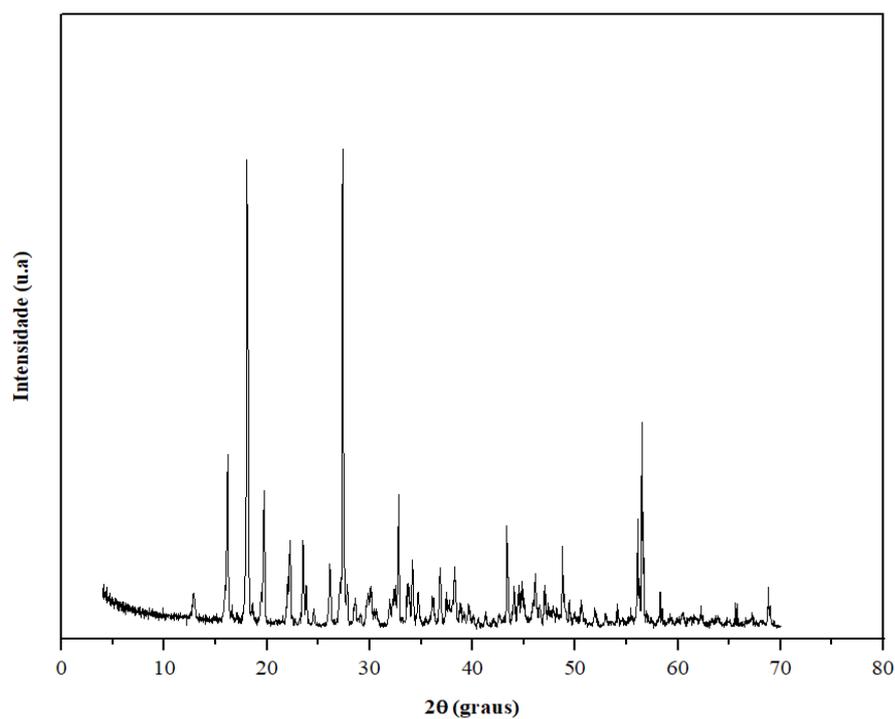
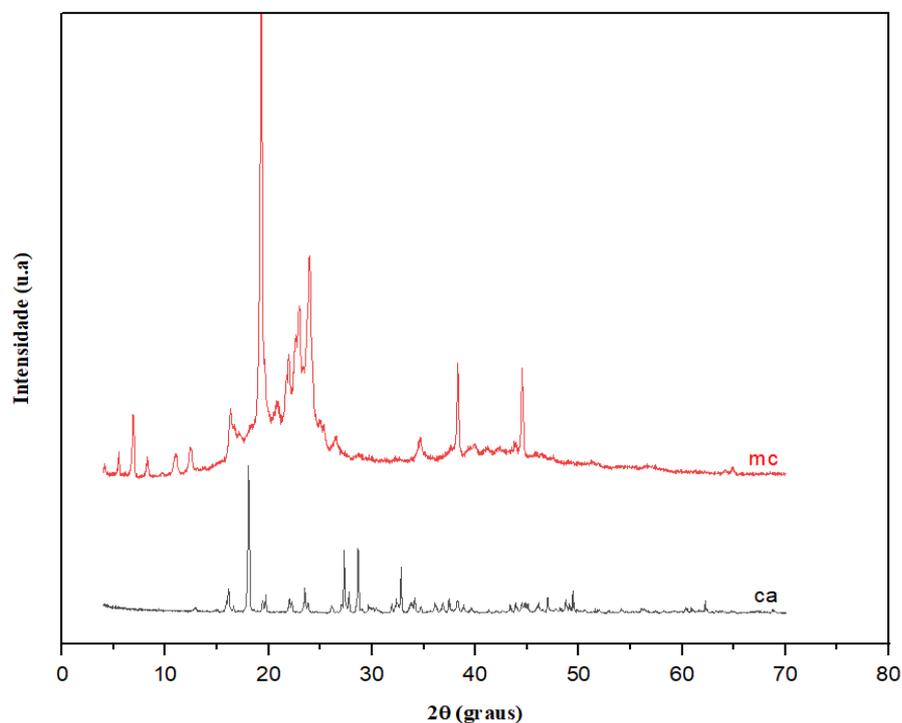


Figura 7– Difratoograma dos materiais de parede, manteiga de cacau (mc) e cera de abelha (ca).

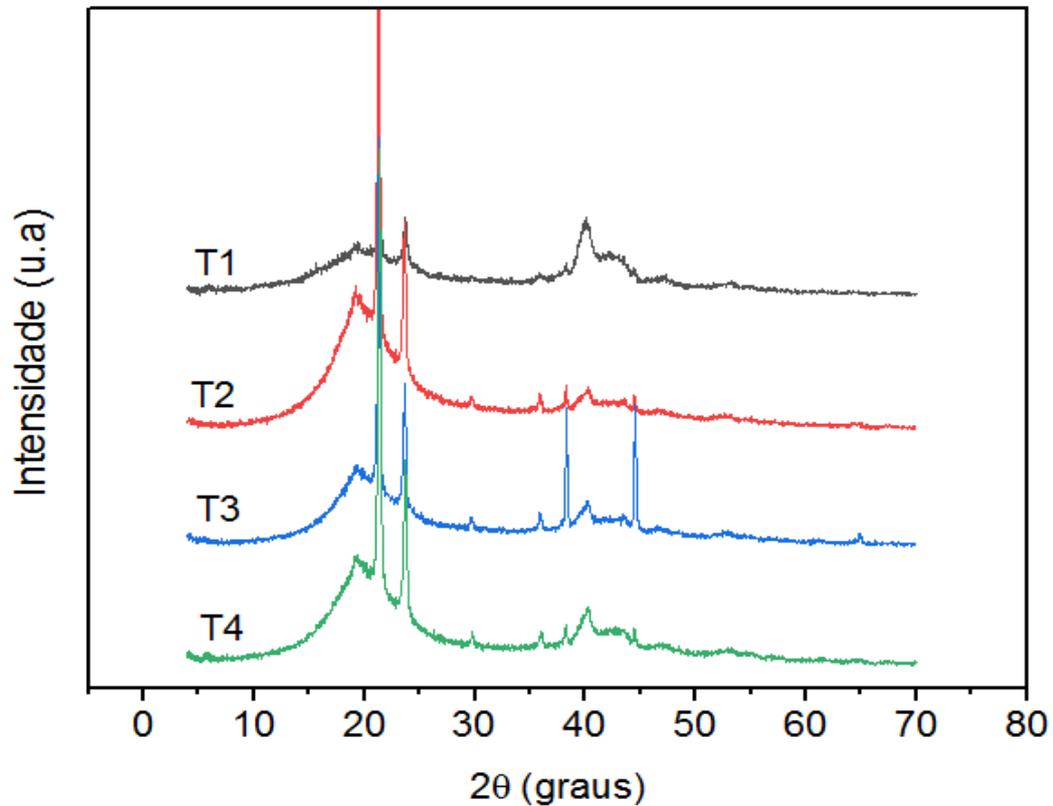


Os resultados da difração de raio-x dos tratamentos estão demonstrados na figura 8. Os tratamentos apresentaram espectros semelhantes, com a presença de dois picos bem acentuados  $2\theta = 21,08^\circ$  e  $23,80^\circ$ , com espaçamento curto (*short spacings*) de  $4,21 \text{ \AA}$  e  $3,7 \text{ \AA}$ , respectivamente, o que caracteriza hábitos polimórfico  $\beta'$ . A forma  $\alpha$  (hexagonal) apresenta um *short spacings* simples e único de  $4,15 \text{ \AA}$ , a forma  $\beta'$  (ortorrômbica) os *short spacings* variam entre  $3,8$  e  $4,2 \text{ \AA}$  e a forma  $\beta$  (triclínica) apresenta um *short spacings* de  $4,6 \text{ \AA}$  (CURI et al. 2002). No tratamento 3, verifica-se ainda dois picos  $2\theta = 39,5^\circ$  e  $45,71^\circ$ , característicos da manteiga de cacau.

A vantagem na obtenção de partículas na forma polimórfica  $\beta'$  é que esses cristais são macios e menos ordenados, o que permite uma retenção adequada do material ativo dentro da partícula, enquanto os sistemas lipídios formados com cristais  $\beta$  podem promover uma liberação antecipada do ativo (SATO e UENO, 2011).

A ausência de picos relacionados aos domínios cristalinos do sulfato de ferro nos difratogramas das micropartículas carregadas indicou que o sulfato de ferro estava dissolvido na matriz lipídica. Mesmo resultado do composto ativo está dissolvido na matriz lipídica foi encontrado por Sorita et al, (2021) e Lemes, et al (2017).

Figura 8 – Difratoograma das micropartículas contendo ferro.



Legenda: T1: Cera de abelha; T2: Cera de abelha + Manteiga de cacau (3:1); T3: Cera de abelha + manteiga de cacau (2:1); T4: Cera de abelha + manteiga de cacau (1:1).

#### 4.2 Liberação Controlada

Na figura 9 observam-se os resultados de liberação do ferro contido nas MPLs, em diferentes temperaturas e a influência das diferentes proporções de materiais lipídicos encapsulantes nas soluções aquosas de tween 80 (1 g/L).

Em todas temperaturas avaliadas observa-se que o maior percentual de liberação ocorreu no tratamento 1, constituído apenas de cera de abelha. O uso de lipídios de alto ponto de fusão, de forma isolada, sem misturas, leva à formação de partículas do tipo micropartículas lipídicas sólidas (MLS), que são o tipo mais conhecido de microesferas lipídicas. A MLS é constituída por lipídios sólidos com diâmetro entre 3 e 800  $\mu\text{m}$  e proporciona maior liberação do ingrediente ativo, ao longo do tempo e durante o armazenamento (MCCLEMENTS, 2020; MULLER et al 2002). Esse comportamento se deve ao acondicionamento de gorduras sólidas, com predominância de ácidos graxos saturados, que ocorre de forma mais organizada (SATO e

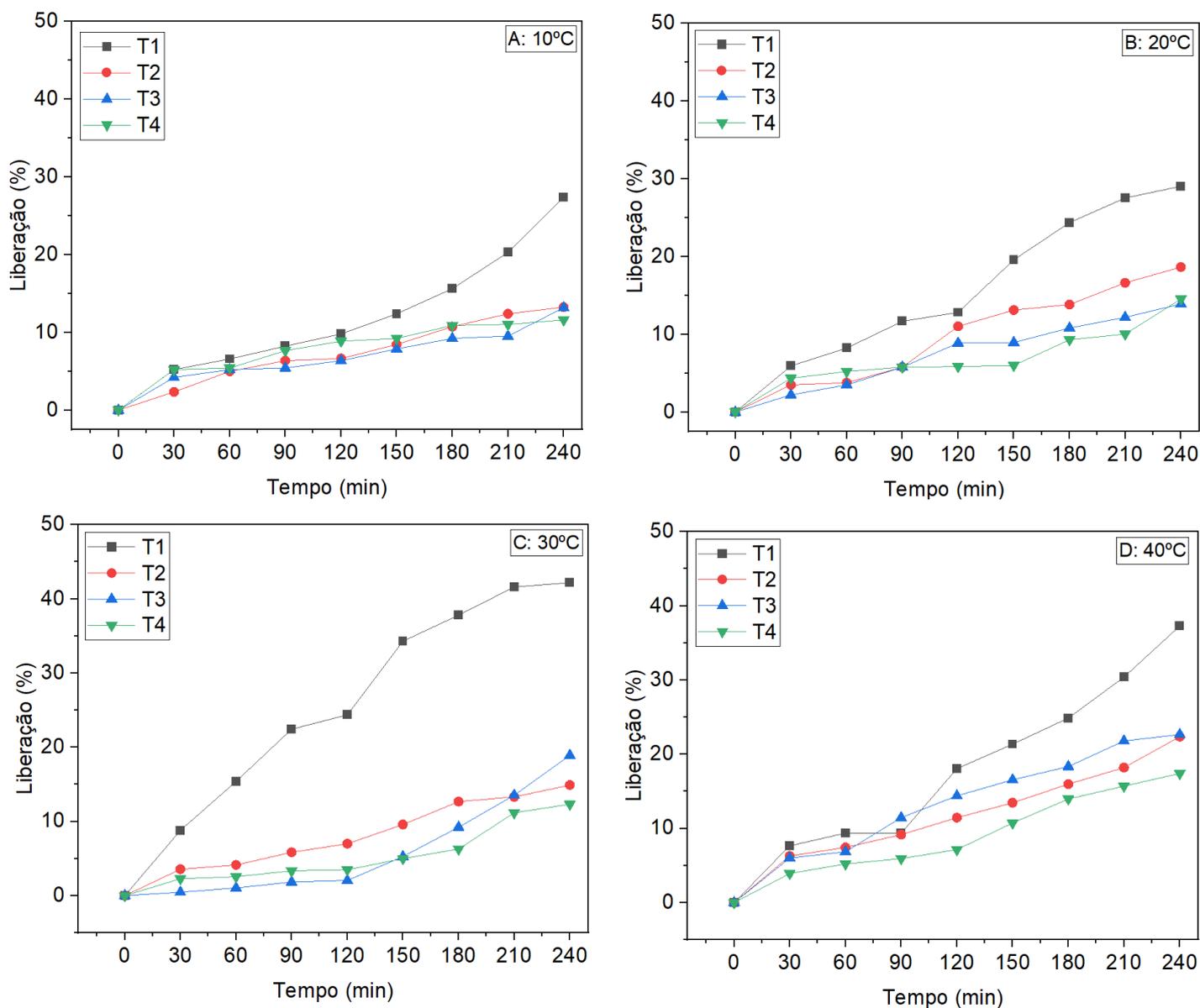
UENO, 2011). Como é o caso da manteiga de cacau que é constituída por dois ácidos graxos saturados, o ácido palmítico e ácido esteárico, e a cera de abelha que contém o ácido palmítico.

Observa-se que a liberação foi maior quando aplicado temperaturas mais elevadas, e a menor liberação foi obtida em temperaturas mais baixas, visto que quanto maior a temperatura maior a agitação entre as moléculas e, conseqüentemente, maior a difusividade.

No geral, todos os tratamentos liberaram ferro a partir dos 30 minutos em todas temperaturas, porém ao final de 240 min, os teores liberados de ferro foram significativamente diferentes, entre os tratamentos e nas temperaturas testadas.

Sartori, T. et al, (2015) microencapsularam por *spray chilling* ácido ascórbico utilizando ácido láurico e ácido oleico como materiais encapsulantes e obtiveram resultado semelhante, em todos os ensaios, as micropartículas lipídicas sólidas liberaram prontamente o ativo. Esse fenômeno é conhecido como liberação em rajada. De acordo com Müller et al. (2002), este evento pode resultar de um efeito de separação de fases durante a cristalização - nesta etapa, os lipídios transportadores cristalizam primeiro, o que deixa o interior da micropartículas lipídicas sólidas livre de material do núcleo, enquanto a camada externa é enriquecida com o ingrediente ativo. A reorganização dos cristais de gordura em uma forma polimórfica mais estável também afeta a liberação do núcleo (RIBEIRO et al., 2012).

Figura 9– Percentual de liberação do ferro das micropartículas nas diferentes temperaturas.



Legenda: T1: Cera de abelha; T2: Cera de abelha + Manteiga de cacau (3:1); T3: Cera de abelha + manteiga de cacau (2:1); T4: Cera de abelha + manteiga de cacau (1:1).

A: Temperatura de 10 °C; B: Temperatura de 20 °C; C: Temperatura de 30 °C e D: Temperatura de 40 °C.

Na tabela 8, observa-se o percentual de ferro liberado em todas as temperaturas no último tempo analisado, de 240 minutos.

Tabela 8 - Percentual de liberação do ferro das micropartículas no tempo de 240 minutos nas diferentes temperaturas.

<b>Temperaturas (°C)</b>	<b>Tratamentos</b>	<b>Liberação do ferro (%)</b>
<b>10</b>	<b>T1</b>	27,40
	<b>T2</b>	13,25
	<b>T3</b>	13,18
	<b>T4</b>	11,60
<b>20</b>	<b>T1</b>	29,05
	<b>T2</b>	18,64
	<b>T3</b>	13,90
	<b>T4</b>	14,54
<b>30</b>	<b>T1</b>	42,19
	<b>T2</b>	14,90
	<b>T3</b>	18,92
	<b>T4</b>	12,32
<b>40</b>	<b>T1</b>	37,31
	<b>T2</b>	22,37
	<b>T3</b>	22,66
	<b>T4</b>	17,41

Os tratamentos que obtiveram menor liberação foram o tratamento 4 constituído de cera de abelha e manteiga de cacau (1:1), seguido pelo tratamento 3, cera de abelha e manteiga de cacau (2:1). A presença de manteiga de cacau pode ter reduzido o tempo de liberação, pela formação de estruturas lipídicas menos estáveis, que promovem imperfeições nas cadeias carbônicas, com espaçamentos que permitem uma maior acomodação do ativo. Acomodando melhor os cristais de ferro em sua estrutura.

### **4.3 Modelos Cinéticos de Liberação**

A cinética de liberação do ferro foi estudada e, os valores dos parâmetros de liberação controlada ajustados pelos modelos de ordem zero, primeira ordem, Korsmeyer-Peppas e Higuchi, estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros dos modelos cinéticos obtidos para a liberação controlada do sulfato de ferroso nas temperaturas de 10 °C, 20 °C, 30 °C e 40 °C.

Temperatura (°C)	Ordem zero		Primeira ordem		Korsmeyer-Peppas			Higuchi	
	k	R <sup>2</sup>	k	R <sup>2</sup>	k	n	R <sup>2</sup>	k	R <sup>2</sup>
<b>10</b>	0,0007	96,5	0,1012	31,7	0,0100	0,55	96,19	0,0101	94,4
<b>20</b>	0,0009	97,8	0,1035	35,0	0,0024	0,78	97,51	0,0100	94,3
<b>30</b>	0,0007	95,8	0,1049	34,6	0,0022	0,83	94,44	0,0120	90,0
<b>40</b>	0,0010	98,7	0,0883	33,7	0,0100	0,55	96,48	0,0134	96,4

Pelos dados da Tabela 9, os modelos que melhor se ajustaram aos dados foram o de ordem zero e Korsmeyer-Peppas em todas temperaturas, visto que estes modelos apresentaram os maiores valores de R<sup>2</sup>, que variou de 95,8 a 98,7 e 94,44 a 96,48, respectivamente. O modelo de ordem zero está relacionado à liberação constante do ativo para o meio externo e à sua independência da concentração inicial do bioativo (FLORES e KONG, 2017). O modelo Korsmeyer-Peppas tem sido usado para prever o perfil de liberação de matrizes lipídicas e envolve a difusão de água nas micropartículas e o inchaço da matriz (ROSIAUX, Y. et al, 2014 ).

O coeficiente n está relacionado ao mecanismo de liberação, e apresentou valores entre 0,55 e 0,83, o que confirmou que as amostras seguiram um modelo de liberação não Fickiano. Esses resultados atestaram que a liberação ocorreu por difusão, mas também ocorreu relaxamento de moléculas. Em sistemas de liberação controlada, a taxa e extensão de liberação do ingrediente ativo resultam de uma combinação de difusão e transporte que corresponde ao relaxamento de moléculas através do carreador (RITGER e PEPPAS, 1987).

Estudos de Sartori et al. (2015) e Consoli et al. (2015), avaliaram o perfil de liberação de ácido ascórbico carregado em micropartículas lipídicas sólidas e relataram que os compostos bioativos foram liberados em solução aquosa de Tween 80 a 25 °C seguindo um modelo de Ritger -Peppas e um mecanismo de transporte não-Fickiano, indicando que outros mecanismos, além de difusão desempenharam um papel na liberação de ácido ascórbico. O modelo Ritger-Peppas é muito semelhante ao modelo Korsmeyer-Peppas, mas difere na classificação do mecanismo de transporte pelo valor “n” (RITGER e PEPPAS, 1987).

Tulini, F. L., et al, (2017) avaliou o perfil de liberação extrato de canela rico em proantocianidinas (*Cinnamomum zeylanicum*) coencapsulado com  $\alpha$ -tocoferol por *spray chilling* usando gordura vegetal como carreador e o modelo que melhor se ajustou foi o Korsmeyer-Peppas e de ordem zero, e n=0,76 indicando que houve um mecanismo de difusão

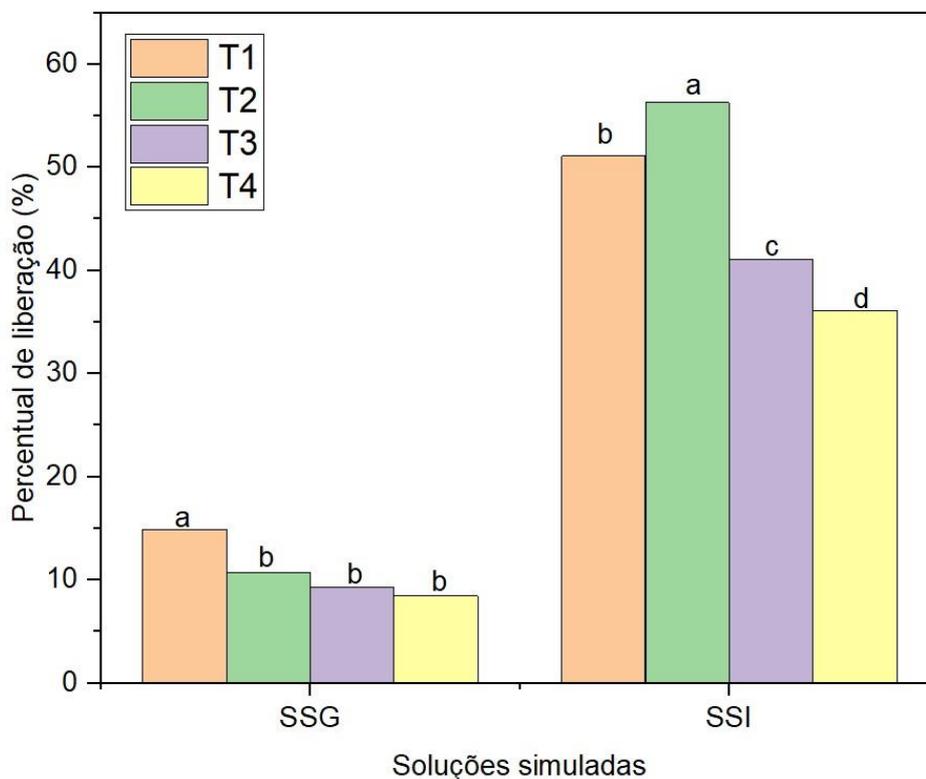
anômalo (ou não Fickiano).

#### 4.4 Avaliação in vitro

Geralmente, para que o carreador utilizado no processo de encapsulamento seja útil para absorção intestinal; as micropartículas devem proteger os compostos bioativos contra a degradação ácida e enzimática quando expostas ao fluido gástrico, ou seja, os materiais de parede devem ser tolerantes a estímulos gástricos, como pH extremamente baixo e pepsina presente no estômago. Em contraste, uma vez que as micropartículas atingem o intestino delgado, elas precisam liberar os materiais do núcleo de forma eficiente (PEDROSO, et al., 2013).

O teste do perfil de liberação do ferro foi realizado em soluções simuladas do sistema gástrico e intestinal para todos tratamentos (Figura 10).

Figura 10– Percentual de ferro liberado de micropartículas lipídicas em solução gástrica e solução intestinal simulada.



Letras minúsculas diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Verifica-se que todos os tratamentos liberaram o ferro na solução simulada gástrica, os valores foram de 8,43% a 14,9%. Sendo que o tratamento 1 apresentou maior valor e os demais tratamentos não diferenciaram estatisticamente entre si os seus valores de liberação. Essa liberação pode corresponder ao ferro que estava presente na superfície das micropartículas.

Na fase intestinal, os valores variaram de 36,08% a 56,26%. Sendo o tratamento 2 e 1 foram os que mais liberaram, respectivamente. São valores altamente interessantes, já que a maior liberação no intestino é ideal, indicando maior disponibilidade do ferro para absorção do composto ativo.

Mazzocato, et al, (2019) relatam que micropartículas menos aglomeradas, podem promover uma liberação mais rápida do composto ativo. Este fato foi observado nesse estudo, onde os tratamentos que apresentaram menos aglomeração das micropartículas liberaram mais rapidamente.

Levando em consideração as soluções gastrointestinal simulada e a solução aquosa de tween, os melhores tratamentos são o 2 e 3, por apresentarem maior resistência no meio aquoso e na solução gástrica.

Estudos de digestão simulada in vitro das micropartículas produzidas por *spray chilling* revelaram que a maioria das micropartículas tem liberação maior na fase intestinal. Esses resultados foram encontrados nos estudos de Tulini, F. L., et al, (2017) relataram que as micropartículas lipídicas sólidas contendo gordura vegetal e extrato de canela estabilizou as proantocianidinas no fluido gástrico, aumentando assim a liberação desse composto ativo na fase intestinal.

Dubey, B. N. Windhab, E. (2013) avaliaram a cinética de liberação do ferro em um sistema gástrico in vitro, encapsulado em emulsão água em óleo pelo processo de *prilling*, processo semelhante ao *spray chilling*. Encontraram resultados interessantes em relação a cinética de liberação do ferro e verificaram que a liberação de ferro da matriz de emulsão de gordura pode ser bem controlada adaptando o tamanho das partículas e o tamanho das gotículas da fase dispersa.

## 5 CONCLUSÃO

As micropartículas lipídicas carregadas com sulfato de ferroso produzidas por *spray chilling* mostraram-se como um sistema promissor para encapsulação deste micronutriente. As estruturas apresentaram bons resultados de eficiência de retenção, enquanto os ensaios in vitro revelaram que o ferro foi liberado com maior intensidade na solução intestinal simulada, o que

indica que as micropartículas lipídicas produzidas possuem capacidade de manter o composto encapsulado nas condições do estômago.

Verificou-se que a temperatura e a formulação lipídica das matrizes influenciaram na capacidade de liberação do ativo, sendo que a adição de manteiga de cacau foi responsável por diminuir a liberação do composto de interesse. O modelo que melhor se ajustou aos dados de liberação foi o modelo de ordem zero.

Como sugestão para futuros estudos, propõe-se testar outras proporções dos materiais encapsulantes e do composto ativo; investigar o uso de outros materiais encapsulantes na microencapsulação de sulfato de ferroso; avaliar a oxidação lipídica das micropartículas durante o armazenamento; e estudar a aplicação das micropartículas lipídicas produzidas neste trabalho em produtos alimentícios.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, S.; DA WEI, C.; HAYAT, K.; & XIAOMING, Z. Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends: A Review. **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 28, n. 4, p. 343–374, 2012.
- ALBERTINI, B. *et al.* New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Regensburg, v.69, p. 348 - 357, 2008.
- ALVIM, I. D. *et al.* Comparison between the spray drying and spray chilling microparticles contain ascorbic acid in a baked product application. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 689–694, 2016.
- ANSARIFAR, E. *et al.* Novel multilayer microcapsules based on soy protein isolate fibrils and high methoxyl pectin: Production, characterization and release modeling. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 761-769, 2017.
- ARCANJO, F. P. N.; AMANCIO, O. M. S.; BRAGA, J. A. P. Fortificação alimentar com ferro. **O mundo da saúde**, São Paulo, v. 33, n.3, p. 279-285, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13934**: Água - Determinação de ferro - Método colorimétrico da ortofenantrolina. Rio de Janeiro, 1997.
- ATTAMA, A.A.; SCHICKE, B.C.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Further characterization of theobroma oil-beeswax admixtures as lipid matrices for improved drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 294-306, 2006.
- BAILEY, R. L.; WEST, K. P.; BLACK, R. E. The epidemiology of global micronutrient deficiencies. **Annals of Nutrition and Metabolism**, Estados Unidos, v. 66, n. 2, p. 22–33, 2015
- BARROSO, L. Lipid-based carriers for food ingredients delivery. **Journal of Food Engineering**. v. 295, p. 110451, 2021.
- BERTONI, S. B. *et al.* Exploring the use of spray congealing to produce solid dispersions with enhanced indomethacin bioavailability: In vitro characterization and in vivo study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.139, pp. 132-141, 2019
- BOCANEGRA, R. *et al.* Production of Cocoa Butter Microcapsules Using an Electrospray Process. **Journal of Food Science**. V.70, p. 492-497, 2005
- BOGDANOV, S. Beeswax: quality issues today. **Bee World**, Reino Unido, v. 85, pp. 46-50, 2004
- BOGDANOV, S. Quality and standards of pollen and beeswax. **Apiacta**, v. 38, p. 334-341, 2004.
- BOGDANOV, S., K. Bee products and their potential use in modern medicine. **JAAS**, v.1, p. 57-63, 2009.

BOGDANOV, S. Beeswax: production, properties composition and control. **Beeswax book**, 2009.

BOOSTANI, S. ; JAFARI, S.M. A comprehensive review on the controlled release of encapsulated food ingredients; fundamental concepts to design and applications, **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, p. 303-321, 2021.

BOOSTANI, S.; JAFARI, S.M. Controlled release of nanoencapsulated food ingredients. **Release and bioavailability of nanoencapsulated food ingredients**, v. 5, p. 27-78, 2020.

BOTREL, D. A. *et al.* In fluence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. **Food Research International**, Canada, v. 62, p. 344-352, 2014.

BRASIL. Resolução – RDC nº 150, de 13 de abril de 2017. **Dispõe sobre o enriquecimento das farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília. Disponível em: <http://www.sindustriago.com.br/recursos/files/RDC%20150.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Atenção à Saúde. Programa Nacional de Suplementação de Ferro: manual de condutas gerais**, Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o “**Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos adicionados de nutrientes essenciais**”. Brasília. Órgão emissor: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br..> Acesso em: 05 dez. 2021.

BRASIL. Ministério da saúde. **Informe de atenção básica, n. 46, 2008**. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/psfinfo46.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: Anemia por deficiência de ferro**, Brasília. Portaria SAS/MS nº 1.247, de 10 de novembro de 2014.

BUCIO, A. *et al.* Characterization of Beeswax, Candelilla Wax and Paraffin Wax for Coating Cheeses. **Coatings**. V. 11, p. 1-16, 2021.

BUCHWAR, R.M.D.; BREED, A.R.; GREENBERG, G. Interspecific variation in beeswax as a biological construction material. **J Exp Biol**, v. 20, p. 3984, 2006.

CAMPELO, P. H. *et al.* Stability of lime essential oil microparticles produced with protein-carbohydrate blends. **Food Research International**, v. 105, p. 936-944, 2018.

CAMPELO-FÉLIX, P. H. *et al.* Prebiotic carbohydrates: effect on reconstitution, storage, release, and antioxidant properties of lime essential oil microparticles. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 65, p. 445-453.,2017.

CARVALHOS J. S. D. *et al.* Characterization of ascorbic acid microencapsulated by the spray chilling technique using palm oil and fully hydrogenated palm oil, **LWT - Food Science and Technology**, v.101, pp. 306-314, 2019.

CHAUVIN, R. **Traite' de biologie de l'abeille**. Paris, 1968.

CHEN, B.; MCCLEMENTS, D.; DECKER, E. Minor Components in Food Oils: A Critical Review of their Roles on Lipid Oxidation Chemistry in Bulk Oils and Emulsions. **Critical reviews in food science and nutrition**. V. 51, P. 901-16, 2011.

COHEN, K.O.; LUCCAS, V.; JACKIX, M.N.H. Revisão: Temperagem ou Pré-Cristalização do Chocolate. **Brazilian Journal of food Technology**, 2004.

CONSOLI, L. *et al.* Gallic acid microparticles produced by spray chilling technique: Production and characterization. **Food Science and Technology**, v.65, p. 79-87, 2016.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PORCOPIO, J. Entendendo a Gordura - **Os Ácidos Graxos Brasil**, p. 7-22, 2002.

DARY, O; HURRELL, R. Guidelines on food fortification with micronutrients. World Health Organization, **Food and Agricultural Organization of the United Nations**, Geneva, Switzerland, p. 1-376, 2006.

DARNTON-HILL, I. - Prevalence, Causes, and Consequences of Micronutrient Deficiencies. The Gap Between Need and Action. **Food Fortification in a Globalized World**, pp. 13-28, 2018.

DA MA; HAO JIN; LAI-YU KWOK; HEPING ZHANG. Effect of Lacticaseibacillus casei Zhang on iron status, immunity, and gut microbiota of mice fed with low-iron diet. **Journal of Functional Foods**, v. 88, 2022.

DINKER, A.; AGARWAL, M. E.; AGARWAL, G.D. Experimental study on thermal performance of beeswax as thermal storage material. **Mater. Today**. V. 4, p. 10529-10533, 2017.

DIOSADY, L.L.; MANNAR, M.G.V.; KRISHNASWAMY, K. Improving the lives of millions through new double fortification of salt technology. **Maternal & Child Nutrition**, v. 15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mcn.12773>. Acesso em: 5 jan. 2022.

DUBEY, B. N.; WINDHAB, E. Iron encapsulated microstructured emulsion-particle formation by prilling process and its release kinetics. **Journal of Food Engineering**. V. 115, p.198-206, 2013.

EMIN, Y.L.; MUSTAFA, Ü. Comparative analysis of olive oil organogels containing beeswax and sunflower wax with breakfast margarine. **Journal of Food Science**, v.79, p. 1732-1738, 2015.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; OKURO, P.K.; MATOS-JUNIOR, F. E. Encapsulation via spray chilling/cooling/congealing. **Handbook of Encapsulation and Controlled Release**, pp. 71-87, 2016.

FENNEMA, O.R., DAMODARAN, S., & PARKIN, K.L. **Fennema's food chemistry**. (4th ed.). Porto Alegre: Artmed, 2010.

FIGUEIREDO, J. A. *et al.* Microencapsulation by spray chilling in the food industry: Opportunities, challenges, and innovations, **Trends in Food Science & Technology**, 2022. No prelo.

FILIPONI M. P. *et al.* Microencapsulation performance of Fe-peptide complexes and stability monitoring. **Food Research International**, United States, v.125, 2019.

FLORES, F.; KONG, F. In vitro release kinetics of microencapsulated materials and the effect of the food matrix. **Food Science and Technology**, v.8, pp. 237-259, 2017.

FREDENBERG, S.; WAHLGREN, M.; AXELSSON, R. A. The mechanisms of drug release in poly (lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems: a review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, p. 34-52, 2011.

FULGONI, V. L. *et al.* Foods, Fortificants, and Supplements: Where Do Americans Get Their Nutrients?. **The Journal of Nutrition**, Houston, v. 141, n. 10, p. 1847–1854, 2011.

GAILLARD, Y. *et al.* Green material composites from renewable resources: Polymorphic transitions and phase diagram of beeswax/rosin resin. **Thermochimica Acta**, Volume 521, Pages 90-97,2011.

GAUCHERON, F. Iron fortification in dairy industry. **Trends in Food Science & Technology**. V.11, P.403-409, 2000.

GERA, T.; SACHDEV, H.S.; BOY, E. Effect of iron-fortified foods on hematologic and biological outcomes: Systematic review of randomized controlled trials. **American Journal of Clinical Nutrition**, United States, v. 96, n. 2, p. 309-324, 2012.

GHARIBZAHEDI, S.M.; JAFARI, S.M. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 62, n. 1, p. 119-132, 2017.

GOUIN, S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. Trends in **Food Science and Technology**, v.15, ed. (7–8), pp. 330–347, 2004.

HEPBURN, H.R. *et al.* Synthesis and secretion of beeswax in honeybees. **Apidologie**, Springer Verlag, v.22, p. 21-36, 1991.

HURRELL, R.; EGLI, I, Iron bioavailability and dietary reference values, **The American Journal of Clinical Nutrition**, V. 91, p., 2010.

KEAST, D. R. *et al.* Food sources of energy and nutrients among children in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey. **Nutrients**, Australia, v. 5, n. 1, p. 283–301, 2013.

JAFARI S.M.; MCCLEMENTS, D.J. Nanotechnology approaches for increasing nutrient bioavailability. **Advances in food and nutrition research**, v. 81, p. 1-30, 2017

KAMEDA, T. <sup>13</sup>C solid-state NMR analysis of heterogeneous structure of beeswax in native state. **Journal of Physics D: Applied Physics**, 38(24), 4313, 2005

KHOSH MANZAR, M. *et al.* Cocoa butter and cocoa butter substitute as a lipid carrier of *Cuminum cyminum* L. essential oil; physicochemical properties, physical activity and controlled released study. **Journal of Molecular Liquids**, v. 314, p.113638, 2020.

KOTEL'NIKOVA, E.; PLATONOVA, N.; FILATOV, S. Identification of biogenic paraffins and their thermal phase transitions. **Geology of Ore Deposits**, v.49, p.697-709, 2007.

LANDFELD, A. *et al.* Viscosity of cocoa butter. **International Journal of Food Properties**, v. 3, p.165-169, 2009.

LEONEL, A. J. *et al.* Production and characterization of lipid microparticles produced by spray cooling encapsulating a low molar mass hydrophilic compound. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 276–281, 2010.

MALPELI, A. *et al.* Short-term evaluation of the impact of a fortified food aid program on the micronutrient nutritional status of Argentinian pregnant women. **Biological Trace Element Research**, v. 155, n. 2, p. 176–183, nov. 2013.

MAZZOCATO, M.C.; THOMAZINI, M.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Improving stability of vitamin B12 (Cyanocobalamin) using microencapsulation by spray chilling technique, **Food Research International**, Volume 126, 2019, p.108663,

MCCLEMENTS, D.J. Nanoparticle-and microparticle-based delivery systems: Encapsulation, protection and release of active compounds. CRC press, 2019.

MINEKUS, M. *et al.* A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, v. 6, 2014.

MOGHTADAEI, M.; SOLTANIZADEH, N.; GOLI, S.A.H.. Production of sesame oil oleogels based on beeswax and application as partial substitutes of animal fat in beef Burger. **Food Research International**. v.108, p. 368-377, 2018.

NEVES, L. M.I. *et al.* Anhydrous milk fat blended with fully hydrogenated soybean oil as lipid microparticles: Characterization, stability, and trends for application. **LWT - Food Science and Technology**, v. 152, p. 112276, 2021.

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

ORIANI, V.B. *et al.* The influence of the storage temperature on the stability of lipid microparticles containing ginger oleoresin. **Food Research International**, v. 109, p. 472-480, 2018.

ORIANI, V.B. *et al.* Solid lipid microparticles produced by spray chilling technique to deliver ginger oleoresin: Structure and compound retention. **Food Research International**, United States, n. 80, pp. 41-49, 2016.

PAUCAR, O. C., *et al.* Production by spray chilling and characterization of solid lipid microparticles loaded with vitamin D 3. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 344–350, 2016.

PEDROSO, D. L. *et al.* Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in cocoa butter using spray chilling technology. **Food Microbiology**, Brasil, v. 44 (3), 2013.

PEPPAS, N. A., & NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v.190, pp. 75–81, 2014.

PERRIE, Y.; RADES, T. *Pharmaceutics: Drug delivery and targeting*. Pharmaceutical press, 2012.

RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An review of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, United Kingdom, v. 13, n. 1, p. 76-83, 2016.

REIS, M.O. *et al.* Biodegradable trays of thermoplastic starch/poly (lactic acid) coated with beeswax. **Ind. Crops Prod.**, v. 112, p. 481-487, 2018.

RIBEIRO, A. P. B.; BASSO, R. C.; e KIECKBUSCH, T. G. Effect of the addition of hardfats on the physical properties of cocoa butter. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.115, pp. 301–312, 2013.

RIBEIRO, M.D.M.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**, v.47, p. 38-44, 2012.

RIOS, R.V. *et al.* Application of fats in some food products. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 34, p. 3-15, 2014.

RITGERS, P.L.E.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II – Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 37-42, 1987.

ROEMHILD, K. *et al.* Iron metabolism: pathophysiology and pharmacology. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.42, p. 640-656, 2021

ROSIAUX, Y. *et al.* Excipientes lipídicos sólidos - Agentes de matriz para entrega sustentada de drogas. **Journal of Controlled Release**, v. 2, p. 18-30, 2014.

SALDAÑA, M.D.A.; MOHAMED, R.S.; MAZZAFERA, P. Extraction of cocoa butter from brazilian cocoa beans using supercritical CO<sub>2</sub> and ethane. **Fluid Phase Equilibria**, v. 194-197, pp. 885-894, 2002.

SANTOS, C.A. *et al.* Production and characterization of promising  $\beta$ -stable seed crystals to modulate the crystallization of fat-based industrial products. **Food Research International**. v.

130. p. 108900, 2020

SANT-RAYN, P.; M. MU, S. DW. Iron deficiency. **The Lancet**, London. V. 397, pp.233-248, 2021.

SARTORI, T. *et al.* Ascorbic acid microencapsulation by spray chilling: Production and characterization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 353–360, 2015.

SATO, K.; UENO, S. Crystallization, transformation and microstructures of polymorphic fats in colloidal dispersion states. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.16, n.5, pp. 384–390, 2011.

SAVOLAINEN, M. *et al.* Evaluation of polar lipid-hydrophilic polymer microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 262, p.47–62, 2003.

SCHOENING, F.R.L. The X-ray Diffraction Pattern and Deformation Texture of Beeswax. **South African Journal of Science**, 76, pp. 262-265, 1980

SILVA, E. K.; MEIRELES, M. A. Influence of the degree of inulin polymerization on the ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 578–586, 2015.

SODDU, E. *et al.* The effect of formulative parameters on the size and physical stability of SLN based on “green” components. **Pharmaceutical Development and Technology**, p.98-107, 2014.

SORITA, G. *et al.* Lipid composition optimization in spray congealing technique and testing with curcumin-loaded microparticles. **Advanced Powder Technology**, v.32, n.5, pp. 1710-1722, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921883121001618?via%3Dihub>. Acesso em: 5 jan. 2022.

SUAVE, J. *et al.* Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v.7, n.2, p.12-20, 2006.

SUGIARTO, M.; YE, A., SINGH, H. Characterization of binding of iron to sodium caseinate and whey protein isolate. **Food Chemistry**, Netherlands, v. 114, n. 3, p. 1007-1013, 2009.

SZARFARC, S. C. Políticas públicas para o controle da anemia ferropriva. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n.2, p. 2-7, 2010.

TANG, S. Y. *et al.* Formulation development and optimization of a novel Cremophore EL-based nanoemulsion using ultrasound cavitation. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 19, p. 330-45, 2012.

TERROSO, F. T. *et al.* In vivo prophylactic gastroprotection using  $\alpha$ -bisabolol encapsulated in lipid-core nanocapsules and in cocoa-theospheres. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 36, p. 99-109, 2016.

TULINI, F. L. *et al.* Evaluation of the release profile, stability and antioxidant activity of a

proanthocyanidin-rich cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) extract co-encapsulated with  $\alpha$ -tocopherol by spray chilling, **Food Research International**, v. 95, p. 17-124, 2017.

VAN LANGEVELDE, A.J. Triacylglycerol structures and cocoa-butter crystallization. PhD Thesis, **University of Amsterdam**, Amsterdam, 2000.

VERÍSSIMO, A. J. M. Efeito da Origem do Cacau na sua qualidade comercial, funcional e sensorial. O caso do cacau Catongo de São Tomé e Príncipe e do Brasil. Instituto Superior de Agronomia, **Universidade técnica de Lisboa**, 2012.

VIEIRA, R. C. S.; FERREIRA, H. S. Prevalência de anemia em crianças brasileiras, segundo diferentes cenários epidemiológicos. **Revista Nutrição**, v. 23, n. 3, p. 433-444, 2010.

WARD, R. J; CRICHTON, R. R. Iron: Properties and Determination. **Encyclopedia of Food and Health**. V. 1 . 468-475, 2016.

WEGMULLER, R., et al. Development, Stability, and Sensory Testing of Microcapsules Containing Iron, Iodine, and Vitamin A for Use in Food Fortification. **Journal of Food Science**, v.71, p.181–187, 2006.

WHO. Guideline: daily iron and folic acid supplementation in pregnant women. **World Health Organization**, Geneva, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Iron deficiency anemia. Micronutrient deficiencies, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/>. Acesso em: 08 jan. 2022.

ZANDI, M. *et al.* Identification of cardamom encapsulated alginate–whey protein concentrates microcapsule release kinetics and mechanism during storage, stew process and oral consumption. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, p. 1-11, 2017.

ZLOTKIN, S. *et al.* Treatment of anemia with microencapsulated ferrous fumarate plus ascorbic acid supplied as sprinkles to complementary (weaning) foods. **American Journal of Clinical Nutrition**, United States, v. 74, n. 6, p. 791-795, 2001.