

Guilherme Shigueru Barbosa Sakata

**ENCAPSULAÇÃO DE TRANS-RESVERATROL EM POLI( $\epsilon$ -  
CAPROLACTONA) POR MÉTODO A ALTA PRESSÃO**

Dissertação submetido ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos  
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lanza  
Coorientador: Dr. Gean Pablo Silva Aguiar  
Coorientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Florianópolis  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sakata, Guilherme Shigueru Barbosa  
Encapsulação de trans-resveratrol em poli(e  
caprolactona) por método a alta pressão / Guilherme  
Shigueru Barbosa Sakata ; orientador, Marcelo  
Lanza, coorientador, Gean Pablo Silva Aguiar,  
coorientador, José Vladimir de Oliveira, 2019.  
67 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós  
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis,  
2019.

Inclui referências.


1. Engenharia de Alimentos. 2. Fluido  
supercrítico . 3. GAS antissolvente. 4. poli(e  
caprolactona). 5. trans-resveratrol. I. Lanza,  
Marcelo . II. Aguiar, Gean Pablo Silva. III.  
Oliveira, José Vladimir de IV. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
em Engenharia de Alimentos. V. Título.

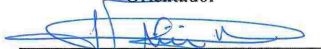
**“ENCAPSULAÇÃO DE TRANS-RESVERATROL EM  
POLI(ε -CAPROLACTONA) POR MÉTODO A ALTA  
PRESSÃO”**

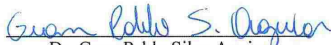
Por

**Guilherme Shiguero Barbosa Sakata**

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

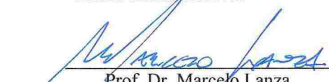
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Lanza  
**Orientador**

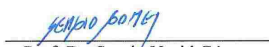
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira  
**Coorientador**

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Gean Pablo Silva Aguiar  
**Coorientador**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira  
**Coordenadora**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Lanza

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Sergio Yesid Gómez  
González

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Evertan Antonio Rebelatto

**Florianópolis, 08 de março de 2019.**



Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me dado forças e me guiado para concluir essa importante etapa

Aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado me dando força e incentivo

Aos professores Marcelo Lanza e Vladimir pela oportunidade de orientação, pelos ensinamentos.

Ao Gean Pablo por todo auxílio, atenção e dedicação no desenvolvimento do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL) pela oportunidade da realização desse trabalho.

A Susane, da Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC) pelo auxílio com as microscopias.

Ao Leandro da Central de análises do departamento de Engenharia Química e Alimentos, pelas análises realizadas.

Aos colegas do LATESC pelo auxílio, pelo apoio e pelos momentos de descontração

A Fapesc pela bolsa, a Capes e CPNq pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca pela disponibilidade.

A todos que de alguma forma contribuíram para o trabalho





Você lutou por isso. Agora você tem a chance de  
fazer seus sonhos se tornarem realidade.  
“Tite”



## RESUMO

O trans-resveratrol é um composto pertencente aos polifenóis produzidos por plantas em reações adversas. Tem apresentado diversos benefícios a saúde, como possível capacidade anticancerígena, efeito antioxidante, cardioprotetor entre outras. Entretanto, sua utilização é limitada devido a sua baixa solubilidade em água e instabilidade química. Assim, este trabalho tem por objetivo a produção de partículas de trans-resveratrol em poli( $\epsilon$ -caprolactona) utilizando a técnica de GAS antissolvente com o intuito de melhorar as características e proteger o composto. Para avaliar a influência da razão mássica entre composto e polímero (1:0,5, 1:1 e 1:2) e da pressão (100, 120, 140 bar) na eficiência de encapsulação e percentual real de encapsulação foi utilizado um planejamento experimental 2<sup>2</sup> com triplicata no ponto central. Na melhor condição de eficiência de encapsulação e percentual real de encapsulação foram obtidos valores de 99,34% e 65,31% respectivamente, onde foi observado que apenas a variável razão mássica teve influência no percentual real, porém, ambas as variáveis não tiveram influência na eficiência. Nas melhores condições foram obtidas micropartículas com tamanho médio de 103 até 135  $\mu\text{m}$ , com características heterogêneas e formato irregular. O processamento não alterou a estrutura química dos compostos, assim como a atividade antioxidante foi preservada. Com relação a liberação foi observado uma liberação rápida de até 40% nas primeiras 5 h com um máximo de 60% e liberação constante durante 48 h.

**Palavras-chave:** trans-resveratrol, GAS antissolvente, antissolvente supercrítico.



## ABSTRACT

Resveratrol is a polyphenolic compound produced by plants in adverse conditions. It has shown several health benefits, such as a potential to prevent cancer, antioxidant activities, cardioprotective effect, among others. However, due to its low solubility in water and chemical instability his use is limited. This study aims to produce poly( $\epsilon$ -caprolactone) particles containing resveratrol employing the GAS antisolvent technique. A Factorial Design 2<sup>2</sup> performed in triplicate at the central point evaluated the influence of polymer and resveratrol mass ratio (1:0,5, 1:1, 1:2) and pressure (100, 120, 140 bar) on encapsulation percentage and efficiency. The method came to a 99.34% efficiency and 65.31% encapsulation percentage and the statistical analysis shown that only the polymer and resveratrol mass ratio impacted the encapsulation percentage, but neither variables impacted the efficiency. At the best conditions, microparticles with sizes from 103 to 135  $\mu\text{m}$ , heterogeneous characteristics and irregular format were obtained. The processing did not change both the compounds chemical structures and the resveratrol antioxidant activity. A 40% burst release were measured in the first 5 hours with a maximum of 60% constant release during 48 hours.

**Keywords:** Resveratrol, GAS antisolvent, supercritical antisolvent.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do trans-resveratrol e cis-resveratrol .....	26
Figura 2 - Diagrama P-T para um componente puro.....	28
Figura 3 - Fluxograma esquemático do RESS .....	30
Figura 4 - Fluxograma esquemático do PGSS .....	32
Figura 5 - Fluxograma esquemático do GAS .....	33
Figura 6 - Fluxograma esquemático do SAS.....	34
Figura 7 - Esquema do bico coaxial do SEDS .....	35
Figura 8 - Síntese da poli( $\epsilon$ -caprolactona).....	36
Figura 9 - Fluxograma de realização dos experimentos .....	38
Figura 10 - Diagrama esquemático da unidade de precipitação por GAS antissolvente .....	41
Figura 11 - Fluxograma experimental .....	41
Figura 12 - Fluxograma esquemático da eficiência e percentual real ...	43
Figura 13 - Curva padrão de trans-resveratrol.....	45
Figura 14 - Diagrama de Pareto para o percentual real de encapsulação .....	50
Figura 15 - Diagrama de Pareto para eficiência de encapsulação .....	51
Figura 16 - Superfície de resposta para percentual real de encapsulação .....	52
Figura 17 - Microscopia das partículas da amostra 2 (A e B), partículas da amostra 6 (C e D) e do trans-resveratrol puro (E e F) .....	53
Figura 18 - Microscopia confocal da amostra 2(A), amostra 6 (B), trans-resveratrol (C) e poli( $\epsilon$ -caprolactona) (D). As imagens foram feitas com aumento de 20 vezes, e sobreposição de campos claros e escuros, com a fluorescência em luz azul .....	55
Figura 19 - Espectros do FTIR para poli( $\epsilon$ -caprolactona), trans-resveratrol, e das partículas formadas. ....	57
Figura 20 - Cinética de liberação <i>in vitro</i> do trans-resveratrol.....	59





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fluxograma de realização dos experimentos.....	40
Tabela 2 - Dados de percentual real e eficiência de encapsulação para partículas .....	48
Tabela 3 - Análise de variância para o percentual real de encapsulação	51
Tabela 4 - Análise de variância para a eficiência de encapsulação .....	52
Tabela 5 - Medidas do tamanho das partículas produzidas e resveratrol puro .....	54
Tabela 6 - Amostras codificadas com respectivos valores de EC <sub>50</sub> .....	58



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA – Atividade antioxidante  
Ab<sub>Samostra</sub> – Absorbância da amostra  
Ab<sub>Sbranco</sub> – Absorbância do branco  
Ab<sub>Scontrole</sub> – Absorbância do controle  
ANOVA – Análise de variância  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono  
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil  
EC<sub>50</sub> – Mínima concentração para decrescer em 50 % a concentração do radical DPPH  
EE – Eficiência de encapsulação  
F – Teste de Fisher  
FDA – do inglês *US Food and Drug Administration*: Agência Reguladora de Alimentos e Medicamentos Americana  
FTIR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier  
GAS – Gás antissolvente  
GL – Graus de liberdade  
HCl – Ácido clorídrico  
LATESC – Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica  
LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica  
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura  
MQ – Média quadrática  
OP – Óleo de peixe  
P – Pressão  
PBS – Solução tampão fosfato  
P<sub>c</sub> – Pressão crítica  
PCL – Poli(ε-caprolactona)  
PGSS – Precipitação de Partículas de Solução Supercrítica  
PHBV – Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato)  
PLA – Poliacido Láctico  
PR – Percentual Real  
PTE – Percentual Teórico de Encapsulação  
RESS – Rápida Expansão de Solução Supercrítica  
RSV – trans-resveratrol  
SAS – Antissolvente Supercrítico  
SEDS – Solução Aumentada por Fluido Supercrítico  
SQ – Soma quadrática  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
UV – Ultravioleta  
X<sub>min</sub> – Tamanho mínimo de partícula

$X_{\max}$  – Tamanho máximo de partícula

$X_{\text{médio}}$  – Tamanho médio de partícula

$\sigma$  – Desvio padrão

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1	OBJETIVOS .....	25
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>25</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>26</b>
2.1	TRANS-RESVERATROL.....	26
2.2	FLUIDO SUPERCRÍTICO.....	27
2.3	FORMAÇÃO DE PARTÍCULA COM FLUIDO SUPERCRÍTICO .....	29
<b>2.3.1</b>	<b>Fluido supercrítico como solvente</b> .....	<b>29</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Fluido supercrítico como soluto</b> .....	<b>31</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Fluido supercrítico como antissolvente</b> .....	<b>32</b>
2.4	POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA).....	35
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
3.1	ESPECIFICAÇÕES DOS MATERIAIS E DO PROCESSAMENTO .....	39
3.2	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DO PROCESSO DE COPRECIPITAÇÃO .....	39
3.3	UNIDADE EXPERIMENTAL DE PRECIPITAÇÃO .....	40
3.4	MÉTODO DE COPRECIPITAÇÃO DE TRANS-RESVERATROL .....	41
3.5	DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) E PERCENTUAL REAL DE ENCAPSULAÇÃO (PR).....	43
3.6	MORFOLOGIA E TAMANHO DE PARTÍCULA.....	45
3.7	MICROSCOPIA CONFOCAL.....	46
3.8	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	46
3.9	INIBIÇÃO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRIHIDRAZIL (DPPH) .....	46
3.10	LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	47

3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS .....	47
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
4.1	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) E PERCENTUAL REAL DE ENCAPSULAÇÃO (PR) .....	48
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS.....	53
4.3	AVALIAÇÃO DAS PARTÍCULAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....	54
4.4	ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .....	56
4.5	DETERMINAÇÃO DE INIBIÇÃO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRIHIDRAZIL (DPPH).....	57
4.6	COMPORTAMENTO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	58
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O resveratrol é produzido por várias espécies vegetais em situações de estresse, injúria, radiação ultravioleta e ataque de patógenos. É um composto fenólico que pertence ao grupo dos estilbenos (LANGCAKE; PRYCE, 1976).

Foi dado como explicação para os efeitos cardioprotetores do vinho, a partir de então vários estudos foram feitos com o trans-resveratrol e outros benefícios foram descobertos, por exemplo que ele pode prevenir ou retardar certas doenças, como câncer e doenças cardiovasculares (BAUR; SINCLAIR, 2006).

Apesar de diversos benefícios a saúde, sua utilização na indústria ainda é limitada devido a sua baixa solubilidade em água (0,021 – 0,030 mg/mL), baixa biodisponibilidade e por ser degradado quimicamente quando exposto a altas temperaturas, alterações de pH (isomerização imediata em pH maior que 8, e lenta entre 5 e 8) e luz (ALLAN; LENEHAN; ELLIS, 2009; DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2014).

Para se contornar essa situação, a encapsulação torna-se uma alternativa interessante, pois pode aumentar a dispersão do resveratrol, proteger o composto dos fatores ambientais que promovem sua degradação e aumentar a sua biodisponibilidade (DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2014).

A encapsulação é um método no qual um material é revestido ou aprisionado em um outro material ou sistema. Esse material que revestido é chamado de ativo ou núcleo e o material de revestimento é chamado de casca ou material encapsulante (MADENE et al., 2006).

Os métodos de encapsulação geralmente envolvem a utilização de soluções químicas e uma grande quantidade de solventes orgânicos. Esses solventes apresentam alguns problemas como toxicidade, inflamabilidade e problemas com sua recuperação. Com isso há um aumento no interesse de tecnologias limpas, dessa maneira os fluidos supercríticos têm sido utilizados para substituir solventes convencionais (SANSEVERINO, 2000; YUE et al., 2004).

As técnicas que utilizam fluido supercrítico para a produção de partículas são classificadas de acordo com a maneira em que o fluido supercrítico é utilizado no processo, sendo possível utilizá-lo como solvente, cossolvente ou antissolvente (MARTÍN; COCERO, 2008a).

O método GAS antissolvente se fundamenta na diminuição do poder de solvatação do solvente com a adição da solução supercrítica,

causando assim uma supersaturação da solução com conseqüente precipitação das partículas (MARTÍN; COCERO, 2008a).

A PCL é um polímero biodegradável utilizado para liberação controlada de fármacos devido a sua lenta degradação. Tem capacidade de formar misturas com outros polímeros.

Nesse contexto a encapsulação de trans-resveratrol demonstra ser relevante frente a possibilidade de melhorar as características e proteger um composto com promissoras propriedades à saúde.



## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O trabalho tem o objetivo geral de encapsular trans-resveratrol pela técnica GAS antissolvente utilizando dióxido de carbono como fluido supercrítico e poli( $\epsilon$ -caprolactona) como encapsulante.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

Em consonância com o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Verificar a influência das variáveis pressão e razão mássica entre trans-resveratrol e poli( $\epsilon$ -caprolactona) na eficiência de encapsulação e no percentual real de encapsulação (PR);
- Determinar o percentual real de encapsulação (PR) e eficiência de encapsulação (EE);
- Observar a morfologia, tamanho e distribuição das partículas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Confocal;
- Analisar por meio da Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) possíveis degradações no composto;
- Explorar o perfil de liberação *in vitro* das partículas coprecipitadas;
- Avaliar possíveis perdas no poder antioxidante causado pela alta pressão do trans-resveratrol por meio da degradação do radical DPPH;

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

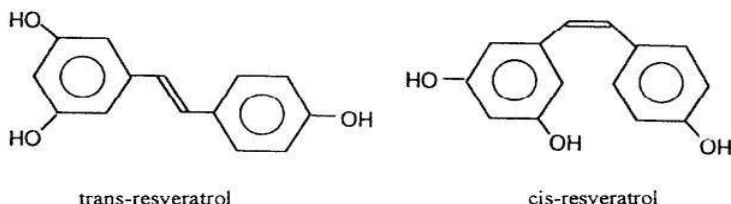
### 2.1 TRANS-RESVERATROL

Em 1940, trans-resveratrol foi extraído de raízes de *Veratrum gradiflorum* O. Loes pela primeira vez (TAKAOKA, 1940), também foi encontrado mais tarde em raízes de *Polygonum Cuspidatum*, que tem sido usada há muito tempo na medicina oriental (NONOMURA; KANAGAWA; MAKIMOTO; 1963). Trans-resveratrol é produzido por plantas em reação à injúria, ataque de patógenos, radiação UV e estresse. É uma fitoalexina pertencente ao grupo dos estilbenos, com potencial benéfico a saúde humana, sendo direta ou indiretamente ligado aos mecanismos de defesa das plantas (FRÉMONT, 2000; LANGCAKE; PRYCE, 1976)

Foi detectado em uvas pela primeira vez em 1976 (LANGCAKE; PRYCE, 1976), foi encontrado no vinho em 1992, quando se pressupôs seus efeitos cardioprotetores, a partir dessa descoberta o interesse no estudo desse composto aumentou (BAUR; SINCLAIR, 2006; SIEMANN; CREASY, 1992).

Trans-resveratrol é o termo para 3,5,4'-trihidroxiestilbeno, pertencente aos polifenóis que compreendem uma grande classe de antioxidantes, sendo eles derivados de fenilalanina com molécula formada por anéis aromáticos e hidroxilas, como observado na Figura 1. Também pode ser encontrado na forma cis (SIGNORELLI; GHIDONI, 2005).

Figura 1 - Estrutura química do trans-resveratrol e cis-resveratrol



Fonte: Frémont (2000)

Vários benefícios do trans-resveratrol tem sido descritos. Esse composto tem possível capacidade anticancerígena, efeito antioxidante, efeito cardioprotetor, inibição do colesterol e triglicerídeos, anti-inflamatória e neuroprotetoras (BAUR; SINCLAIR, 2006).

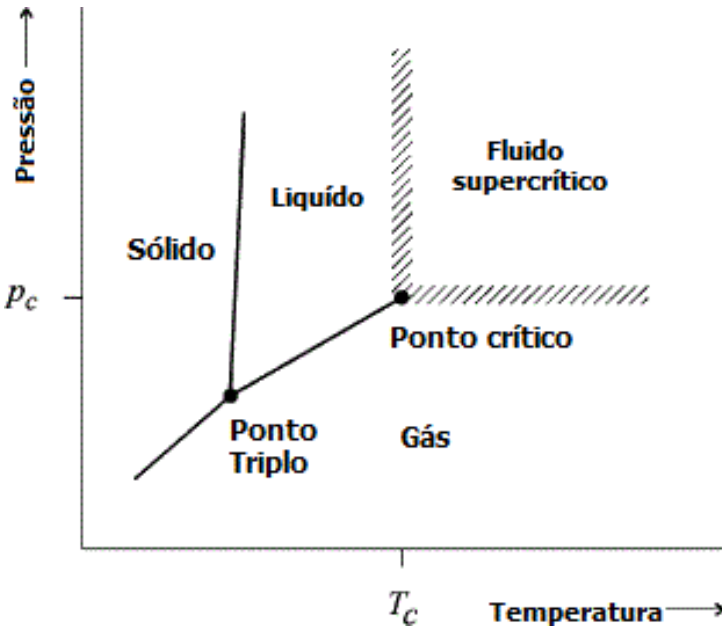
Tem sido apontado como explicação para o “Paradoxo Francês”, conceito que descreve o fato da população francesa em sua alimentação conter uma dieta rica em gorduras saturadas, entretanto apresentar um baixo índice de doenças cardiovasculares, atribuído ao consumo regular de vinho (RENAUD; DE LORGERIL, 1992).

Sua utilização ainda é limitada devida sua baixa biodisponibilidade, baixa solubilidade em água (0,021 – 0,030 mg/mL) e instabilidade química. Sua degradação normalmente se dá pela isomerização da forma trans para forma cis, fazendo com que isso diminua sua bioatividade. Os benefícios descritos para o trans-resveratrol em análises *in vitro*, quando expandidos para análises *in vivo* não demonstram a mesma efetividade, devido sua baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e elevado metabolismo (DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2014; MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011; SANNA et al., 2012).

## 2.2 FLUIDO SUPERCRÍTICO

Um fluido supercrítico é qualquer substância que se encontra acima do seu ponto de temperatura e pressão críticos. É definido como um estado onde não há diferenças entre o estado líquido e gás, suas propriedades ficam intermediárias, sendo a densidade semelhante a do líquido, a viscosidade de um gás e a difusividade intermediária entre o gás e o líquido (BRUNNER, 2005; HERRERO; CIFUENTES; IBÁÑEZ, 2006).

Figura 2 - Diagrama P-T para um componente puro.



Fonte: adaptado de BRUNNER (2005)

Os fluidos supercríticos devido suas características como serem menos nocivos ao meio ambiente comparado aos solventes convencionais, são chamados de “solventes verdes para o futuro”. Manipulando as variáveis pressão e temperatura podemos alterar suas propriedades como difusividade, viscosidade e constante dielétrica, alterando assim sua seletividade. O processo de recuperação do solvente pode ser feito apenas com uma despressurização, sem necessidade de etapas subsequentes (KNEZ et al., 2014).

O solvente mais utilizado atualmente é o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), por ser atóxico, não-inflamável e suas propriedades críticas são moderadas, com temperatura de  $31,3\text{ °C}$  e pressão de  $72,9\text{ atm}$ , sendo possível realizar o processo em temperatura que evita a degradação de compostos termolábeis. A pressão atmosférica se encontra no estado de gás, sendo assim uma despressurização elimina  $\text{CO}_2$  sem deixar resíduos, sendo o produto livre de solvente (BRUNNER, 2005; HERRERO; CIFUENTES; IBAÑEZ, 2006).

As tecnologias com fluido supercrítico em escala industrial são utilizadas em diversas áreas como farmacêutica, alimentícia e têxtil. Devido as suas qualidades, aplicações dessa tecnologia vem sendo desenvolvidas. Já vem sendo utilizado como meio de reação para reações químicas e bioquímicas (RAMSEY et al., 2009), utilizado em processos de extração (CORREA et al., 2016), formação de partículas (DAL MAGRO et al., 2017), micronização de compostos (AGUIAR et al., 2018), cromatografia com fluido supercrítico (SAITO, 2013).

## 2.3 FORMAÇÃO DE PARTÍCULA COM FLUIDO SUPERCRTICO

Existem diversas técnicas convencionais para a produção de partículas, porém esses métodos trazem consigo algumas desvantagens, a formação por *spray drying* utiliza altas temperaturas, técnicas com evaporação de solvente podem deixar resíduo no produto e todos eles tem um baixo controle de tamanho (SHARIATI; PETERS, 2003).

A formação de partículas com o uso de fluido supercrítico apresenta uma alternativa que evita as desvantagens das técnicas convencionais. As partículas formadas normalmente têm tamanho homogêneo, podendo formar de micro até nanopartículas, e são partículas de alta pureza (FAGES et al., 2004).

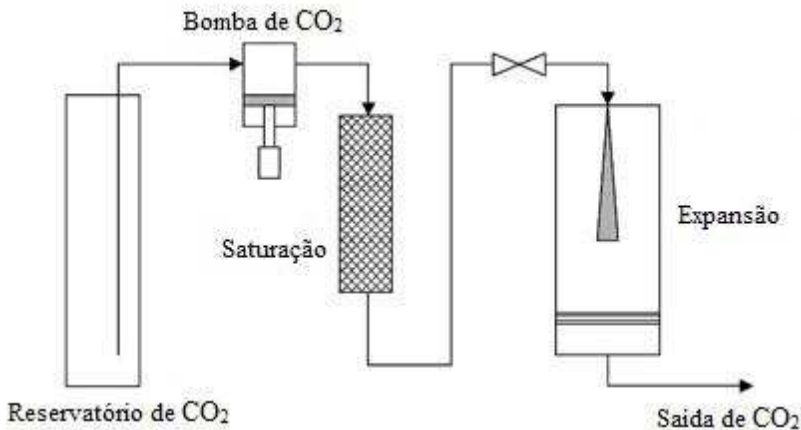
Os processos envolvendo fluido supercrítico podem ser classificados de acordo com a sua função no processo, onde ele pode atuar como solvente, no método de Rápida Expansão de Solução Supercrítica (RESS), como soluto na Precipitação de Partículas de Solução Saturada com Gás (PGSS) ou como antissolvente nos métodos Gás Antissolvente (GAS) e Antissolvente Supercrítico (SAS) (MARTÍN; COCERO, 2008a)

### 2.3.1 Fluido supercrítico como solvente

A técnica que utiliza fluido supercrítico como solvente foi proposta por Krukonis, e é conhecida como Rápida Expansão de Solução Supercrítica (RESS). Essa técnica se fundamenta na alteração do poder solvente do CO<sub>2</sub> supercrítico com a variação dos parâmetros pressão e temperatura. O método consiste basicamente em duas etapas, primeiro o composto entra em contato com o fluido supercrítico no qual é dissolvido,

em seguida a mistura segue para a etapa da expansão por meio de um bocal, como exemplificado na Figura 3 (FAHIM et al., 2014; SHARIATI; PETERS, 2003)

Figura 3 - Fluxograma esquemático do RESS



Fonte: adaptado de MARTÍN; COCERO, (2008b)

A formação de partículas pelo método RESS se baseia na diferença de solubilidade do composto em CO<sub>2</sub> supercrítico quando o mesmo se encontra a alta e baixa pressão, juntamente com a separação de fases induzida pela despressurização na etapa de expansão. Quando a solução é expandida por meio do bocal, a despressurização repentina diminui o poder solvente do CO<sub>2</sub> e a temperatura da solução, com isso ocorre uma supersaturação da solução, seguido da nucleação e formação das partículas. Como essa despressurização ocorre de maneira extremamente rápida, supersaturação extremamente alta pode ser alcançada e propagada rapidamente por todo fluido, assim partículas de tamanho pequeno e distribuição pequena são obtidas (COCERO et al., 2009; ESFANDIARI, 2015; MARTÍN; COCERO, 2008b; YEO; KIRAN, 2005).

Pressão e temperatura são alguns dos parâmetros principais do processo. Esses parâmetros indicam o trajeto na separação de fases causada pela despressurização, um binômio onde a solução não adquira características adequadas na etapa de despressurização pode levar a variação na morfologia ou entupimento do bocal. O bocal de expansão também tem importante papel na morfologia das partículas precipitadas,

uma variação no comprimento ou no diâmetro do bocal modifica a morfologia da partícula final (DAVIES et al., 2008; FAGES et al., 2004; MARTÍN; COCERO, 2008b; YEO; KIRAN, 2005).

Como o método necessita que o composto seja solúvel em CO<sub>2</sub> supercrítico, isso limita sua utilização já que um pequeno número de compostos tem essa característica. Uma maneira de se contornar esse problema seria o uso de cossolventes no processo, porém isso elimina uma das principais vantagens do método que é a não utilização de solventes orgânicos (COCERO et al., 2009; DAVIES et al., 2008; MARTÍN; COCERO, 2008b).

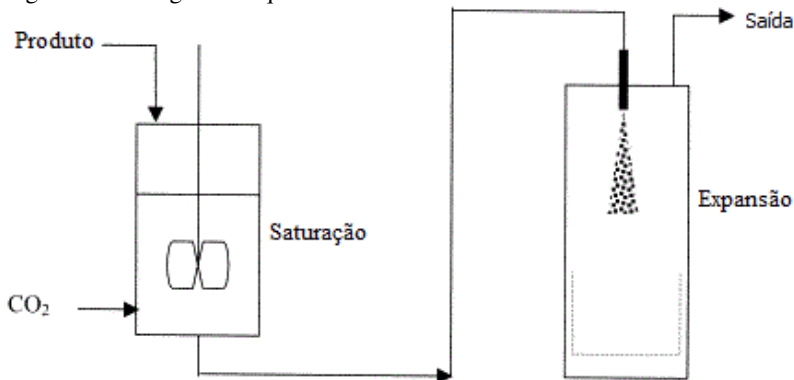
### **2.3.2 Fluido supercrítico como soluto**

O processo PGSS utiliza o CO<sub>2</sub> como soluto, neste caso, o método se baseia no efeito Joule-Thomson, que é a redução da temperatura causado pela despressurização junto com a evaporação do CO<sub>2</sub> que leva a solidificação das partículas. Essa técnica é utilizada para compostos que não são solúveis em CO<sub>2</sub> e que o efeito antissolvente é pequeno, mas que tem potencial de absorver grande quantidade do gás (FAHIM et al., 2014; KNEZ; WEIDNER, 2003; MARTÍN; COCERO, 2008b).

O processo basicamente se fundamenta na dissolução do CO<sub>2</sub> supercrítico em um substrato, obtendo assim uma solução saturada de gás, seguido de uma expansão por meio de um bocal na câmara de expansão, que leva a formação das partículas, conforme a Figura 4. (ESFANDIARI, 2015; FAGES et al., 2004; MARTÍN; COCERO, 2008b).

O PGSS apresenta certas vantagens com relação a outros métodos, não utiliza solvente, logo não necessita de etapas subsequentes, usa quantidade baixa de CO<sub>2</sub> se comparada aos outros métodos (DAVIES et al., 2008; FAHIM et al., 2014; KNEZ; WEIDNER, 2003; MARTÍN; COCERO, 2008b).

Figura 4 - Fluxograma esquemático do PGSS



Fonte: adaptado de JUNG; PERRUT (2001)

### 2.3.3 Fluido supercrítico como antissolvente

Os métodos antissolvente com fluido supercrítico são técnicas utilizadas para processar sólidos que são insolúveis em fluido supercrítico. Ele utiliza a habilidade dos fluidos supercríticos em se dissolverem em solventes orgânicos e assim diminuir o poder de solvatação desses solventes (KNEZ; WEIDNER, 2003).

Os processos que utilizam fluido supercrítico como antissolvente são o GAS antissolvente (GAS), antissolvente supercrítico (SAS) e dispersão de solução aumentada por fluido supercrítico (SEDS). Sendo SAS e SEDS técnicas semi-contínuas e GAS uma técnica em batelada. Elas se diferenciam principalmente na maneira do contato entre o fluido supercrítico e as amostras (FAHIM et al., 2014; KNEZ; WEIDNER, 2003; SHARIATI; PETERS, 2003).

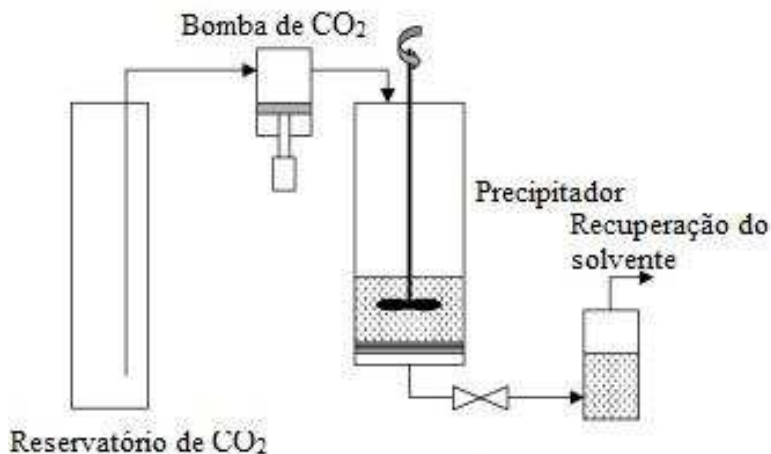
O método GAS consiste em dissolver um soluto em solvente orgânico e inseri-lo na câmara de precipitação, em seguida o CO<sub>2</sub> é injetado, conforme a Figura 5. Essa injeção faz com que ocorra um aumento na pressão na câmara, com isso ocorre um aumento na solubilidade do CO<sub>2</sub> no solvente orgânico e uma expansão da solução. Isso faz com que ocorra uma diminuição do poder de solvatação do solvente orgânico para com os solutos da solução, levando assim a precipitação. Quando atingido a pressão desejada, o solvente é drenado isobaricamente por um período suficiente para remoção total. O solvente deve ser altamente solúvel no CO<sub>2</sub> e o soluto praticamente insolúvel para



perfeito funcionamento do sistema. Diferentemente dos outros métodos de produção de partículas, em uma metodologia de antissolvente temos um sistema ternário (solvente, soluto e  $\text{CO}_2$ ), já em um método como RESS temos um sistema binário (soluto +  $\text{CO}_2$ ) (DE LA FUENTE BADILLA et al., 2000; MARTÍN; COCERO, 2008b; SHARIATI; PETERS, 2003).

Yesil-Celiktas e Cetin-Uyanikgil (2012) encapsularam extrato de alecrim em PCL pela técnica de evaporação de solvente e GAS antissolvente para avaliar o perfil de liberação. A técnica GAS antissolvente obteve partículas com menor tamanho médio e menor distribuição, já o perfil de liberação em ambos os métodos foi semelhante.

Figura 5 - Fluxograma esquemático do GAS



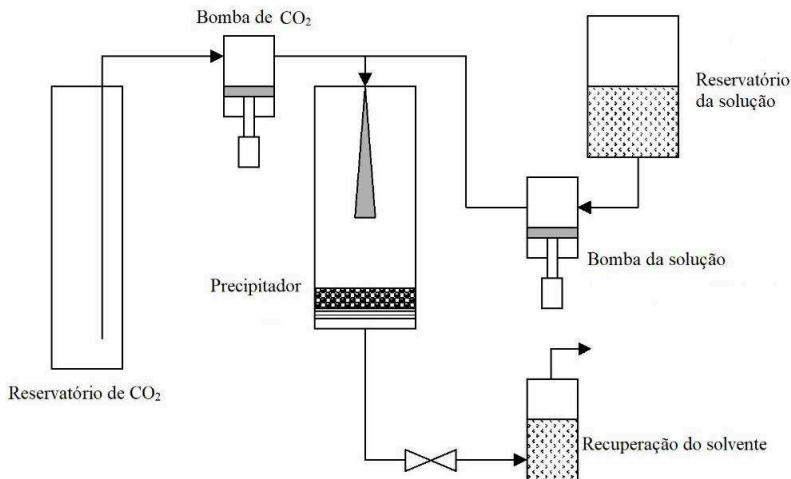
Fonte: adaptado de MARTÍN; COCERO (2008)

Outra metodologia antissolvente é o SAS, esse método vem para superar a principal deficiência do método GAS, ser um método em batelada. Partindo dos mesmos princípios dos métodos antissolvente, ele se aproveita da alta solubilidade do  $\text{CO}_2$  a altas pressões em solventes orgânicos, saturando assim a solução e levando a precipitação das partículas (MARTÍN; COCERO, 2008b).

Diferente do método GAS, onde a solução é colocada na câmara e em seguida é bombeada o fluido supercrítico, com o SAS o fluido é bombeado para a câmara e quando a pressão de trabalho é alcançada, a

solução é pulverizada por meio de um bocal para dentro da câmara, conforme a Figura 6 (JUNG; PERRUT, 2001).

Figura 6 - Fluxograma esquemático do SAS

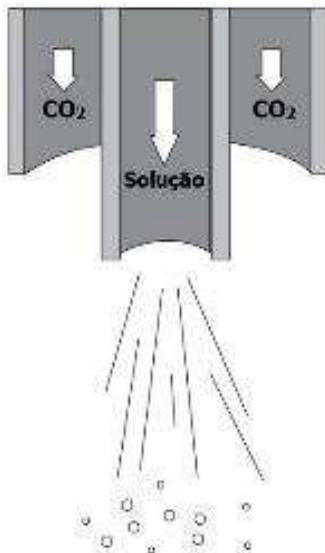


Fonte: adaptado de MARTÍN; COCERO (2008)b

Uma adaptação do processo SAS, o método de dispersão de solução aumentada por fluido supercrítico (SEDS), tem como diferencial a maneira com o contato entre a solução e o fluido supercrítico é feito, diferentemente do SAS, onde as amostras entram por locais diferentes no mesmo sentido ou em sentidos opostos, no SEDS a entrada do fluido supercrítico e da solução é feita por um bocal coaxial, conforme a Figura 7 (YEO; KIRAN, 2005).

Assim, o fluido supercrítico tem não apenas a função de atuar como antissolvente, mas também de levar a solução para a câmara. Esse contato induz a formação de pequenas gotículas de solução e rápida nucleação das partículas.

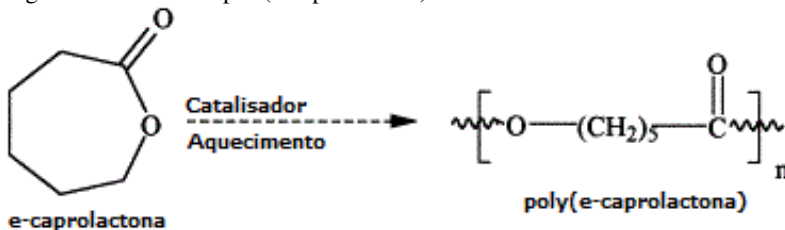
Figura 7 - Esquema do bico coaxial do SEDS



Fonte: adaptado de KALANI; YUNUS (2011)

## 2.4 POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA)

Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) é um polímero de poliéster alifático, semicristalino, hidrofóbico obtido a partir da polimerização da abertura do anel da  $\epsilon$ -caprolactona, conforme Figura 8. Apresenta baixa temperatura de fusão (55-60 °C) e facilidade de formar *blends* com outros polímeros (NAIR; LAURENCIN, 2007).

Figura 8 - Síntese da poli( $\epsilon$ -caprolactona)

Fonte: MIDDLETON; TIPTON (2000)

Os polímeros de poliéster alifático são degradados pela hidrólise da ligação éster, essa degradação é lenta por isso faz com que ele seja utilizado na liberação de fármacos. Outras características como não toxicidade e alta permeabilidade a uma grande variedade de fármacos também auxiliam nessa função (NAIR; LAURENCIN, 2007; SINHA et al., 2004).

Esse polímero tido como biodegradável é degradado por bactérias e fungos, mas não em animais e humanos, devido a falta de enzimas necessárias para essa função. Nesses casos, eles são degradados hidroliticamente o que faz com que o processo de degradação leve mais tempo (VERT, 2009).

A poli( $\epsilon$ -caprolactona) é solúvel em tolueno, benzeno, diclorometano, clorofórmio, 2-nitropropano, tetracloreto de carbono a temperatura ambiente, tem baixa solubilidade em acetona, 2-butanona, dimetilformamida e acetonitrila e é insolúvel em álcool, éter de petróleo e éter etílico (SINHA et al., 2004).

Apesar de chamar a atenção por sua qualidade, a PCL foi substituída por polímeros reabsorvíveis como poliacido láctico (PLA), usados em aplicações onde uma liberação de dias ou semanas era necessária e uma reabsorção completa de 2 a 4 meses. Porém, a PCL ressurge como uma alternativa para um novo campo, a engenharia de tecidos devido ser mais barato em comparação a outros poliésteres alifáticos e já ser aprovado pela FDA em vários sistemas de liberação de medicamentos (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Choi et al. (2010) encapsularam óleo de peixe em  $\beta$ -ciclodextrina pelo método de agregação e em PCL pelo método de emulsão-difusão. Foram obtidos eficiência maiores que 84% para  $\beta$ -ciclodextrina e maiores que 99% para PCL. As partículas de  $\beta$ -ciclodextrina foram mais estáveis quando secas por liofilização com relação as nano partículas de PCL, porém uma liberação a PCL conseguiu retardar a liberação do óleo de

peixe. Assim concluíram que a PCL é melhor para proteger o óleo de peixe devido sua insolubilidade a água.

Guilherme et al. (2014) estudou a diferença no método de secagem de emulsões durante a produção de partículas de PCL contendo progesterona. Foram utilizados o método de secagem a temperatura ambiente e uma secagem de emulsão com CO<sub>2</sub> supercrítico. Foram produzidas partículas com tamanho manométrico e a técnica utilizando CO<sub>2</sub> obteve partículas com menor tamanho e estreita distribuição de tamanho

Liu et al. (2012) utilizou PCL para formação de microesferas carregadas de lipossomos como sistema de liberação de flurbiprofeno. As microesferas foram produzidas pelo método de dupla emulsão e foi observado que uma maior concentração de PCL leva a partículas com maior diâmetros e eficiência, porém uma liberação mais lenta. Já um aumento na concentração de lipossomos leva a uma melhor eficiência de retenção.

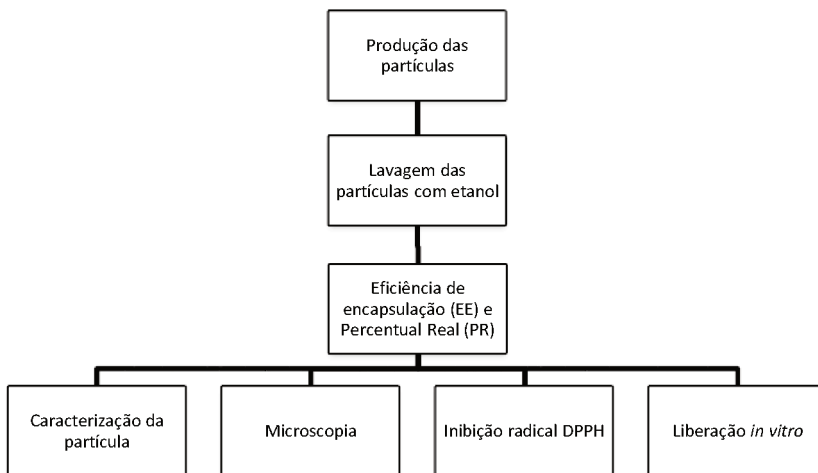
### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Serão apresentados nessa seção a metodologia completa e os materiais utilizados na encapsulação de trans-resveratrol em poli( $\epsilon$ -caprolactona) em dióxido de carbono supercrítico. As análises foram realizadas no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC), na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos e no Laboratório de Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Testes preliminares foram realizados para obtenção de partículas a partir de SEDS, PGSS e GAS. Porém, somente a metodologia GAS foi efetiva na produção de coprecipitados. Escolhido o método, foi então estabelecido um planejamento composto central  $2^2$  com triplicata no ponto central para estudos das variáveis pressão e razão massa de trans-resveratrol e massa de poli( $\epsilon$ -caprolactona) na eficiência de encapsulação e característica das partículas.

O melhor resultado obtido na eficiência de encapsulação foi a amostra escolhida para caracterização, conforme a Figura 9.

Figura 9 - Fluxograma de realização dos experimentos



Fonte: desenvolvido pelo autor

### 3.1 ESPECIFICAÇÕES DOS MATERIAIS E DO PROCESSAMENTO

Para a realização dos experimentos os seguintes reagentes foram utilizados:

- Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (White Martins S. A., pureza de 99,9% em fase líquida);
- Acetona (Neon, pureza de 99,5%);
- Trans-resveratrol, comercial em pó, Jiaherb Phytochem Batch: Chz20150504, China, com pureza de 99%, adquirido da SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA, Brasil;
- Poli(ε-caprolactona) (PCL) M<sub>n</sub> 80,000, M<sub>w</sub> / M<sub>n</sub> > 2, Sigma-Aldrich.

### 3.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DO PROCESSO DE COPRECIPITAÇÃO

No trabalho foram investigados os parâmetros pressão e razão mássica segundo o planejamento composto central 2<sup>2</sup> com triplicata no ponto central, conforme a Tabela 1.

As demais variáveis do processo foram escolhidas com base em trabalhos já realizados pelo grupo de pesquisa (AGUIAR et al., 2018; BOSCHETTO et al., 2014; DAL MAGRO et al., 2017) :

- Temperatura de operação da câmara de precipitação: 35 °C;
- Massa de amostra na câmara de precipitação: 600 mg (RSV+PCL);
- Vazão de entrada de CO<sub>2</sub>: 10 mL·min<sup>-1</sup>;
- Volume de solvente: 10 mL (Acetona);
- Pressão na alimentação: 200 bar;
- Volume de solvente na secagem: 500 mL (CO<sub>2</sub>).

Tabela 1 - Fluxograma de realização dos experimentos

Variável	Níveis		
	-1	0	1
Pressão (bar)	100	120	140
Razão mássica (trans-resveratrol: poli( $\epsilon$ -caprolactona))	1:3	1:2	2:3

Fonte: desenvolvido pelo autor

### 3.3 UNIDADE EXPERIMENTAL DE PRECIPITAÇÃO

As partículas foram produzidas no LATESC, localizado no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC.

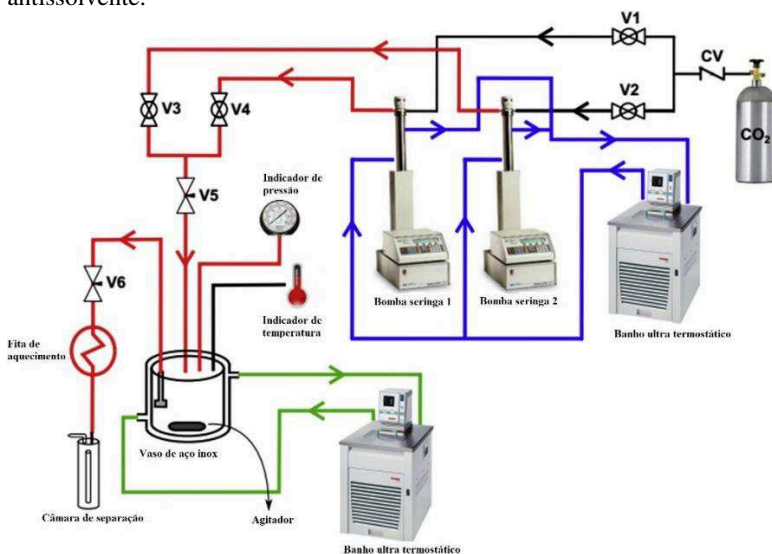
Um esquema do equipamento está demonstrado na Figura 10, que é composta por:

- Um cilindro de CO<sub>2</sub>;
- CV: válvula de sentido único (Check-Valve marca Hip, modelo 15-41AF1-T, pressão de operação de até 1034 bar);
- V1 e V2: válvula esfera (marca Swagelok, modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar e temperatura ambiente);
- Banho ultra termostático de recirculação (marca Nova Ética, modelo 521/2D);
- Bombas de seringa 1 e 2 (marca Isco, modelo 500D, pressão de trabalho de até 258 bar e vazão máxima de 170 mL·min<sup>-1</sup>);
- V3 e V4: válvula esfera (marca Swagelok, modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar e temperatura ambiente);
- V5: válvula métrica tipo agulha (marca HIP, modelo 15-11AF1, pressão de operação de até 1034 bar);
- Vaso de aço inox 316 encamisada com capacidade de 600 mL (diâmetro interno de 8 cm e altura de 12 cm);
- Manômetro para monitoramento da pressão interna da câmara de precipitação (transdutor absoluto – 0 a 250 bar, marca Smar, modelo LD 301);
- Termopar para monitoramento da temperatura interna da câmara de precipitação (Universal, marca Novus, modelo N 1500);
- Banho ultra termostático de recirculação (marca Nova Ética, modelo 512/2D);



- V6: válvula métrica tipo agulha (marca Hoke, modelo 1315G2Y);
- Câmara de separação, recheada com algodão;

Figura 10 - Diagrama esquemático da unidade de precipitação por GAS antissolvente.

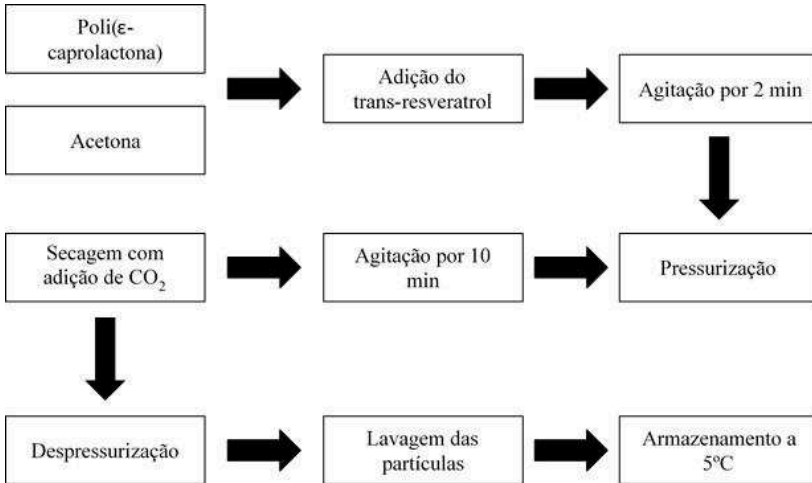


Fonte: adaptado de Pessoa et al. (2018)

### 3.4 MÉTODO DE COPRECIPITAÇÃO DE TRANS-RESVERATROL

A metodologia de GAS antissolvente utilizada na coprecipitação das partículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo trans-resveratrol foi baseada nos estudos de Pessoa et al. (2018); Yesil-Celiktas; Cetin-Uyanikgil (2012) e realizada conforme a figura 11.

Figura 11 - Fluxograma experimental



Fonte: o autor

A poli(ε-caprolactona) segundo o planejamento experimental, foi dissolvido em acetona e levemente aquecido para completa diluição do polímero no solvente, em seguida a solução foi resfriada e então adicionado o trans-resveratrol e deixado agitar por 2 min para homogeneização da solução.

Na montagem da câmara de precipitação, na parte destinada a saída de CO<sub>2</sub> foi colocado uma membrana e como suporte um filtro de politetrafluoretileno, esse conjunto tem como função impedir o arraste das partículas pelo CO<sub>2</sub>, durante a despressurização do sistema.

A solução é então injetada na câmara de precipitação e em seguida a câmara é fechada. São conectados a tampa um termopar, um manômetro, o conector de entrada e saída de CO<sub>2</sub>. Ao vaso de precipitação são conectadas as mangueiras de circulação para manter a temperatura de operação do experimento.

Em seguida as bombas de alta pressão são carregadas com CO<sub>2</sub> e mantida a uma temperatura de 5 °C por um banho de recirculação. As válvulas V3, V4 e V5 são abertas para injetar CO<sub>2</sub> na câmara de precipitação afim de equilibrar a pressão do sistema com a pressão do cilindro.

Com o sistema em equilíbrio as válvulas V1, V2, V3, V4 e V5 são fechadas e as bombas são pressurizadas até 200 bar, essa pressurização cria um gradiente de pressão e evita refluxos da câmara para a linha.

As válvulas V3, V4 e V5 são abertas para controlar a entrada de CO<sub>2</sub> pressurizado na câmara de precipitação por meio de uma serpentina

imersa no banho termostático, que se encontra na temperatura de operação, para manter a temperatura do sistema constante. Essa entrada de CO<sub>2</sub> ocorre a uma vazão de 10 mL·min<sup>-1</sup>.

Quando a pressão de operação é alcançada, as válvulas V3, V4 e V5 são fechadas, assim encerrando a injeção de CO<sub>2</sub> na câmara, e a pressão é mantida por 10 min para que ocorra a mistura do sistema CO<sub>2</sub> + acetona + PCL + RSV.

Em seguida é realizado a secagem das partículas com CO<sub>2</sub>, onde a válvula V3, V4 e V5 são abertas para injetar CO<sub>2</sub> na câmara ao mesmo tempo em que a V6 é aberta para a retirada do CO<sub>2</sub>, essa etapa ocorre mantendo-se a pressão de operação, a amostra é lavada com 500 mL de CO<sub>2</sub>.

Após a secagem das partículas, a câmara é então despressurizada até pressão atmosférica, com o fechamento da V3, V4 e V5, mantendo-se aberta apenas a V6, então as conexões são retiradas e a câmara aberta para a coleta das partículas.

As partículas coletadas foram então lavadas com solução de etanol 1%, e agitação por 30 s. Essa etapa tem como objetivo a retirada do trans-resveratrol não encapsulado, mas possivelmente aderido à superfície da partícula para que o mesmo não fosse contabilizado nas análises. Após a lavagem, a amostra foi então filtrada e deixada por 24 h a temperatura ambiente para secar.

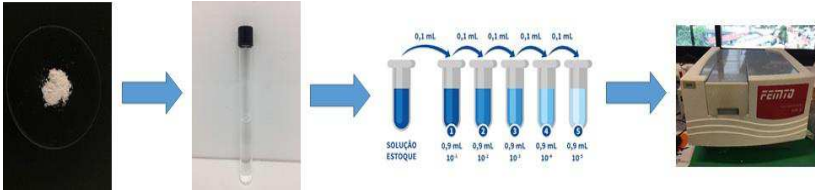
As amostras foram então armazenadas a 5 °C até a realização das análises.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) E PERCENTUAL REAL DE ENCAPSULAÇÃO (PR)

Os percentuais de encapsulação (PR) assim como a eficiência de encapsulação (EE) foram determinados segundo Franceschi et al. (2008) e Dal Magro et al. (2017), conforme a figura 12.

As análises se baseia em um método espectrofotométrico, onde as partículas são dissolvidas em solvente e em seguida é feita a quantificação da massa de composto precipitado a partir da curva padrão, apresentado na figura 13.

Figura 12 - Fluxograma esquemático da eficiência e percentual real



Fonte: o autor

Para a determinação do PR e EE, 10 mg de amostra foram medidas e em seguida as amostras foram dissolvidas em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), solvente capaz de solubilizar tanto a poli( $\epsilon$ -caprolactona) como o trans-resveratrol. Diluições decimais foram feitas e as amostras foram analisadas em espectrofotômetro de UV-Vis 8000XI FEMTO no comprimento de onda de 320 nm.

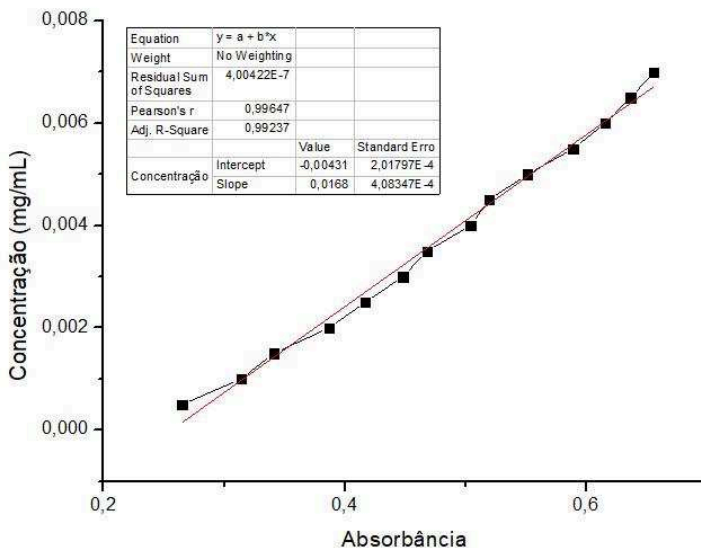
As absorbâncias foram então comparadas com a curva padrão de trans-resveratrol e o valor da concentração foi obtido. Em seguida foram calculados o percentual teórico de encapsulação (PTE), percentual real de encapsulação (PR) e eficiência de encapsulação (EE) segundo as equações:

$$PTE (\%) = \frac{\text{massa de resveratrol}}{\text{massa de resveratrol} + \text{massa PCL}} \times 100$$

$$PR(\%) = \frac{\text{massa de resveratrol encapsulado}}{\text{massa de partícula}} \times 100$$

$$EE (\%) = \frac{PR}{PTE} \times 100$$

Figura 13 - Curva padrão de trans-resveratrol



Fonte: o autor

### 3.6 MORFOLOGIA E TAMANHO DE PARTÍCULA

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Confocal foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para a realização do MEV foi utilizado microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM6390LV (MEV), Estados Unidos.

As amostras para análises do MEV foram alocadas em fita de carbono dupla face sobre suporte metálico, em seguida recobertas com uma camada de ouro sob vácuo e então analisadas.

Micrografias foram realizadas das amostras que obtiveram melhor eficiência de encapsulação utilizando tensão de 10 kV com zoom de 150 a 2000 vezes. O tamanho das partículas foi obtido a partir das micrografias utilizando o software Size Meter versão 1.1, medindo o comprimento das partículas nas melhores condições.

### 3.7 MICROSCOPIA CONFOCAL

A microscopia confocal de fluorescência foi utilizada para a detecção da presença e a forma como as partículas foram encapsuladas. As amostras para análise foram escolhidas a partir das melhores eficiências de encapsulação e percentual real. As amostras foram depositadas sobre as lâminas e cobertas com as lamínulas e em seguida observadas em microscópio Leica DMI60000B com filtro UV.

### 3.8 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho foi realizada na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos utilizando um equipamento AGILENT TECHNOLOGIES – Cary 600 Series FTIR Spectrometer. A análise foi utilizada para verificar se houve mudança na estrutura do trans-resveratrol causada pela encapsulação.

A análise foi realizada com a trituração da amostra seguida de prensagem e a caracterização por FTIR foi realizada no comprimento de onda de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$

### 3.9 INIBIÇÃO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRIHIDRAZIL (DPPH)

A atividade antioxidante das partículas precipitadas foi avaliada quanto a capacidade da inibição do radical 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH) segundo o método descrito por Mensor et al. (2001), com o propósito de verificar se houve perda no poder antioxidante do trans-resveratrol ocasionado pelo processo. Trans-resveratrol puro também foi analisado para efeitos de comparação.

A solução de DPPH foi utilizada na concentração de 120  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e amostra em várias concentrações. A solução reagiu por 30 min na ausência de luz. A absorbância foi lida a 517 nm.

O percentual da atividade antioxidante (AA%) foi calculado pela equação abaixo:

$$AA [\%] = 100 - \{ [ (Ab_{\text{amostra}} - Ab_{\text{branco}}) \times 100 ] / Ab_{\text{controle}} \}$$

Plotou-se um gráfico de atividade antioxidante por concentração e a partir da regressão linear o valor do EC<sub>50</sub> foi obtido, valor esse que determina a concentração necessária para reduzir em 50% a concentração do radical DPPH.

### 3.10 LIBERAÇÃO *IN VITRO*

As análises de liberação das partículas foi baseado nos trabalhos de Dal Magro et al. (2017) e Pessoa et al. (2018), onde as melhores condições foram levadas para serem avaliadas em dois meios diferentes de liberação.

Os meios utilizados foram uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M e uma solução tampão fosfato pH 6,8, tais meios foram escolhidos por simularem as condições do sistema gástrico e do pH fisiológico, respectivamente (DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010).

As análises foram realizadas em vasos termostatizados a 37 °C com agitação magnética. Alíquotas de 1 mL foram retiradas dos meios em tempos estabelecidos, que eram repostos com meios puros mantendo assim o volume constante. As alíquotas foram filtradas em filtro 0,45 µm e em seguida feita a leitura em espectro (800XI FEMTO) com comprimento de onda de 320 nm.

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A fim de observar a influência das variáveis estudadas sobre os parâmetros percentual real de encapsulação e eficiência de encapsulação, a análise estatística dos resultados foi realizado no software Statistica versão 10 para Windows.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção os resultados obtidos a partir da produção das partículas pela técnica GAS antissolvente de coprecipitado de trans-resveratrol em poli( $\epsilon$ -caprolactona) serão apresentados e discutidos.

### 4.1 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) E PERCENTUAL REAL DE ENCAPSULAÇÃO (PR)

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos para eficiência de encapsulação e percentual real de encapsulação com dados para pressão e razão mássica. As amostras foram produzidas conforme os parâmetros apresentado na seção 4.2 e metodologia na seção 4.4

Tabela 2 - Dados de percentual real e eficiência de encapsulação para partículas

Amostra	Pressão	Razão	PR (%)	EE (%)
		Mássica RSV:PCL		
1	100	2:3	42,79	64,26
2	140	2:3	65,31	98,46
3	100	1:3	27,87	85,71
4	140	1:3	25,18	78,53
5	120	1:2	47,05	94,67
6	120	1:2	51,61	99,34
7	120	1:2	47,30	96,76

Fonte: elaborado pelo autor

Podemos observar que todos os valores de EE são superiores a 64% chegando até 99%, o que demonstra ser um método eficiente na encapsulação de partículas.

Os melhores valores de PR foram obtidos na amostra 6 e 2 com 51,61 e 65,31% respectivamente. Consequentemente com essas amostras foram obtidos os melhores valores para EE, sendo 99,34% e 98,45% respectivamente. Diante destes resultados essas amostras foram as selecionadas para a continuação das análises.

As partículas da amostra 6 foram produzidas com razão mássica com 1:1 de trans-resveratrol:poli( $\epsilon$ -caprolactona) e pressão de 120 bar, já



as partículas da amostra 2 foram obtidas com pressão de 140 bar e razão 1:0,5 de trans-resveratrol:poli( $\epsilon$ -caprolactona).

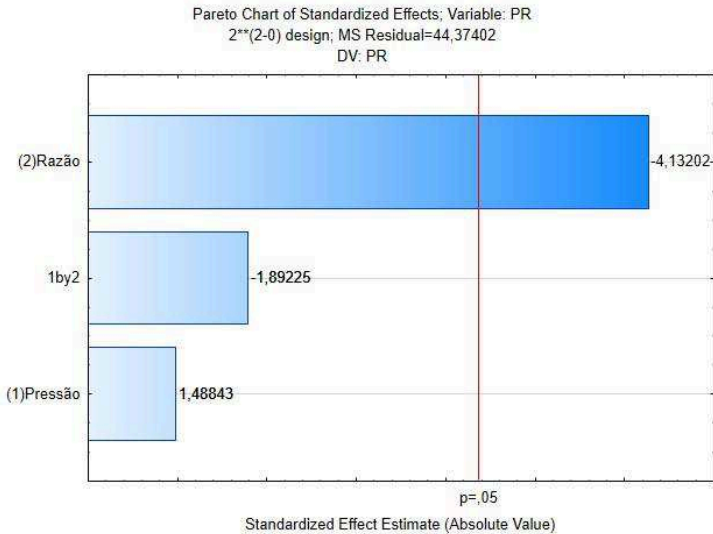
Eficiências de encapsulação maiores que 90% também foram encontrados por Carletto et al. (2016) que produziu partículas de resveratrol em poli( $\epsilon$ -caprolactona) obtidas por deposição interfacial do polímero pré-formado, e obteve eficiências maiores que 97%, com tamanho médio entre 130 e 136 nm, com formato esférico, superfície lisa e regular. Mendes et al. (2012) produziram partículas de resveratrol em poli(3-hidroxiburitato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) e poli( $\epsilon$ -caprolactona) pelo método simples de emulsão, e obtiveram eficiência de 93% com diâmetro médio de 47  $\mu\text{m}$  para partículas de PHBV e eficiência de 101% com diâmetro médio de 52,09  $\mu\text{m}$  para partículas de PCL. Já Dal Magro et al. (2017) produziram partículas de resveratrol em PHBV pelo método SEDS obtendo eficiência de 99,43% e diâmetro de 0,44  $\mu\text{m}$ . Assim os resultados obtidos nesse trabalho são condizentes com a literatura.

Choi et al. (2010) estudaram a encapsulação de óleo de peixe (OP) em poli( $\epsilon$ -caprolactona) e  $\beta$ -ciclodextrina por meio do método de emulsão-difusão. Eles utilizaram razões de 2:1, 2:2 e 2:3 de OP:PCL e também obtiveram maiores quantidade de óleo de peixe nas partículas, em razões de composto maiores que polímero, variando de 33 até 60%.

Na formação de partículas por método antissolvente de quercitina em copolímeros de óxidos de etileno e propileno (pluronic 127) com razão variando entre 1:1,5 até 2:1, onde obteve carregamento de 40 a 56%. Melhores quantidades de composto em partículas formadas também forma encontradas em razões maiores de composto em relação a polímero (FRAILE et al., 2014).

Análises estatísticas foram realizadas para percentual real e eficiência de encapsulação. A influência das variáveis para o percentual real está demonstrado no diagrama de Pareto representado na Figura 14.

Figura 14 - Diagrama de Pareto para o percentual real de encapsulação



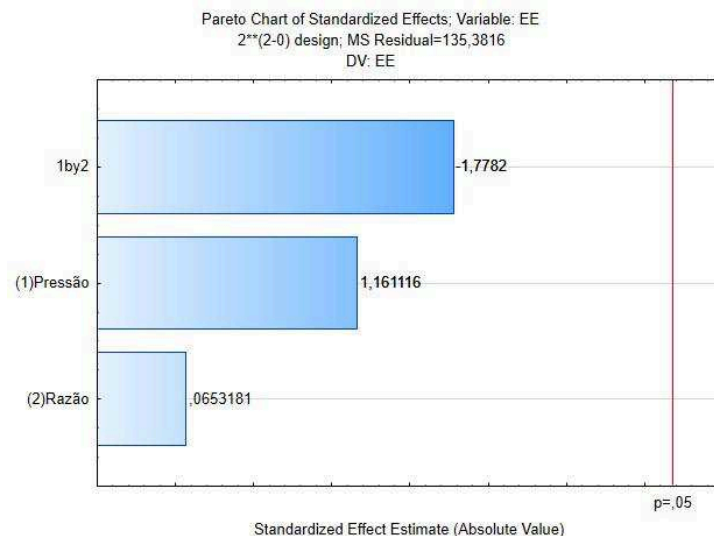
Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise estatística demonstrou que apenas a variável razão de RSV:PCL foi significativa no percentual de encapsulação, com 95% de confiança, e apresentou efeito negativo atestando que uma redução na razão leva a um aumento no percentual real. A variável pressão e interação entre variáveis não foram significativas ao mesmo nível de confiança.

Esse efeito negativo pode ser observado na relação entre as amostras 1 e 3 como nas amostras 2 e 4. Nas amostras 1 e 3 em que foi utilizado uma pressão de 100 bar, a diminuição na massa de polímero em relação a de ativo (2:1 na amostra 3 e 0,5:1 na amostra 1) levou a um aumento de 27,87% no percentual real para 42,79%, o mesmo é observado nas amostras a 120 bar, onde o percentual real de 27,87 foi para 65,31% com a diminuição na massa de polímero.

Para a eficiência de encapsulação a análise estatística ao nível de 95% de confiança apontou que nenhuma das variáveis são significativas como demonstrado no diagrama de Pareto da Figura 15.

Figura 15 - Diagrama de Pareto para eficiência de encapsulação



Fonte: Elaborado pelo autor

Por meio da análise estatística do PR foi possível a obtenção de um modelo preditivo para as partículas produzidas, por meio dos coeficientes de regressão das variáveis. Para que o modelo seja útil seus valores de  $F_{\text{calculado}}$  devem ser 4 a 5 vezes maior que  $F_{\text{tabelado}}$  (BOX; WETZ, 1973). A análise de variância para o percentual real e para a eficiência de encapsulação é apresentada nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Análise de variância para o percentual real de encapsulação

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}}$
Regressão	1014,82	3	338,27	7,62	0,93
Erro	133,12	3	44,37		
Total	1147,94	6			

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = teste de Fisher

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 4 - Análise de variância para a eficiência de encapsulação

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Regressão	611,174	3	203,73	1,50	0,93
Erro	406,15	3	135,38		
Total	1017,31	6			

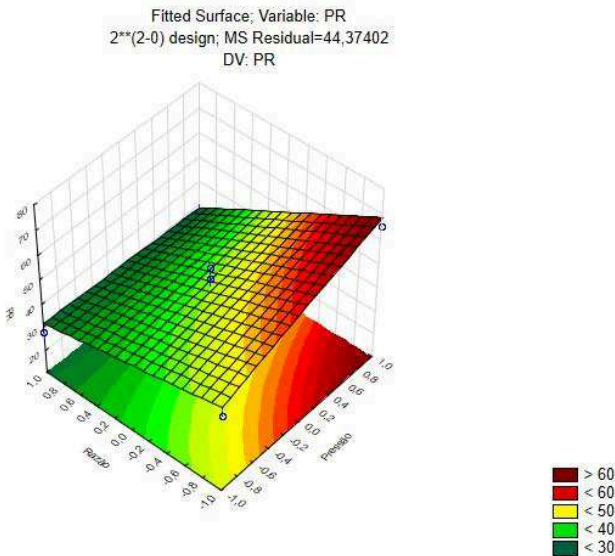
SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = teste de Fisher

Fonte: Elaborado pelo autor

A equação apresenta o modelo matemático para os valores codificados para previsão dos valores de percentual real de encapsulação. Com a validação do modelo foi possível a obtenção de uma superfície de resposta apresentado na Figura 16.

$$PR = 43,87 + (4,95 * P) - (13,76 * R) - (6,30 * P * R)$$

Figura 16 - Superfície de resposta para percentual real de encapsulação



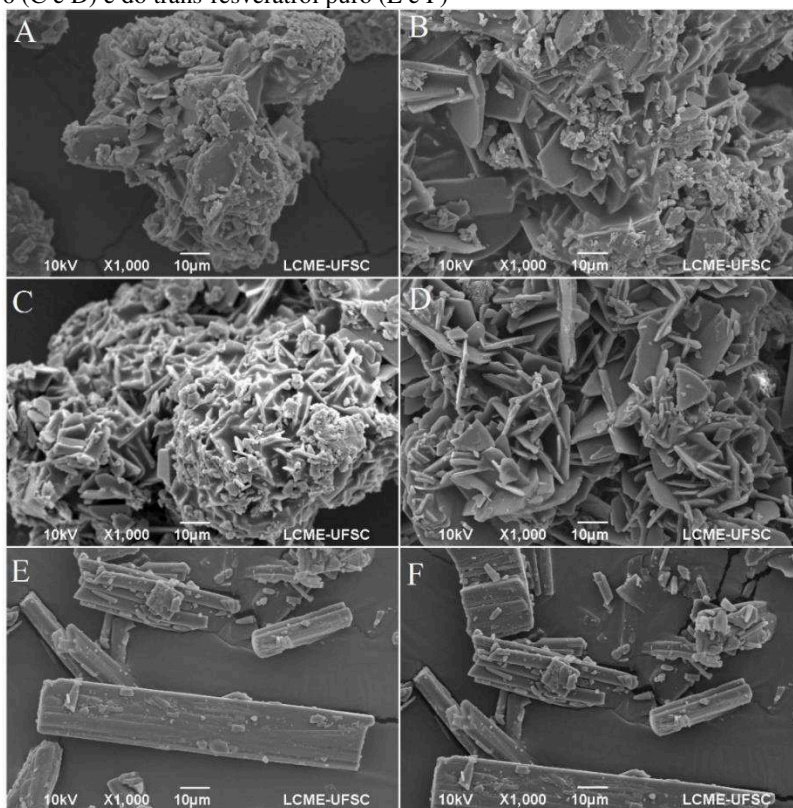
Fonte: Elaborado pelo autor.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

As partículas precipitadas foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura, com aumento entre 500 e 2000 vezes. As análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

As imagens estão representadas na Figura 17, com as melhores amostras e o trans-resveratrol puro.

Figura 17 - Microscopia das partículas da amostra 2 (A e B), partículas da amostra 6 (C e D) e do trans-resveratrol puro (E e F)



Fonte: Elaborado pelo autor

O trans-resveratrol puro apresentou características irregulares com partículas de tamanho variado. As partículas da amostra 2 e 6

apresentaram morfologia diferente da morfologia do fármaco puro, com formato irregular e distribuição heterogênea.

Essa diferença entre a morfologia do composto precipitado com quantidade maior e menor de polímero e do composto puro, pode ser atribuída ao fato de que o composto pode ter se dissolvido no solvente e sofrido cristalização durante o processo, resultando em produtos diferentes, e essas características podem afetar a morfologia final (WANG et al., 2006).

A medida do tamanho das partículas foi realizada por meio da maior medida característica, seja comprimento ou espessura que se apresentasse como maior características. (DAL MAGRO et al., 2017). As medidas de menor tamanho ( $X_{\min}$ ), maior tamanho ( $X_{\max}$ ) e tamanho médio ( $X_{\text{médio}}$ ) das partículas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Medidas do tamanho das partículas produzidas e resveratrol puro

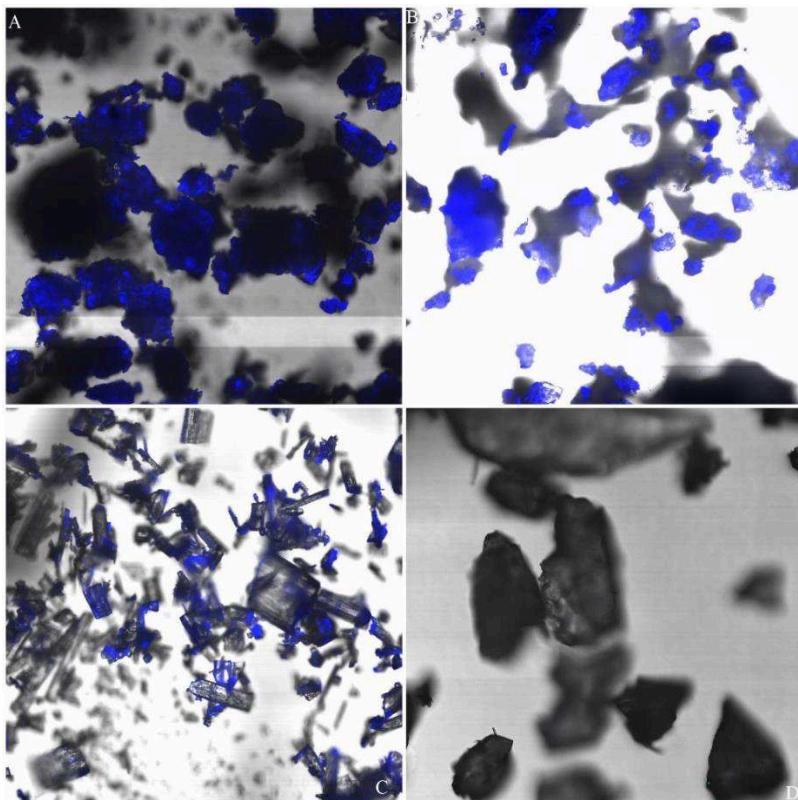
Amostra	$X_{\min}(\mu\text{m})$	$X_{\max}(\mu\text{m})$	$X_{\text{médio}} \pm \sigma (\mu\text{m})$
2	19,87	301,23	103,61 $\pm$ 52,13
6	24,42	419,68	135,58 $\pm$ 76,49
Trans-resveratrol	10,26	188,73	53,4 $\pm$ 25,59

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DAS PARTÍCULAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL

A microscopia confocal foi utilizada para verificar a forma e presença do trans-resveratrol nas partículas. Microscopias das partículas das amostras 2 e 6 foram realizadas, assim como do composto puro e do polímero puro como controles. As imagens são representadas na Figura 18.

Figura 18 - Microscopia confocal da amostra 2(A), amostra 6 (B), trans-resveratrol (C) e poli( $\epsilon$ -caprolactona) (D). As imagens foram feitas com aumento de 20 vezes, e sobreposição de campos claros e escuros, com a fluorescência em luz azul



Fonte: Elaborado pelo autor

É possível observar que o composto apresenta fluorescência, diferentemente do polímero que com a sobreposição de campos não apresenta fluorescência. Assim todos os pontos fluorescentes nas partículas precipitadas são indícios de presença de trans-resveratrol.

Logo as partículas precipitadas como demonstrado na figura, tanto da amostra 2 como da amostra 6, apresentam a presença de trans-resveratrol nas partículas.

Apesar do trans-resveratrol estar presente nas partículas, podemos observar que esse não se encontra no interior de capsulas, mas sim uniformemente distribuído pela matriz polimérica. E não foi possível constatar diferença na disposição do composto nas diferentes condições.

#### 4.4 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier foi realizada a fim de analisar possíveis alterações na estrutura das moléculas causadas pelo uso de altas pressões.

Os espectros das partículas formadas nas melhores condições e os espectros do trans-resveratrol puro e poli( $\epsilon$ -caprolactona) são apresentados na Figura 19.

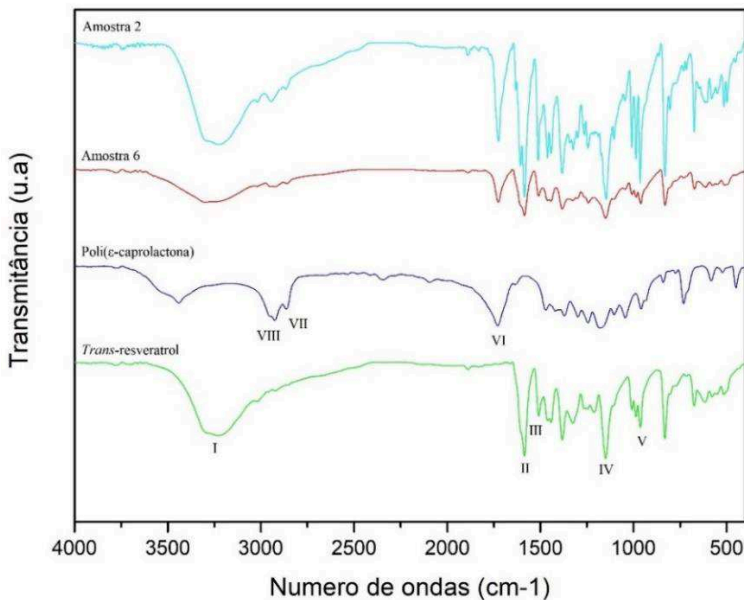
A molécula de trans-resveratrol apresenta a vibração da deformação do grupamento  $\text{-OH}$  na banda  $3230\text{ cm}^{-1}$ , em  $1600\text{ cm}^{-1}$  o alongamento da dupla  $\text{C-C}$  aromático, na banda  $1510\text{ cm}^{-1}$  o estiramento da ligação  $\text{C-C}$ , o alongamento da ligação  $\text{C-O}$  em  $1384\text{ cm}^{-1}$  e na banda  $965\text{ cm}^{-1}$  o carbono olefínico característico da conformação trans (SHI et al., 2008). As bandas intensas citadas representam os algarismos I, II, III, IV e V na figura.

A poli( $\epsilon$ -caprolactona) tem suas bandas características em  $1734\text{ cm}^{-1}$ ,  $2860\text{ cm}^{-1}$  e  $2920\text{ cm}^{-1}$  representando respectivamente a deformação da ligação  $\text{C=O}$ , as vibrações assimétricas e simétricas do grupamento  $\text{CH}_2$  (MENDES et al., 2012; POLETTO et al., 2007). Essas bandas representam os algarismos VI, VII e VIII na figura.

Para as partículas formadas apresentam as mesmas bandas observadas tanto para o trans-resveratrol, quanto para a poli( $\epsilon$ -caprolactona). Assim é possível concluir que nenhuma ligação química foi formada entre o composto e o polímero durante o processo de encapsulação.



Figura 19 - Espectros do FTIR para poli( $\epsilon$ -caprolactona), trans-resveratrol, e das partículas formadas.



Fonte: elaborado pelo autor

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DE INIBIÇÃO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRIHIDRAZIL (DPPH)

Com o intuito de observar se a capacidade antioxidante do composto foi alterada devido ao processamento, foi realizada a análise da inibição do radical DPPH.

A análise da atividade antioxidante do composto foi realizada pelo método de inibição do radical DPPH, os resultados para as melhores partículas assim como para o trans-resveratrol puro, estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Amostras codificadas com respectivos valores de EC<sub>50</sub>

Amostra	EC <sub>50</sub> (µg/mL)
2	32,72 ± 0,16 <sup>b</sup>
6	32,34 ± 0,02 <sup>b</sup>
Trans-resveratrol	34,43 ± 0,40 <sup>a</sup>

\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente (p>0,05).

Fonte: elaborado pelo autor

Os resultados estão expressos em EC<sub>50</sub>, valor referente a concentração necessária para que se diminua 50% da concentração inicial do radical DPPH. Sendo assim quando menor o valor do EC<sub>50</sub> maior será a atividade antioxidante

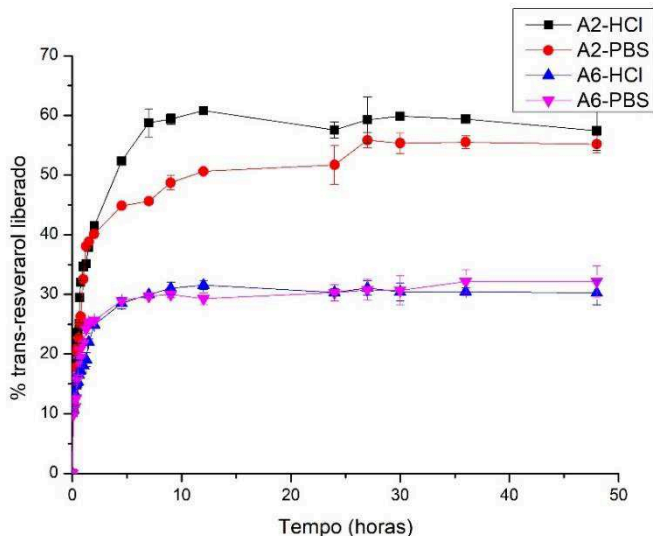
A partir dos valores de EC<sub>50</sub> podemos observar que a característica antioxidante do composto foi preservada. É possível observar que houve um pequeno aumento na atividade antioxidante do composto em ambas as amostras.

Esse aumento na atividade antioxidante pode ser atribuído a mudanças na morfologia das partículas que alterou a área de reação. Resultados de aumento da atividade antioxidante também foi observada com partículas de resveratrol precipitadas em PHBV (DAL MAGRO et al., 2017).

#### 4.6 COMPORTAMENTO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

A análise da cinética de liberação *in vitro* do trans-resveratrol a partir das partículas formadas está demonstrado na Figura 20. As amostras 2 e 6 foram selecionadas por demonstrarem os melhores resultados de percentual real e eficiência de encapsulação. As análises foram realizadas nos meios HCl 0,1M e tampão fosfato (PBS) pH 6,8 no período de 0 a 48h.

Figura 20 - Cinética de liberação *in vitro* do trans-resveratrol.



Fonte: elaborado pelo autor

As amostras apresentam um *burst* inicial de 30% nas primeiras 9 horas para a amostra 6, já para a amostra 2 esse *burst* é ainda maior, chegando a 50% em PBS e 60% para HCl. Pode-se notar que para a amostra 2 o percentual liberado é muito similar em ambos os meios de liberação durante toda a análise, indicando que esse fator não alterou a velocidade da cinética de liberação. Sosa et al. (2011) na encapsulação de chá verde em poli( $\epsilon$ -caprolactona) por antissolvente supercrítico obteve uma liberação acelerada nas primeiras 4 h com liberação constante de 30% durante 90 h em tampão fosfato.

Podemos observar que a amostra 2 com menor quantidade de polímero obteve uma liberação maior que a amostra 6, que contém uma quantidade maior de polímero, isso demonstra que a quantidade de polímero altera a cinética de liberação, e que uma maior quantidade retarda a liberação do fármaco.

Essa rápida liberação inicial está ligada a moléculas de composto fracamente ligados à superfície do polímero ou misturados nas camadas

superficiais (NATARAJAN et al., 2011). Com o passar do tempo mais caminhos para a liberação dos compostos encapsulados são formados na matriz polimérica fazendo com que o fluxo seja mais rápido (YESIL-CELIK TAS; CETIN-UYANIKGIL, 2012).

## 5 CONCLUSÕES

O processo de encapsulação pela técnica de GAS antissolvente foi capaz de produzir partículas com eficiência de encapsulação de até 99,34% e um percentual real de encapsulação de até 65,31%. A análise estatística indicou que apenas a variável razão mássica entre o trans-resveratrol e poli( $\epsilon$ -caprolactona) foi significativa no percentual real de encapsulação, já na eficiência nenhuma das variáveis se mostrou significativa. Onde uma razão de composto maior de polímero obteve melhores valores de percentual real de encapsulação.

As partículas com maiores valores de eficiência de encapsulação e percentual real de encapsulação demonstraram nas micrografias um formato irregular e distribuição heterogênea em ambos os casos, com seu tamanho médio variando entre 103 até 135  $\mu\text{m}$  para as amostras e o composto puro com tamanho médio de 53  $\mu\text{m}$ . As análises de confocal mostraram a presença do resveratrol em ambas as condições.

Com relação à estrutura da molécula, as análises demonstraram que o processamento não alterou o composto e entre o ativo e o polímero não houve formação de ligação química. A atividade antioxidante do trans-reveratrol foi conservada mesmo após o processamento.

A liberação demonstra uma rápida liberação nas primeiras 5 h, em seguida a liberação se torna constante durante o período de 48 h, apresentado potencial para liberação controlada.

Com isso foi possível encapsular com sucesso com nova técnica implementada no laboratório.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, G. P. S. et al. Micronization of trans-resveratrol by supercritical fluid: Dissolution, solubility and in vitro antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 1–5, 1 fev. 2018.

ALLAN, K. E.; LENEHAN, C. E.; ELLIS, A. V. UV Light Stability of  $\alpha$ -Cyclodextrin/Resveratrol Host - Guest Complexes and Isomer Stability at Varying pH. **Australian Journal of Chemistry**, v. 62, n. 8, p. 921, 13 ago. 2009.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 493–506, 26 jun. 2006.

BOSCHETTO, D. L. et al. Encapsulation of bixin in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 22–29, 1 set. 2014.

BOX, G. E. P.; WETZ, J. Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function. (No. UWISDS-73-9) **University of Wisconsin-Madison, Department of Statistics**, 1973.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1–2, p. 21–33, 1 mar. 2005.

CARLETTO, B. et al. Resveratrol-loaded nanocapsules inhibit murine melanoma tumor growth. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 144, p. 65–72, 1 ago. 2016.

CHOI, M.-J. et al. Physical characteristics of fish oil encapsulated by  $\beta$ -cyclodextrin using an aggregation method or polycaprolactone using an emulsion–diffusion method. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1694–1703, 15 abr. 2010.

COCERO, M. J. et al. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 3, p. 546–555, 1 jan. 2009.

CORREA, M. et al. Extraction of inflorescences of *Musa paradisiaca* L. using supercritical CO<sub>2</sub> and compressed propane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 113, p. 128–135, 1 jul. 2016.

DAL MAGRO, C. et al. Co-precipitation of trans-resveratrol in PHBV using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids technique. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 127, p. 182–190, 1 set. 2017.

DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTS, D. J. Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, n. 2, p. 88–103, 1 ago. 2014.

DAVIES, O. R. et al. Applications of supercritical CO<sub>2</sub> in the fabrication of polymer systems for drug delivery and tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 3, p. 373–387, 14 fev. 2008.

DE LA FUENTE BADILLA, J. C. et al. Volume expansion in relation to the gas-antisolvent process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 17, n. 1, p. 13–23, 29 fev. 2000.

ESFANDIARI, N. Production of micro and nano particles of pharmaceutical by supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 100, p. 129–141, 1 maio 2015.

FAGES, J. et al. Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. **Powder Technology**, v. 141, n. 3, p. 219–226, 30 mar. 2004.

FAHIM, T. K. et al. Particle formation and micronization using non-conventional techniques- review. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 86, p. 47–52, 2014.

FRAILE, M. et al. Enhanced delivery of quercetin by encapsulation in poloxamers by supercritical antisolvent process. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 11, p. 4318–4327, 2014.

FRANCESCHI, E. et al. Precipitation of  $\beta$ -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 2, p. 259–269, 1 dez. 2008.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66, n. 8, p. 663–673, 14 jan. 2000.

GUILHERME, M. R. et al. Polycaprolactone nanoparticles containing encapsulated progesterone prepared using a scCO<sub>2</sub> emulsion drying technique. **Materials Letters**, v. 124, p. 197–200, 1 jun. 2014.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136–148, 1 jan. 2006.

JUNG, J.; PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. . 1 ago. 2001, p. 179–219.

KALANI, M.; YUNUS, R. Application of supercritical antisolvent method in drug encapsulation: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1429–1442, 2011.

KNEZ et al. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v. 77, p. 235–243, 1 dez. 2014.

KNEZ, Z.; WEIDNER, E. Particles formation and particle design using supercritical fluids. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 7, n. 4–5, p. 353–361, 2003.

LANGCAKE, P.; PRYCE, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. **Physiological Plant Pathology**, v. 9, n. 1, p. 77–86, 1 jul. 1976.

LIU, M. et al. Preparation, characterization and properties of liposome-loaded polycaprolactone microspheres as a drug delivery system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 395, p. 131–136, 5 fev. 2012.

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

MARTÍN, A.; COCERO, M. J. Precipitation processes with supercritical fluids: Patents review. **Recent Patents on Engineering**, v. 2, n. 1, p. 9–20, 2008a.

MARTÍN, A.; COCERO, M. J. Micronization processes with supercritical fluids: Fundamentals and mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 3, p. 339–350, 14 fev. 2008b.



MENDES, J. B. E. et al. PHBV/PCL microparticles for controlled release of resveratrol: Physicochemical characterization, antioxidant potential, and effect on hemolysis of human erythrocytes. **The Scientific World Journal**, v. 2012, n. c, p. 1–13, 1 maio 2012.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2335–2346, 1 dez. 2000.

MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 4, p. 793–829, 4 nov. 2011.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8–9, p. 762–798, 1 ago. 2007.

NATARAJAN, V. et al. Formulation and Evaluation of Quercetin Polycaprolactone Microspheres for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1, p. 195–205, 1 jan. 2011.

PESSOA, A. S. et al. Precipitation of resveratrol-isoniazid and resveratrol-nicotinamide cocrystals by gas antisolvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, 16 nov. 2018.

POLETTI, F. S. et al. Rate-modulating PHBV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, n. 1–2, p. 70–80, 10 dez. 2007.

RAMSEY, E. et al. Mini-Review: Green sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 6, p. 720–726, 1 jan. 2009.

RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **The Lancet**, v. 339, n. 8808, p. 1523–1526, 20 jun. 1992.

SAITO, M. History of supercritical fluid chromatography: Instrumental development. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 590–599, 1 jun. 2013.

SANNA, V. et al. Development of novel cationic chitosan-and anionic alginate-coated poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled release and light protection of resveratrol. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5501–5516, 2012.

SANSEVERINO, A. M. Síntese orgânica limpa. **Quimica Nova**, v. 23, n. 1, p. 102–107, 2000.

SHARIATI, A.; PETERS, C. J. Recent developments in particle design using supercritical fluids. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 7, n. 4–5, p. 371–383, 1 ago. 2003.

SHI, G. et al. Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, n. 1–2, p. 83–93, 12 fev. 2008.

SIEMANN, E. H.; CREASY, L. L. American journal of enology and viticulture. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 43, n. 1, p. 49–52, 1 jan. 1992.

SIGNORELLI, P.; GHIDONI, R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 8, p. 449–466, 1 ago. 2005.

SINHA, V. R. et al. Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1–23, 18 jun. 2004.

SOSA, M. V. et al. Green tea encapsulation by means of high pressure antisolvent coprecipitation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 3, p. 304–311, 1 abr. 2011.

VERT, M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 2, p. 437–446, 25 fev. 2009.

WANG, Y. et al. The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery. **Powder Technology**, v. 164, n. 2, p. 94–102, 17 maio 2006.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, 1 out. 2010.

YEO, S.-D.; KIRAN, E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 3, p. 287–308, 1 jul. 2005.

YESIL-CELIKTAS, O.; CETIN-UYANIKGIL, E. O. In vitro release kinetics

of polycaprolactone encapsulated plant extract fabricated by supercritical antisolvent process and solvent evaporation method. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 62, p. 219–225, 2012.

YUE, B. et al. Particle encapsulation with polymers via in situ polymerization in supercritical CO<sub>2</sub>. **Powder Technology**, v. 146, n. 1–2, p. 32–45, 30 ago. 2004.