

Daiane Lúcia Boschetto

**ENCAPSULAMENTO DE EXTRATO DE SEMENTE DE UVA,  
ASTAXANTINA E BIXINA UTILIZANDO A TÉCNICA SEDS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Regina Salvador Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Florianópolis  
2013

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

Boschetto, Daiane Lúcia

Encapsulamento de extrato de semente de uva,  
astaxantina e bixina utilizando a técnica SEDS / Daiane  
Lúcia Boschetto ; orientadora, Sandra Regina Salvador  
Ferreira ; co-orientador, José Vladimir de Oliveira. -  
Florianópolis, SC, 2013.

142 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

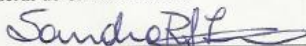
1. Engenharia de Alimentos. 2. Encapsulamento de  
extrato de semente de uva. 3. Encapsulamento de  
astaxantina. 4. Encapsulamento de bixina. 5. Fluidos  
Supercríticos. I. Ferreira, Sandra Regina Salvador. II.  
Oliveira, José Vladimir de . III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos. IV. Título.

**“ENCAPSULAMENTO DE EXTRATO DE  
SEMENTE DE UVA, ASTAXANTINA E BIXINA  
UTILIZANDO A TÉCNICA SEDS”**

Por

**Daiane Lucia Boschetto**

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor 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.



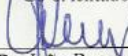
Prof.ª Dr.ª Sandra Regina S. Ferreira

Orientador



Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Co-orientador



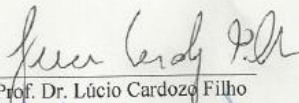
Prof. Dr. João Borges Laurindo

Coordenador

**Banca Examinadora:**



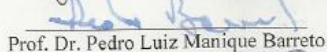
Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira



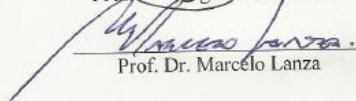
Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho



Prof. Dr. Wagner Luiz Priamo



Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto



Prof. Dr. Marcelo Lanza



Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus

**Florianópolis, 12 de agosto de 2013.**

Este trabalho é dedicado especialmente a meus pais Ilvo e Naide e a meu marido Flaviano que sempre estiveram ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter guiado meus caminhos e me dado força para enfrentar os problemas e conseguir chegar ao final de mais uma etapa importante da minha vida.

Agradeço especialmente aos meus pais Ilvo e Naide, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram nas horas mais difíceis, sem eles nada seria, os amo mais que tudo.

À meu marido Flaviano que é meu companheiro de todas as horas, e prova disso foi sua vinda para Florianópolis comigo, batalhando para conseguirmos nossos objetivos. Meu carinho por ele é enorme e sua paciência foi fundamental, o amo muito. Também a toda sua família que agora é minha também e sempre me deu apoio.

À minha orientadora Sandra R. S. Ferreira pelo apoio, compreensão e pela maneira como nos acolheu, de braços abertos quando viemos para Florianópolis.

À meu orientador José Vladimir de Oliveira, pela maravilhosa orientação, amizade, incentivo e confiança depositada em meu trabalho. Aprendi muito a nível acadêmico e nível pessoal, pois é uma pessoa incrível.

À todos os professores da URI – Campus de Erechim, pelos ensinamentos, amizade, especialmente aos professores Rogério Cansian e Rogério Dallago que foram de fundamental importância pela ajuda e sempre estavam dispostos a discutir sobre o que estava acontecendo nos meus experimentos e analisando os resultados comigo. E a Débora de Oliveira que considero também uma grande professora e amiga.

À todos os professores da UFSC pelos ensinamentos.

À todos os colegas da URI – Campus de Erechim, pela amizade, no nosso cantinho do café, que sempre ficará em minha memória.

Em especial aos colegas que também vieram para Florianópolis, mais conhecidos por “colonada”: Josamaique, Helmut, Mara, Leandro, Daniela, Lindomar, André, Viviane, Luciane, Manuela, Patrícia, Tatiane,

que sempre estão perdidos pela UFSC e foram de grande importância principalmente quando passei por momentos difíceis. Amigos são tudo.

Aos meus amigos Álvaro e Fernanda que mesmo a distância estiveram ao meu lado, apoiando, ligando, vocês são amigos, irmãos para sempre.

À Irede Dalmolin, por toda amizade, paciência, ajuda e por todos os ensinamentos que foram de grande valia para o meu Doutorado.

À todos os colegas do LATESC que agora são meus novos amigos e também me acolheram de braços abertos.

Às alunas Thayla Roratto e Bianca Arcari, alunas de Iniciação Científica, por toda ajuda e amizade.

À vinícola Villa Francioni (São Joaquim, SC) pela matéria prima cedida.

Ao professor Carlos André V. Burkert e ao aluno de Doutorado Francisco R. S. Machado da Universidade Federal de Rio Grande pela parceria em relação ao estudo da astaxantina.

Ao professor Antônio Augusto Ulson de Souza da UFSC pela parceria em relação ao estudo da bixina.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Banca pela Disponibilidade.

Ao LCME pelas análises realizadas.

A UFSC pela estrutura cedida e a todos que de alguma forma me auxiliaram e deram força para realização deste trabalho

O fracasso jamais me surpreenderá se minha decisão de vencer for suficientemente forte.

(Og Mandino, 1968)

## RESUMO

Extrato de semente de uva (ESU), astaxantina e bixina foram encapsulados em um copolímero biocompatível, o poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV), utilizando a técnica de dispersão da solução melhorada por fluidos supercríticos (SEDS). Posteriormente, foi realizada a caracterização das partículas obtidas e o cálculo de eficiência de encapsulamento. Para o ESU foi variada a pressão de precipitação (80 – 120 bar), a razão mássica entre extrato de semente de uva e polímero na solução orgânica (1:1, 1:2 e 1:3) e a temperatura de precipitação (35 – 45 °C). Para a astaxantina foi variada a pressão de precipitação (80-100 bar), concentração de astaxantina na solução orgânica (5, 8 e 10 mg.mL<sup>-1</sup>), e mantidas constantes a temperatura de precipitação (35 °C) e a concentração de PHBV na solução orgânica (20 mg.mL<sup>-1</sup>). Para a bixina foi variadas a pressão de precipitação (80-100 bar), a concentração de bixina na solução orgânica (0,4 - 1 g.L<sup>-1</sup>), temperatura de precipitação (35 e 40 °C) e concentração de PHBV na solução orgânica (1, 2, 5 e 20 mg.mL<sup>-1</sup>). A eficiência de encapsulamento teve o mesmo comportamento para o ESU e astaxantina, onde na menor temperatura (35 °C) e menor pressão (80 bar) e maior concentração dos compostos na solução orgânica foram obtidos os melhores resultados (66% e 48% respectivamente). Já para a bixina a concentração de PHBV na solução orgânica teve maior influência, sendo que em menores concentrações do polímero (1 mg.mL<sup>-1</sup>) foi obtida a maior eficiência de encapsulamento (92%). Dependendo da condição utilizada, foram obtidas partículas esféricas para os três compostos com tamanhos na escala de nano ou micropartículas, variando de 0,5 a 0,7 µm para o ESU, de 0,13 a 0,26 µm para a astaxantina e 0,24 a 0,54 µm para bixina. Estes resultados comprovam a aplicação, viabilidade e versatilidade da técnica para encapsulamento de diferentes materiais com estados físicos variados (sólido, líquido e extrato) o que é de grande importância comercial.

**Palavras-chave:** Extrato de semente de uva. Astaxantina. Bixina. Encapsulamento. Fluidos supercríticos.



## ABSTRACT

Grape seed extract (ESU), astaxanthin and bixin were encapsulated in a biocompatible copolymer, poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV), using the technique of improved by dispersion of supercritical fluids (SEDS). This was followed by the characterization of the particles obtained and calculation efficiency of encapsulation. For the ESU was varied precipitation pressure (80 - 120 bar), the weight ratio of grape seed extract and polymer in the organic solution (1:1, 1:2 and 1:3) and precipitation temperature (35 - 45 °C). For astaxanthin was varied precipitation pressure (80-100 bar), concentration of astaxanthin in the organic solution (5, 8 and 10 mg.mL<sup>-1</sup>), held constant the precipitation temperature (35 °C) and concentration PHBV in organic solution (20 mg.mL<sup>-1</sup>). For bixin were varied precipitation pressure (80-100 bar), concentration of the organic solution bixin (0.4 to 1 g.L<sup>-1</sup>) precipitation temperature (35 to 40 °C) and concentration of the solution PHBV organic (1, 2, 5, 20 mg.mL<sup>-1</sup>). The encapsulation efficiency was the same behavior for the ESU and astaxanthin, where the lowest temperature (35 °C) and lower pressure (80 bar) and higher concentration of the compounds in organic solution the best results were obtained (66% and 48% respectively). As for the concentration of bixin PHBV in organic solution had a greater influence, and in lower concentrations of polymer (1 mg.ml<sup>-1</sup>) was obtained encapsulation efficiency (92%). Depending on the conditions used, esféricas particles were obtained for all three compounds with sizes in the range of nano or microparticles, ranging from 0.5 to 0.7 µm for the ESU, 0.13 to 0.26 µm for astaxanthin, and 0.24 to 0.54 µm for bixin. These results confirm the application feasibility and versatility of the technique for encapsulation of different materials with different physical states (solid, liquid and extract) which is of great commercial importance.

**Keywords:** Grape seed extract. Astaxanthin. Bixin. Encapsulation. Supercritical fluids.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da astaxantina presente na microlaga <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	28
Figura 2 – Estrutura química da (a) cis-bixina e (b) norbixina .....	32
Figura 3 – (a) Estrutura da matriz, microsferas, e (b) Estrutura de reservatório, microencapsulado .....	35
Figura 4 – (a) Diagrama esquemático e (b) fundamentação da técnica RESS .....	40
Figura 5 – (a) Diagrama esquemático e (b) fundamentação da técnica PGSS .....	42
Figura 6 – (a) Diagrama esquemático e (b) fundamentação da técnica GAS. ....	44
Figura 7 – (a) Diagrama esquemático e (b) fundamentação da técnica SAS/ASES .....	45
Figura 8 – (a) Diagrama esquemático e (b) fundamentação da técnica SEDS .....	46
Figura 9 – Estrutura química do (a) PHB e (b) do copolímero PHBV .....	49
Figura 10 – Fluxograma apresentando os passos utilizados para realização deste trabalho .....	55
Figura 11 – Diagrama esquemático do aparato experimental de coprecipitação e encapsulamento utilizado .....	56
Figura 12 – Fotografias (a) Câmara de precipitação conectada a todas as linhas da unidade experimental e (b) Tampa com as cinco entradas .....	58
Figura 13 – Sistema montado com: (1) PEEK Tubing anilhado com o capilar; (2) Conexão tipo T; (3) Tubo inox por onde escoava o antissolvente; (4) Capilar de sílica fundida por onde escoava a solução orgânica .....	59
Figura 14 – (a) Tampa mostrando o suporte onde o filtro é inserido e (b) Filtro da membrana de politetrafluoretileno .....	60
Figura 15 – Vista da unidade experimental de coprecipitação e encapsulamento .....	61
Figura 16 – Curva padrão de absorvância de (a) Extrato de semente de uva na mistura em 410 nm, (b) Astaxantina na mistura em 455 nm e (c) Bixina na mistura em 520 nm, em função das suas concentrações em diclorometano .....	71
Figura 17 – Fotografias de: (a) Extrato de semente de uva bruto; (b) Tampa e Suporte do filtro cobertos de partículas e (c) Câmara de precipitação e encapsulamento aberta com as partículas de ESU + PHBV formadas .....	75

Figura 18 – Micrografias das partículas de extrato de semente de uva em PHBV nas condições de: (a) Experimento 1 – 35°C, 80 bar, relação ESU:PHBV 1:1; (b) Experimento 2 – 35°C, 80 bar, relação ESU:PHBV 1:3; (c) Experimento 3 – 35°C, 120 bar, relação ESU:PHBV 1:1; (d) Experimento 8 – 40°C, 100 bar, relação ESU:PHBV 2:1; (e) Experimento 9 – 40°C, 100 bar, relação ESU:PHBV 1:2 e (f) Experimento 10 – 40°C, 100 bar, relação ESU:PHBV 1:2.....	75
Figura 19 – Micrografias: (a) Experimento 4 – 35°C, 120 bar, relação ESU:PHBV 1:3; (b) Experimento 5 – 40°C, 80 bar, relação ESU:PHBV 1:3; (c) Experimento 6 – 40°C, 80 bar, relação ESU:PHBV 1:2; (d) Experimento 7 – 40°C, 80 bar, relação ESU:PHBV 1:1; (e) Experimento 11* – 40°C, 100 bar, relação ESU:PHBV 1:2, maior secagem; (f) Experimento 12 – 45°C, 80 bar, relação ESU:PHBV 1:1; (g) Experimento 13 – 45°C, 80 bar, relação ESU:PHBV 1:3; (h) Experimento 14 – 45°C, 120 bar, relação ESU:PHBV 1:1 e (i) Experimento 15 – 45°C, 120 bar, relação ESU:PHBV 1:3.....	77
Figura 20 – Diagrama Pressão versus temperatura para uma substância pura, (TP) ponto triplo; (CP): ponto crítico; (Pc) pressão crítica e (Tc) temperatura crítica .....	81
Figura 21 – Experimento na condição de 35°C, 80 bar, relação ESU:PHBV 1:1, na qual houve oscilações: (a) fotografia da câmara de precipitação após experimento com formação de filme polimérico na parte inferior e partículas nas paredes superiores da câmara; (b) fotografia do filme formado e (c) MEV do filme .....	82
Figura 22 – Fotografia da câmara de precipitação isolada termicamente através de uma manta de fibra de vidro.....	83
Figura 23 – Eficiência de encapsulamento em função da temperatura de precipitação e concentração de ESU na solução orgânica: □ 80 bar e concentração de ESU de 1:1, Δ 80 bar e concentração de ESU 1:3; X 120 bar e concentração de ESU 1:1; ♦ 120 bar e concentração de ESU 1:3 .....	87
Figura 24 – Eficiência de encapsulamento em função da pressão de precipitação, □ 35°C e concentração de ESU 1:1; ♦ 40°C e concentração de ESU de 1:2, Δ 45°C e concentração de ESU de 1:1.....	89
Figura 25 – Micrografias (a) Experimento 2 – 35°C, 80 bar, concentração de astaxantina na solução 8 mg.mL <sup>-1</sup> ; (b) Experimento 3 – 35°C, 80 bar, concentração de astaxantina na solução 10 mg.mL <sup>-1</sup> ; (c) Experimento 5 – 35°C, 100 bar, concentração de astaxantina na solução 8 mg.mL <sup>-1</sup> .....	90
Figura 26 – Micrografias (a) Experimento 1 – 35°C, 80 bar, concentração de astaxantina na solução 5 mg.mL <sup>-1</sup> ; (b) Experimento 4 – 35°C, 100 bar,	

concentração de astaxantina na solução 5 mg.mL <sup>-1</sup> ; (c) Experimento 6 – 35°C, 100 bar, concentração de astaxantina na solução 10 mg.mL <sup>-1</sup> .....	91
Figura 27 – Influência da concentração de astaxantina em solução orgânica sobre a eficiência de encapsulamento nas condições fixas de pressão e temperatura: □ 80 bar e 35°C e ♦ 100 bar e 35°C .....	94
Figura 28 – Eficiência de encapsulamento em função da pressão de precipitação nas condições de: □ concentração de astaxantina de 10 mg.mL <sup>-1</sup> , ♦ concentração de astaxantina de 8 mg.mL <sup>-1</sup> .....	95
Figura 29 – Micrografias (FEG) de: (a) Experimento 1 – 35°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,6 g.L <sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL <sup>-1</sup> ; (b) Experimento 2 – 35°C, 100 bar, concentração de Bixina 0,6 g.L <sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL <sup>-1</sup> ; (c) Experimento 3 – 40°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,6 g.L <sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL <sup>-1</sup> ; (d) Experimento 4 – 40°C, 100 bar, concentração de Bixina 0,6 g.L <sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL <sup>-1</sup> ; (e) Experimento 5 – 35°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,8 g.L <sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL <sup>-1</sup> ; (f) Experimento 6 – 35°C, 100 bar, concentração de Bixina 0,8 g.L <sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL <sup>-1</sup> ; (g) Experimento 7 – 40°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,8 g.L <sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL <sup>-1</sup> ; (h) Experimento 8 – 40°C, 100 bar, concentração de Bixina 0,8 g.L <sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL <sup>-1</sup> ; (i) Experimento 9 – 35°C, 80 bar, concentração de Bixina 1 g.L <sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL <sup>-1</sup> ; (j) Experimento 10 – 40°C, 80 bar, concentração de Bixina 1 g.L <sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL <sup>-1</sup> ; (k) Experimento 11 – 35°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,4 g.L <sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL <sup>-1</sup> ; (l) Experimento 12* – 35°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,6 g.L <sup>-1</sup> e PHBV 5 mg.mL <sup>-1</sup> , (m) Experimento 13* – 35°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,6 g.L <sup>-1</sup> e PHBV 2 mg.mL <sup>-1</sup> ; (n) Experimento 14* – 40°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,6 g.L <sup>-1</sup> e PHBV 2 mg.mL <sup>-1</sup> .....	97
Figura 30 – Influência da concentração da bixina e da pressão no tamanho médio das partículas: □ 40°C, 80 bar e concentração de PHBV 20 mg.mL <sup>-1</sup> ; ♦ 35°C, 80 bar e concentração de PHBV 20 mg.mL <sup>-1</sup> ; X 40°C, 100 bar e concentração de PHBV 20 mg.mL <sup>-1</sup> ; Δ 35°C, 100 bar e concentração de PHBV 20 mg.mL <sup>-1</sup> .....	103
Figura 31 – Diagrama esquemático do equipamento proposto para ampliação de produção de nano/micropartículas através do processo SEDS .....	108
Figura 32 – Diagrama exploratório em 3D da unidade para ampliação da produção de micro/nanopartículas mostrando a linha de CO <sub>2</sub> .....	138
Figura 33 – Diagrama exploratório em 3D da unidade para ampliação da produção de micro/nanopartículas mostrando a linha para o princípio ativo .....	138

Figura 34 – Diagrama exploratório em 3D da unidade para ampliação da produção de micro/nanopartículas mostrando a linha de coleta de amostra..	139
Figura 35 – Diagrama exploratório em 3D da unidade para ampliação da produção de micro/nanopartículas mostrando a linha de recirculação de CO <sub>2</sub>	139
Figura 36 – Diagrama exploratório em 3D da unidade para ampliação da produção de micro/nanopartículas mostrando a linha de coleta de solvente .	140
Figura 37 – Diagrama exploratório em 3D da unidade para ampliação da produção de micro/nanopartículas mostrando a linha de ar quente para término da secagem das amostras	140
Figura 38 – Diagrama exploratório em 3D da unidade completa para ampliação da produção de micro/nanopartícula..	141

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições experimentais de coprecipitação do Extrato de semente de uva e PHBV em diclorometano com as variáveis utilizadas ...	66
Tabela 2 – Condições experimentais de coprecipitação da Astaxantina e PHBV em diclorometano com as variáveis utilizadas .....	67
Tabela 3 – Condições experimentais de coprecipitação da Bixina e PHBV em diclorometano com as variáveis utilizadas .....	68
Tabela 4 – Medidas de tamanho mínimo ( $X_{\text{mínimo}}$ ), tamanho máximo ( $X_{\text{máximo}}$ ), tamanho médio ( $\bar{X}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ) e coeficiente de variação (CV) das partículas de ESU e PHBV coprecipitadas .....	84
Tabela 5 – Resultados do percentual real de encapsulamento (PRE) e eficiência de encapsulamento (EE) do extrato de semente de uva encapsulado em PHBV .....	86
Tabela 6 – Medidas de tamanho mínimo ( $X_{\text{mínimo}}$ ), tamanho máximo ( $X_{\text{máximo}}$ ), tamanho médio ( $\bar{X}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ) e coeficiente de variação (CV) das partículas de Astaxantina e PHBV coprecipitadas.....	92
Tabela 7 – Resultados do percentual real de encapsulamento (PRE) e eficiência de encapsulamento (EE) da Astaxantina obtida da microalga <i>H. pluvialis</i> .....	94
Tabela 8 – Medidas de tamanho mínimo ( $X_{\text{mínimo}}$ ), tamanho máximo ( $X_{\text{máximo}}$ ), tamanho médio ( $\bar{X}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ) e coeficiente de variação (CV) das partículas de Bixina e PHBV coprecipitadas .....	101
Tabela 9 – Resultados do percentual real de encapsulamento (PRE) e eficiência de encapsulamento (EE) da coprecipitação da bixina e PHBV utilizando diclorometano como solvente e CO <sub>2</sub> como antissolvente .....	105

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO<sub>2</sub> = Dióxido de Carbono;  
ESU = Extrato de semente de uva;  
DCM = Diclorometano;  
DMSO = Dimetilsulfóxido;  
ESD = Espectroscopia por Dispersão de Energia;  
FSC = Fluido Supercrítico;  
GAS = Gás Antissolvente;  
MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura;  
FEG = Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução  
P = Pressão (bar);  
T = Temperatura (°C);  
T<sub>c</sub> = Temperatura crítica;  
P<sub>c</sub> = Pressão crítica;  
TP = Tamanho de partícula;  
DTP = Distribuição de tamanho de partícula;  
PCA = Precipitação com Antissolvente Comprimido;  
PGLA = Poli(DL- lactídeo -co- glicolídeo);  
PGSS = Partículas a Partir de Soluções Saturadas de Gás;  
PHB = Poli (hidroxibutirato)  
PHBV = Poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato);  
RESS = Rápida Expansão de Soluções Supercríticas;  
SAS = Antissolvente Supercrítico;  
SCFE = Extração de Emulsões com Fluidos Supercríticos;  
H<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> = Ácido nítrico;  
SEDS = Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos.  
EFS = Extração por Fluidos Supercríticos  
PEG = Polietilenoglicol  
PRE = Percentagem real de Encapsulamento  
EE = Eficiência de Encapsulamento  
IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
EAFUS = do Inglês “Everything Added to Food in the United States”  
GRAS = do Inglês “Generally recognized as safe”  
FDA = do Inglês “Food and Drug Administration”  
DPPH = 1,1-difenil-2-picrilidrazil  
OH = Hidroxila  
C=O = ceto  
C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub> = Fórmula química da Astaxantina  
C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub> = Fórmula química da *Cis*-Bixina  
C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub> = Fórmula química da Norbixina

ROS = Espécies reativas de oxigênio  
NNI = Iniciativa Nacional de Nanotecnologia  
CO<sub>2</sub>-SC = Dióxido de Carbono Supercrítico  
SAS = Antissolvente supercrítico  
DSF = Deferasirox  
ASES = Sistema de Extração de Solvente em Aerosol  
SWOT = do Inglês “strengths, weaknesses, opportunities and threats”  
QO<sub>2</sub>/M = Vazão de CO<sub>2</sub>/massa da matéria prima  
SCWO = Tecnologia de oxidação da água supercrítica  
HPLC = Cromatografia Líquida de alta Eficiência  
GC = Cromatografia Gasosa  
SFEE = Extração de emulsões com fluido supercrítico  
X<sub>mínimo</sub> = Tamanho mínimo  
X<sub>máximo</sub> = Tamanho máximo  
 $\bar{X}$  = Tamanho médio  
 $\sigma$  = Desvio padrão  
(CV%) = Coeficiente de variação



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>19</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1. OBJETIVOS .....	21
1.1.1. Objetivo geral .....	21
1.1.2. Objetivos específicos .....	21
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>23</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
2.1. EXTRATOS DE SEMENTE DE UVA .....	23
2.2. CAROTENOIDES .....	26
2.2.1. Astaxantina.....	27
2.2.2. Bixina .....	31
2.3. PRECIPITAÇÃO E ENCAPSULAMENTO DE PARTÍCULAS ....	33
2.4. FORMAÇÃO DE MICRO E NANOPARTÍCULAS .....	33
2.5. EMPREGO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS .....	36
2.6. FORMAÇÃO DE MICRO E NANOPARTÍCULAS EMPREGANDO FLUIDOS PRESSURIZADOS .....	39
2.6.1. Fluidos Supercríticos como solvente .....	39
2.6.2. Fluidos Supercríticos como soluto.....	41
2.6.3. Fluidos Supercríticos como antissolventes GAS/SAS/PCA/ASES/SEDS/SFEE .....	43
2.7. MATERIAIS UTILIZADOS COMO AGENTES ENCAPSULANTES .....	47
2.8. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS ENCAPSULADOS ....	50
2.9. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE .....	51
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>53</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
3.1. ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS E PROCESSAMENTO ...	53
3.2. UNIDADE EXPERIMENTAL DE COPRECIPITAÇÃO E ENCAPSULAMENTO DOS DIVERSOS PRINCÍPIOS ATIVOS .....	56
3.3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE NANO/MICROPARTÍCULAS E ENCAPSULAMENTO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS .....	61
3.4. SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS UTILIZADAS .....	64
3.5. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS.....	69
3.6. DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL REAL DE ENCAPSULAMENTO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTOo ...	70
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>74</b>

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO .....	74
4.1.1. Caracterização das partículas e Eficiência de Encapsulamento do Extrato de semente de uva .....	74
4.1.2. Caracterização das partículas e Eficiência de Encapsulamento da Astaxantina .....	90
4.1.3. Caracterização das partículas e Eficiência de Encapsulamento da Bixina .....	96
4.2. PROPOSTA EXPLORATÓRIA PARA AMPLIAÇÃO DE PRODUÇÃO DE NANO/MICROPARTÍCULAS.....	107
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>110</b>
<b>5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....</b>	<b>110</b>
5.1. CONCLUSÕES .....	110
5.2. SUGESTÕES.....	111
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>112</b>
<b>6. PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DECORRENTE DA EXECUÇÃO DESTE TRABALHO.....</b>	<b>112</b>
6.1. PATENTE DE INOVAÇÃO .....	112
6.2. TRABALHOS PUBLICADOS/SUBMETIDOS EM PERIÓDICOS .....	112
6.3. TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS .....	113
<b>CAPÍTULO 7 .....</b>	<b>114</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>114</b>
<b>APÊNDICE A - DIAGRAMAS ESQUEMÁTICOS EM 3D DA UNIDADE PROPOSTA PARA AMPLIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICRO E NANOPARTÍCULAS.....</b>	<b>138</b>

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

Os nanomateriais vêm ganhando espaço nos diversos setores industriais que buscam constantemente melhorar a qualidade dos seus produtos, aprimorando técnicas de produção associada à demanda por tecnologias “limpas”. A nanociência e a nanotecnologia têm crescido a passos largos, com grande potencial de contribuição em muitas áreas, inclusive na saúde humana, trazendo benefícios em vários segmentos (SAHOO et al., 2007).

Neste sentido, a formação de micro e nanopartículas surge como alternativa ao desenvolvimento de novos materiais com o propósito de aumentar a taxa de dissolução de materiais pouco solúveis em água, modificar as propriedades de superfície das partículas e proteger a estabilidade dos materiais incorporados (BAHRAMI et al., 2007).

Tais características podem ser obtidas pelo processo de microencapsulamento, onde geralmente emprega-se um biopolímero como agente encapsulante (KALOGIANNIS et al., 2006). Dentre os biopolímeros destaca-se o poli (3-hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV) que possui estrutura química similar aos polímeros sintéticos biodegradáveis mais usuais (POUTON; AKNTAR, 1996).

O encapsulamento pode ser realizado por diversas técnicas, que podem envolver processos convencionais, os quais são bem conhecidos e estudados, além de novas tecnologias como a utilização de fluidos supercríticos.

O uso de fluidos supercríticos surge como alternativa aos processos convencionais motivados pela exploração das suas características peculiares especialmente do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) que é o fluido supercrítico mais utilizado para processos de precipitação (COCERO et al., 2009). Ele é versátil, não é tóxico nem inflamável, quimicamente inerte, barato e suas condições supercríticas são relativamente brandas (temperatura crítica ( $T_c$ ) =  $31,1^\circ\text{C}$ , pressão crítica ( $P_c$ ) = 73,8 bar) (NALAWADE et al., 2006).

Esta tecnologia apresenta algumas vantagens como a formação de micro e/ou nanopartículas, estreita distribuição de tamanho das partículas formadas, boa eficiência de encapsulamento, alta pureza dos produtos, controle do polimorfismo dos cristais, possibilidade de processar moléculas termossensíveis, processo de um único estágio e tecnologia limpa (FAGES et al., 2004).

Neste sentido, esta tecnologia pode ser empregada para proteção e aplicação de vários tipos de materiais como extratos vegetais, antioxidantes e carotenoides, já que os mesmos apresentam grande instabilidade frente a condições ambientais e armazenamento.

Em relação aos extratos vegetais, os extratos de semente de uva (ESU) estão se tornando populares como suplementos nutricionais que possuem atividade antioxidante e antimicrobiana e os estudos sobre eles têm crescido desde que seus efeitos positivos na saúde humana foram demonstrados (YILMAZ et al., 2011). A literatura recente tem evidenciado os efeitos antioxidantes do extrato de semente de uva tanto *in vivo* quanto *in vitro* (YILMAZ; TOLEDO, 2004) devido aos flavonoides presentes na sua composição. Outro fator interessante tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental, é que sua extração é realizada a partir das sementes de uva, subproduto da indústria do vinho, sendo geralmente utilizado como alimento animal ou simplesmente depositado no ambiente (PASSOS et al., 2010).

Ainda em se tratando de antioxidantes, pode-se destacar os carotenoides como a bixina e astaxantina, que além de serem utilizados como corantes, apresentam efeitos benéficos na saúde devido à alta capacidade antioxidante.

A bixina é extraída das sementes de urucum e apresenta  $\delta$ -tocotrienóis que auxiliam na diminuição do colesterol, doenças cardiovasculares e no tratamento de câncer (TAN; FOLEY, 2002; TAN, 2005). Já a astaxantina pode ser obtida de microalgas verdes como a *Haematococcus pluvialis* e tem atraído interesse considerável devido à sua grande atividade antioxidante, que é considerada 10 vezes maior que outros carotenoides como zeaxantina, luteína, cantaxantina,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol (KOBAYASHI; SAKAMOTO, 1999; NAGUIB, 2000; MIKI, 1991).

No entanto, os extratos de semente de uva, bem como, os carotenoides bixina e astaxantina são com frequência muito instáveis frente às condições ambientais, podendo sofrer degradação oxidativa, além de apresentar baixa solubilidade em água. Por isso, novas formas mais eficazes para sua utilização devem ser obtidas (FLORIS et al., 2010; HSIEH et al., 2006).

A maioria dos processos com fluidos supercríticos foi originalmente desenvolvida para a produção de compósitos sólidos, mas com algumas modificações, algumas delas podem ser utilizadas para obtenção de compósitos sólido-líquidos, como microcápsulas carregadas com óleo essencial ou extratos (MARTIN et al., 2010). No entanto, a

literatura versa poucos estudos que apresentam resultados relacionados com a tecnologia de encapsulamento de um material volátil (extratos) pela técnica de fluidos supercríticos. Por exemplo, Varona et al. (2010) utilizaram a tecnologia de Partículas a partir de Soluções Saturadas de Gás (PGSS) para produzir partículas de polietilenoglicol (PEG) com óleo essencial de lavanda. Os resultados obtidos pelos autores revelaram eficiência de encapsulamento entre 14 e 66%, entretanto, eles ressaltam que são necessários mais estudos para obter a morfologia adequada para sua utilização.

Em relação ao extrato de semente de uva (ESU) não existem relatos na literatura de seu microencapsulamento. Em relação à bixina e à astaxantina foram encontrados apenas trabalhos que falam sobre sua micronização com fluidos supercríticos e encapsulamento por técnicas convencionais. É com base nesta observação e no crescente interesse das indústrias brasileiras em utilizar novas tecnologias, representando um diferencial na disputa por mercados, aliado com a possibilidade de reutilização de resíduos agroindustriais, que se torna relevante a proposta deste trabalho, cujo objetivo geral e objetivos específicos são apresentados a seguir.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo geral encapsular o extrato de semente de uva, astaxantina e bixina, pela técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS) empregando CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico e PHBV como agente encapsulante.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

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

- Encapsulamento do extrato de semente de uva (ESU) extraído de resíduos da indústria do vinho, astaxantina extraída da microalga *Haematococcus pluvialis* e bixina comercial, utilizando a técnica de Dispersão de

Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS) e poli(3-hidroxi-butarato-co-hidroxi-valerato) (PHBV) como agente encapsulante;

- Analisar a morfologia das partículas de ESU, astaxantina e bixina coprecipitadas em PHBV através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (FEG);
- Determinar o tamanho e distribuição de tamanho de partículas do ESU, astaxantina e bixina coprecipitadas em PHBV utilizando diclorometano como solvente e CO<sub>2</sub> como antissolvente;
- Determinar o Percentual real de encapsulamento (PRE) e a Eficiência de encapsulamento (EE) do ESU, astaxantina e bixina encapsuladas em PHBV;
- Verificar a influência da temperatura, quantidade de CO<sub>2</sub> para secagem, pressão e concentração do ESU, no processo de encapsulamento;
- Propor, em caráter exploratório, um projeto para aumento de escala de produção de nano/micropartículas utilizando a técnica SEDS.

## CAPÍTULO 2

### 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma breve revisão bibliográfica a respeito dos materiais empregados para o desenvolvimento desta tese e métodos que empregam CO<sub>2</sub> como antissolvente na precipitação e encapsulamento de diversos materiais, bem como outras técnicas atualmente propostas na literatura científica que utilizam a tecnologia supercrítica para a formação de partículas.

#### 2.1 EXTRATOS DE SEMENTE DE UVA

*Vitis vinífera*, conhecida como videira é nativa da Europa e Ásia Ocidental (NASSIRI-ASL; HOSSEINZADEH, 2009). Sua produção é difundida em todo mundo chegando a superar 68 milhões de toneladas (FAOST). No Brasil a vitivinicultura representa uma atividade importante para sustentabilidade da pequena propriedade e vem se tornando importante também na geração de emprego em grandes empreendimentos, que produzem uvas de mesa e uvas para processamento. De acordo com os dados estatísticos disponíveis no portal do IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - a produção de uvas no Brasil em 2012 foi de 1.433.649 toneladas, sendo o Rio Grande do Sul o principal produtor de uvas e vinhos.

As sementes da uva são uma parte importante do bagaço, que corresponde de 38 - 52% da matéria seca. Anualmente mais de três milhões de toneladas de sementes de uva são descartados em todo o mundo (MAIER et al., 2009), podendo se tornar um problema ambiental (FREITAS et al., 2008; LUTTERODT et al., 2011).

Do ponto de vista ecológico, o aproveitamento total de uvas, incluindo a semente, é um aspecto importante na redução de resíduos (PESCHEL et al., 2006), se tornando um campo promissor contribuindo para reduzir os custos de produção, aumentar a renda do produtor além de criar novos produtos para o consumo humano (BAYDAR; OZKAN, 2006).

É neste sentido que a indústria, principalmente a alimentícia, vem sofrendo grandes mudanças procurando desenvolver produtos com qualidade e segurança para atender um mercado cada vez mais exigente.

Uma alternativa que vem surgindo, é a adição de antioxidantes para aumentar a vida útil dos alimentos. Os antioxidantes sintéticos têm

utilização restrita em alimentos pois são suspeitos de serem cancerígenos (MADAVI; SALUNKHE, 1995). Portanto, a importância da busca por antioxidantes naturais, especialmente de origem vegetal, tem aumentado nos últimos anos (JAYAPRAKASHA; JAGANMOHAN RAO, 2000).

As sementes de uva possuem 8-20% de óleo e este óleo contém quantidades elevadas de ácidos graxos insaturados e compostos ricos em antioxidantes (PASSOS et al., 2009). As antocianinas e resveratrol estão localizados principalmente na casca, enquanto que as proantocinidinas ou flavonóides se encontram na semente (YANG et al., 2009). Por isso, as aplicações do óleo da semente de uva têm aumentado em produtos farmacêuticos, médicos, cosméticos e indústria de alimentos.

Os extratos de semente de uva (ESU) estão se tornando populares como suplementos nutricionais que possuem atividade antioxidante. Comercialmente já existem extratos de semente de uva vendidos como suplemento dietético listados no “*Everything Added to Food in the United States (EAFUS)*”, no *Generally Recognized as Safe (GRAS)* e aprovado pela *Food and Drug Administration (FDA)* (PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011).

Segundo Katiyar (2008), o ESU pode ser considerado um dos nutrientes naturais mais poderosos sendo eficiente na proteção e saúde da pele. As proantocinidinas contidas nas sementes possuem maior atividade antioxidante e ação contra os radicais livres que o ácido ascórbico e vitamina E. Essas propriedades antioxidantes são principalmente devido aos flavonóides que desativam os radicais livres (superóxido, hidroxila e 1,1-difenil-2-picrilidrazil) (SATO et al., 1996; SOOBRAATTEE et al., 2005; JACOB et al., 2008).

A literatura tem relatado também os efeitos farmacológicos e terapêuticos, tais como: anti-inflamatórios (CHAO et al., 2011; PAN et al., 2011), anticarcinogênico (DINICOLA et al., 2012), antimicrobiano (SU; D'SOUZA, 2011), hepatoprotetor (KHALIFA et al., 2011), cardioprotetor (YALCIN et al., 2010), neuroprotetor (BALU et al., 2006) além de impedir a trombose e reduzir o colesterol (CAO et al., 2003). Estudos em laboratório indicam também que o ESU apresenta uma toxicidade mínima aplicado em longo prazo (BENTIVEGNA; WHITNEY, 2002; YAMAKOSHI et al., 2002).

Os métodos para a extração de compostos fenólicos da semente de uva incluem o uso de metanol (BAILH et al., 1992; FULEKI et al., 1997; KHORASSANI et al., 2004), etanol (PALMA et al., 1999; FIORI et al., 2009; VATAI et al., 2009) e acetona (VERNHET et al., 1996) em temperaturas e tempos diferentes de extração. A extração do óleo de



semente de uva inclui muitas fases diferentes, como limpeza da biomassa, secagem, trituração e prensagem. Por meio da aplicação do processo de prensagem grande parte do óleo presente na semente pode ser extraído, no entanto, uma quantidade considerável de óleo permanece na torta resultante, o qual pode ser extraído com hexano, que deverá ser evaporado após o processo (FIORI, 2007).

Outro método que está sendo amplamente estudado é a extração com fluido supercrítico (EFS), pelas suas propriedades únicas sobre os procedimentos de extração convencionais, como ausência de luz e ar, que podem causar a degradação dos compostos fenólicos e ácidos graxos insaturados (YLMAZ et al., 2011). Floris et al. (2010) e Dalmolin et al. (2010) realizaram extração de compostos dos resíduos da uva utilizando fluido supercrítico onde obtiveram extrato com alto poder antioxidante, assim como Yilmaz et al. (2011) realizaram extração com dióxido de carbono supercrítico de proantocianidinas das sementes da uva. Eles observaram que esta técnica se torna interessante pois em diferentes condições de pressão e temperatura é possível a obtenção de um determinado composto que é extraído conforme sua polaridade.

Oliveira et al. (2013) estudaram o rendimento global e atividade antimicrobiana de extratos do bagaço da uva extraídos por EFS e métodos convencionais. Segundo os autores, apesar de serem obtidos menores rendimentos através da técnica de EFS, os extratos obtidos apresentaram atividade antimicrobiana para quase todos os microorganismos testados, ao contrário dos extratos obtidos pelas técnicas convencionais, onde não houve ação antimicrobiana.

Contudo, o ESU, como a maioria dos extratos, é quimicamente instável e suscetível à deterioração oxidativa quando exposto a condições ambientais. Nesta deterioração ocorre uma perda de qualidade nutricional, além do desenvolvimento de sabores indesejáveis que afetam a estabilidade de prateleira e as propriedades sensoriais do extrato (CALVO et al., 2010).

Devido a esta instabilidade, se faz necessário a proteção deste extrato para aumentar suas aplicações. Tradicionalmente as formas mais utilizadas para sua proteção incluem formas líquidas (emulsões, micelas, soluções líquidas, etc), formas semi-líquidas (gel, lipossomas, etc) e formas sólidas (microcápsulas ou microcompositos) (MARTÍN et al., 2010).

Atualmente estão surgindo novas técnicas para proteção chamadas de encapsulamento. O mecanismo de proteção ocorre com a formação de uma membrana em torno do material (extrato) encapsulado

podendo ser obtido materiais micro e/ou nanométricos (GOULA; ADAMOPOULOS, 2012).

Em um estudo detalhado, não foram encontrados relatos sobre o encapsulamento de extratos de semente de uva, principalmente relacionado à utilização de tecnologia supercrítica. São encontrados dados referentes ao encapsulamento de outros extratos vegetais como Goula e Adamopoulos (2012) que realizaram o encapsulamento do óleo de romã através de *spray drying* obtendo uma eficiência de encapsulamento de 95%, promovendo uma maior proteção ao óleo. Varona et al. (2013) encapsularam óleo essencial de lavanda por técnicas supercríticas e conseguiram que sua atividade antibacteriana fosse melhorada, além de obter maior proteção do óleo.

Tendo em vista os efeitos benéficos do ESU, sua instabilidade frente a condições ambientais e a falta de trabalhos relacionados a sua proteção, torna-se necessário uma pesquisa relacionada com este intuito. Assim, é possível agregar valor ao produto final, obter a formação de partículas com morfologia definida e controlar a funcionalidade destas. Outro fator que vale ressaltar é a importância econômica e ambiental que isto pode oferecer, já que este extrato é obtido de resíduos da indústria, sendo um futuro promissor para aplicação ou inovação tecnológica deste produto.

## 2.2. CAROTENOIDES

Os pigmentos naturais mais comuns são os carotenoides, especialmente os que possuem coloração vermelha, laranja e amarelo, incluindo caroteno, astaxantina, licopeno, bixina, luteína, entre outros (SHAO; HATHCOCK, 2006; RAO; RAO, 2007).

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis intensamente coloridos sintetizados por plantas e micro-organismos e estão presentes em muitos alimentos, principalmente frutas, legumes e pescado (EL-AGAMEY et al., 2004). Eles constituem um grande grupo de pigmentos presentes na natureza, com mais de 600 tipos diferentes, mas somente 50 destes estão presentes nos alimentos (RIOS et al., 2009, PRIAMO et al., 2010).

O corpo humano não consegue produzir estas substâncias, por isto, elas devem ser introduzidas na dieta humana (MIGUEL et al., 2008), visto que, suas principais funções são a de ser precursor de vitamina A e como agente antioxidante (MIGUEL et al., 2006; MARTIN et al., 2007). Devido a isto seu uso não se limita apenas como

pigmentos, mas também é aplicado na indústria farmacêutica e como suplemento nutricional (GRANADO et al., 2003). Os carotenoides possuem alta atividade antioxidante, por isto, reagem com os radicais livres peróxidos e oxigênio molecular (RIOS et al., 2009).

Na indústria alimentícia, os carotenoides são utilizados principalmente como corantes. Atuam também como precursores de muitos compostos químicos importantes, responsáveis pelo aroma de alguns alimentos, fragrâncias de flores, coloração específica e fotoproteção (SANCHÉZ-CONTRERAS et al., 2000). Outra característica importante é que em pequenas quantidades podem ajudar na prevenção da rápida oxidação dos constituintes dos alimentos (SCHROEDER; JOHNSTON, 1995).

Os carotenoides são altamente insaturados e possuem característica hidrofóbica reduzindo sua biodisponibilidade. Fatores como calor, luz e ácidos ocasionam danos aos seus agentes oxidantes (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006; MARTIN et al., 2007) e seus produtos de oxidação possuem pouca pigmentação, atividade pró-vitaminica A e atividade de sequestro de oxigênio singleto (CHANG et al., 1991).

Sabe-se também que suas aplicações são fortemente dependentes das propriedades físicas, tais como tamanho de partícula, distribuição granulométrica e morfologia de partícula (SUO et al., 2005). No entanto, as partículas de carotenoides com tamanho reduzido são ainda muito mais sensíveis à degradação por apresentarem elevada área superficial. Assim, é desejável o desenvolvimento de técnicas de conservação para evitar a degradação e aumentar a velocidade de dissolução destes compostos em água (MARTIN et al., 2007).

### 2.2.1. Astaxantina

A astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta,\beta'$ -caroteno-4,4'-dione) é um carotenoide (pigmento natural) que pertence a família das xantofilas (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006; YUAN et al., 2008). Esse pigmento pode ser produzido por síntese química ou biotecnológica, porém a forma sintética pode conter configuração diferente da natural, implicando em uma perda na atividade biológica (RODRIGUEZ-SAIZ et al., 2010).

Com relação às fontes naturais de obtenção da astaxantina podemos citar vários micro-organismos como algas verdes (*Haematococcus pluvialis* e *Chlorella zofingiensis*), leveduras

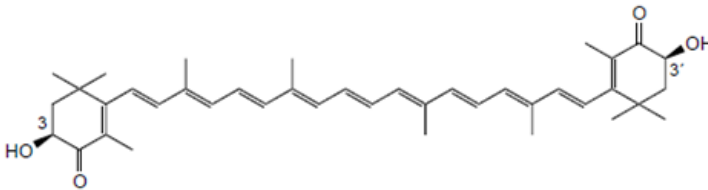
vermelhas (*Phaffia rhodozyma*) e bactérias marinhas (*Agrobacterium aurantiacum*) (YUAN; CHEN, 2000). Além disso, ela é o pigmento responsável pela coloração de certos animais marinhos como o salmão, truta arco-íris, camarão, mariscos e aves, como os flamingos (CHEN et al., 2007; RIBEIRO et al., 2005; PENG et al., 2010).

Nos últimos anos, a astaxantina tem atraído interesse considerável devido à sua grande atividade antioxidante, que é considerada 10 vezes maior que outros carotenóides como zeaxantina, luteína, cantaxantina,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol (KOBAYASHI; SAKAMOTO, 1999; NAGUIB, 2000; MIKI, 1991). Além disso, ela pode ser utilizada como suplemento ou corante em alimentos (ANARJAN et al., 2012).

Seu poder antioxidante pode proteger o corpo humano contra doenças neurodegenerativas, efeitos da luz UV, câncer, melhora do sistema imunológico (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006; ZEB; MEHMOOD, 2004) atingindo cada parte da célula do corpo humano, órgãos e pele (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006).

O potencial antioxidante da astaxantina é conferido por sua estrutura molecular que consiste em hidroxila (OH) e ceto (C=O) em cada anel ionona, além do sistema extenso de duplas ligações conjugadas (HUSSEIN et al., 2006). A Figura 1 mostra a estrutura química da astaxantina (C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>).

Figura 1 – Estrutura química da astaxantina presente na microalga *Haematococcus pluvialis*.



FONTE: Guerin et al. (2003).

Alguns exemplos de sua eficácia são encontrados na literatura incluindo a supressão de tecidos carcinogênicos na bexiga de ratos (TANAKA et al., 1994), inibição do crescimento de tumores de mama (JYONOUCHI et al., 2000), prevenção de estresse oxidativo (TANAKA et al., 1995) e doenças cardiovasculares (SNODDERLY, 1995). Ainda existem relatos contra o envelhecimento, doenças associadas ao envelhecimento, função hepática, coração, olhos, articulações e próstata (GUERIN et al., 2003).

De todas as fontes de onde a astaxantina pode ser produzida, acredita-se que a microalga *Haematococcus pluvialis* é a mais rica do mundo com cerca de 1,5 à 3,0% deste composto (KITTIKAIWAN et al., 2007; GONG; CHEN, 1997; MACHMUDAH et al., 2006).

As microalgas são micro-organismos unicelulares fotossintéticos, que vivem em ambientes salinos ou de água doce, convertendo luz, água e dióxido de carbono em biomassa (MORAIS, 2006). Entre todas as numerosas classes de pigmentos naturais, os carotenoides como a astaxantina, são os mais difundidos e são essencialmente produzidos no fitoplâncton, nas microalgas e em plantas (LORENZ; CYSEWSKI, 2000).

*Haematococcus pluvialis* é uma microalga caracterizada por ser unicelular, flagelada e produzir cistos, os quais são considerados geralmente como uma resposta às condições desfavoráveis do meio. A formação de cistos é frequente e acompanhada por uma mudança da cor verde para alaranjada ou vermelha (GOODWIN, 1992). Outra importante característica deste micro-organismo é produzir astaxantina como principal carotenoide.

A produção/acumulação de astaxantina em *H. pluvialis* é muito recente e induzida em condições de crescimento estressantes. Geralmente é realizada em duas etapas: a primeira consiste em crescer biomassa de *H. pluvialis* em condições propícias ao crescimento rápido em fotobiorreatores fechados; seguido por uma segunda fase em que é induzida a carotenogênese alterando as células em condições ambientais estressantes promovendo a formação do carotenoide. As células ricas em astaxantina são facilmente separadas por decantação e centrifugação (OLAIZOLA; HUNTLEY, 2003).

No entanto, a astaxantina apresenta baixa solubilidade em água além de pouca biodisponibilidade, o que dificulta a absorção pelo corpo humano (ANARJAN et al., 2010). Depois da sua acumulação em *H. pluvialis* o ideal é liberar a astaxantina presente na biomassa através do rompimento da biomassa, aumentando sua disponibilidade para absorção pelo organismo. Pode ser realizada uma ruptura química com dimetilsulfóxido (DMSO) e extração com solvente (FONSECA et al., 2011).

Este rompimento da biomassa para liberação da astaxantina acaba por deixá-la suscetível a degradação devido a sua molécula ser altamente insaturada. Assim, a temperatura, luz, e condições oxidativas podem promover a isomerização da astaxantina na forma *cis* que possui menos atividade biológica do que a sua configuração correspondente

*trans* (HIGUERA-CIAPARA et al., 2004; ZHAO et al., 2005; PU et al., 2011; LEE et al., 2011).

Com a obtenção do produto seco o impedimento da aplicação da astaxantina pela sua instabilidade pode ser superado, utilizando a tecnologia de encapsulamento, ou inclusão da astaxantina em formulações de compostos nutracêuticos (OLAIZOLA; HUNTLEY, 2003; SUH et al., 2007).

O encapsulamento dá proteção e pode aumentar a biodisponibilidade da astaxantina, que é convertida pelo organismo em retinol (forma ativa de vitamina A) (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). Este fator pode ser benéfico em termos de facilidade de absorção, aumento da solubilidade em água e liberação da astaxantina. Além disso, partículas muito pequenas podem penetrar a camada de muco do intestino delgado aumentando assim o tempo de residência no local de absorção (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005; MCCLEMENTS, 2011).

A literatura versa poucos relatos sobre a utilização das técnicas de encapsulamento para melhorar ou proteger a atividade biológica da astaxantina. Kittikaiwan et al. (2007) e Higuera-Ciapara et al. (2004) encapsularam astaxantina em quitosana e sua atividade biológica foi protegida contra a oxidação em condições ambientais. No entanto, mesmo com o encapsulamento os autores observaram uma perda de cerca de 3% da sua atividade antioxidante.

Chen et al. (2007) e Yuan et al. (2008) incorporaram astaxantina em uma matriz de  $\beta$ -ciclodextrina através de complexo de inclusão para aumentar a sua estabilidade contra a temperatura e luz. Yuan et al. (2013) estudaram a estabilidade de armazenamento e atividade antioxidante do complexo astaxantina/hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Os resultados mostraram melhora na estabilidade sob condições de armazenagem a 4°C e 25°C, mas sua atividade antioxidante teve uma pequena diminuição.

Mezzomo et al. (2012) realizaram a precipitação e encapsulamento de astaxantina extraída da casca de camarão, através de tecnologias supercríticas (SAS e SFEE) e conseguiram resultados de eficiência de encapsulamento de até 74%.

Apesar dos estudos citados, pouco progresso tem sido relatado quando se fala em administração oral da astaxantina, características de liberação e estabilidade antioxidante. São necessários mais estudos e utilização de novas técnicas para alcançar os objetivos relacionados.

### 2.2.2. Bixina

A bixina é um pigmento extraído das sementes de urucum *Bixa orellana* L. O urucum é uma pequena árvore nativa das florestas tropicais da América do Sul e Central e ainda cultivada em países da África e Ásia. O Peru é o maior produtor exportador mundial de sementes de urucum, seguido pelo Brasil e Quênia (BALASWAMY et al., 2006).

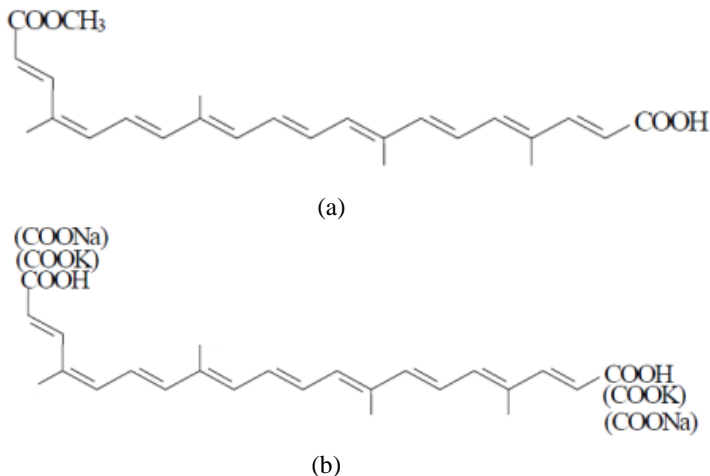
Esta árvore produz frutos com espinhos flexíveis, os quais contêm sementes vermelhas no seu interior. É a partir destas sementes que é produzido um corante vermelho-alaranjado que pode ser utilizado em cosméticos (RAMAMOORTHY et al., 2010) e na indústria alimentícia colorindo produtos de padarias, lácteos, peixes, refrigerantes, carnes entre outros (BARBOSA et al., 2005; RAMAMOORTHY et al., 2010; BALASWAMY et al., 2006). Dos pigmentos contidos nas sementes, mais de 80% são carotenoides como a bixina (metil-hidrogênio 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato) que é um diapocaroteoide com configuração *cis* (PRESTON; RICKARD, 1980).

A bixina é um dos dois mais antigos pigmentos utilizados pelo homem e está cada vez mais sendo procurada como alternativa ao uso de corantes químicos (RAMAMOORTHY et al., 2010). Do ponto de vista econômico a bixina vem ocupando o segundo lugar entre os aditivos coloridos naturais utilizados na indústria, inclusive como alternativa em eletroforese de gel (SIVA et al., 2008).

Existem vários processos para extração da bixina como extração em óleo, com solventes orgânicos, em solução aquosa (BALASWAMY et al., 2006) e ainda a extração supercrítica (NOBRE et al., 2006).

A bixina é um éster monometil dicarboxílico que confere a cor vermelha para as sementes a partir da qual foi extraído (RAMAMOORTHY et al., 2010). Além disso, o pigmento mais importante é a *cis*-bixina que é solúvel em solventes orgânicos polares e insolúvel em água. A forma solúvel em água é a norbixina que é um produto saponificado mantido em sais de sódio ou potássio (PRESTON; RICKARD, 1980). A Figura 2 mostra a estrutura química da *cis*-bixina (C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>) e da norbixina (C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>).

Figura 2 – Estrutura química da (a) cis-bixina e da (b) norbixina.



FONTE: Rios et al. (2009).

O sistema de ligações duplas presentes na estrutura da bixina é responsável não só pela cor vermelha, mas também pela baixa estabilidade da molécula sob condições ambientais e de armazenamento (MONTENEGRO et al., 2004; RIOS et al., 2004).

Por isto, estudos vêm sendo realizados com o objetivo de aumentar a estabilidade da bixina. Um deles foi realizado por Barbosa et al. (2005) que mostraram uma alternativa interessante realizando o encapsulamento da bixina por *spray drying* com goma arábica e maltodextrina. Os autores obtiveram resultados de estabilidade frente a fotodegradação da ordem de 3 a 4 vezes maior que o carotenoide não encapsulado, e ainda 10 vezes maior na ausência de luz.

Além de sua utilização como corante, a bixina ainda está sendo estudada em relação aos efeitos benéficos na saúde. Ela apresenta  $\delta$ -tocotrienóis que auxiliam na diminuição do colesterol, doenças cardiovasculares e no tratamento de câncer (TAN; FOLEY, 2002; TAN, 2005).

Rios et al. (2009) utilizaram o carotenoide bixina extraído de fontes alimentares naturais, na redução de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidos pela interação da cisplatina com o DNA humano. Em uma concentração de 100  $\mu\text{M}$  a bixina inibiu a produção de íons ( $\text{O}_2$ ) em 82% e em 42% a geração de ROS totais. Isto indica que o uso de carotenoides pode modular o metabolismo oxidativo e auxiliar no tratamento de câncer.



Os resultados discutidos tanto em relação à estabilidade quanto a utilização farmacêutica são apenas preliminares, mas muito importantes. Vale lembrar que ainda são necessários mais estudos já que todos os mecanismos de ação dos carotenoides como a bixina não são totalmente conhecidos.

### 2.3. PRECIPITAÇÃO E ENCAPSULAMENTO DE PARTÍCULAS

Quando se fala em encapsulamento de compostos ativos, existem vários métodos, dentre eles pode-se destacar:

1. O composto pode ser encapsulado, situação em que ocorre a formação de uma fina camada de polímero recobrindo o composto. Nesse caso o encapsulamento, também chamado de formação de micro ou nano cápsulas, ocorre quando o material a ser encapsulado é suspenso em uma solução polimérica e, em seguida, o polímero dissolvido é precipitado recobrindo o material em suspensão.
2. O composto pode ser coprecipitado, onde várias partículas do composto encontram-se dentro de uma camada de polímero. A coprecipitação ou formação de micro e/ou nano esferas, ou ainda impregnação, ocorre quando o composto a ser encapsulado e o polímero são dissolvidos em um único solvente ou em uma mistura destes e simultaneamente precipitados (KALOGIANNIS et al., 2006; BAHRAMI; RANJBARIAN, 2007).

Neste último método, de acordo com a literatura, a variável mais importante que afeta a morfologia, a eficiência de encapsulação e o rendimento é a razão entre a concentração do polímero e o composto ativo em solução orgânica (YEO; KIRAN, 2005; MATTEA et al., 2008).

### 2.4. FORMAÇÃO DE MICRO E NANOPARTÍCULAS

A nanotecnologia pode ser definida como a ciência e a engenharia envolvidas na concepção, síntese, caracterização e aplicação de materiais menores e dispositivos cuja organização funcional em pelo menos uma dimensão está na escala do nanômetro (um bilionésimo de

metro) (EMERICH; THANOS, 2003; SAHOO; LABHASETWAR, 2003).

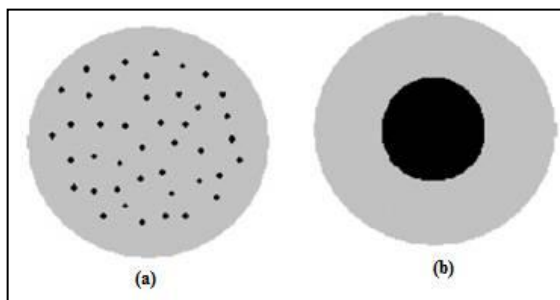
Ela tem crescido a passos largos, e este campo científico multidisciplinar está em desenvolvimento (WILLIAMS, 2004; CHAN, 2006) podendo ajudar em muitas áreas, inclusive na saúde humana, já que, a nanociência e a nanotecnologia têm um enorme potencial para trazer benefícios no desenvolvimento de medicamentos, descontaminação de água, tecnologias de informação e comunicação, e produção de materiais mais leves e fortes (SAHOO et al., 2007).

Em reconhecimento ao enorme potencial científico e comercial da nanotecnologia, os Estados Unidos estabeleceram a Iniciativa Nacional de Nanotecnologia (NNI) em 2000, que é um programa abrangente para construir, caracterizar, e compreender dispositivos em nanoescala. A NNI lista a medicina, indústria, ciências dos materiais, tecnologia de informação, energia e ciências ambientais como alvos beneficiários (ROCO, 2003).

Assim, a nanotecnologia e os nanomateriais vêm ganhando espaço nos diversos setores industriais que sempre estão buscando melhorar a qualidade dos seus produtos, aprimorando técnicas de produção associada à demanda por tecnologias “limpas”.

As micro e nanopartículas são produzidas para muitos propósitos, tais como controlar a liberação do material ativo em uma quantidade desejada, aumentar a taxa de dissolução de materiais pouco solúveis em água e modificar as propriedades de superfície das partículas usadas. Elas são definidas como um núcleo de um material revestido por uma outra fase sólida, denominada estrutura de reservatório (Figura 3). A matriz e as estruturas do reservatório são denominadas por alguns pesquisadores de microesfera e microencapsulado, respectivamente (BAHARAMI; RANJBARIAN, 2007).

Figura 3 - (a) A estrutura da matriz, microsferas, e (b) estrutura de reservatório, microencapsulado



FONTE: Baharami e Ranjbarian, (2007).

A importância da produção de materiais sólidos com propriedades e características específicas se dá em diversos segmentos industriais. Seus benefícios podem ser vistos em catalisadores, materiais cerâmicos, precursores de supercondutores, explosivos, corantes alimentícios, biopolímeros, pigmentos e fármacos, entre outros (MARTÍN et al., 2007).

Um exemplo prático se dá na indústria farmacêutica onde geralmente alguns fármacos apresentam baixa solubilidade aquosa, o que representa um problema significativo no desenvolvimento e aplicação dos medicamentos. Entre várias estratégias para resolver o problema de solubilidade, a redução do tamanho de partículas da droga surge como uma opção eficaz e versátil (LI et al., 2012).

Mas existem alguns fatores chave que determinam a funcionalidade e as propriedades de aplicação de um determinado material sólido micro ou nano particulado, como o tamanho de partícula (TP), a distribuição de tamanho de partícula (DTP), a morfologia e configuração da rede cristalina (LIN et al., 2007).

A produção de partículas com tamanho e distribuição de tamanho controlado, com aplicações em diversas áreas, tem sido alvo de várias pesquisas para o desenvolvimento de nanopartículas de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. Tais investigações são plenamente justificáveis tendo em vista a gama de aplicações destes compostos em formulações de liberação controlada de princípios ativos com aplicação nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticos e herbicidas (YEO; KIRAN, 2005).

Existem muitas técnicas de encapsulamento convencionais para a produção de materiais na faixa micrométrica e/ou nanométrica. Elas podem ser divididas em três classes:

- Processos químicos, como a inclusão molecular ou polimerização interfacial;
- Técnicas físico-químicas como coacervação e encapsulamento em lipossomas;
- E os processos físicos, como *spray drying*, cristalização de coextrusão ou revestimento de leito fluidizado (MARTÍN et al., 2010).

Essas metodologias possuem, porém, algumas limitações, que as restringem em certas aplicações para determinados tipos de materiais. Essas restrições se dão principalmente quando há necessidade de alto grau de pureza dos compostos, controle no tamanho, distribuição de tamanho e morfologia das partículas (HENEZKA et al., 2005).

A utilização destes métodos clássicos de precipitação resulta na produção de partículas não uniformes e com larga distribuição de tamanho de partícula (HENEZKA et al., 2005). Os materiais produzidos por estas técnicas usualmente requerem etapas adicionais de secagem e micronização, o que adiciona complexidade ao processo, tornando-os muitas vezes inviáveis na tentativa de produzir partículas de ordem micrométricas ou nanométricas (REVERCHON, 2002).

Quando se fala em tecnologias limpas, se destaca mais um inconveniente relacionado às técnicas convencionais onde os produtos finais são frequentemente caracterizados por alto teor de solvente residual, riscos toxicológicos, baixa quantidade do princípio ativo incorporado, desnaturação ou degradação (CALICETI et al., 2004).

## 2.5. EMPREGO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Novos métodos alternativos de precipitação e encapsulamento de materiais estão surgindo. Além do objetivo de satisfazer as necessidades dos segmentos industriais que utilizam materiais sólidos com características controladas, estas novas metodologias tentam sanar muitas das deficiências encontradas nos métodos convencionais. Neste sentido, os fluidos sub e/ou supercríticos estão sendo investigados para o desenvolvimento de processos e materiais inovadores (BOZBAG; ERKEY, 2012).

Por volta de 1879, Hannay e Hogarth observaram pela primeira vez uma substância, homogeneamente dissolvida em um fluido supercrítico, sob certa pressão, precipitar em forma de neve. Hoje esta observação é caracterizada como cristalização a partir de fluidos supercríticos (WEIDNER, 2009), mas foi ela que fez com que eles fossem considerados os precursores na área de nanotecnologia empregando estes fluidos. Mais tarde, apenas na década de 1980, foi realizado outro trabalho onde foi proposto a cristalização de ácido benzóico com CO<sub>2</sub> supercrítico (TAVANA; RANDOLPH, 1989).

A partir daí numerosos outros processos supercríticos foram estudados e ganharam maior atenção, tanto na academia quanto na indústria. Hoje algumas das vantagens oferecidas pelas técnicas supercríticas, que dependem da configuração do processo adotado, são conhecidas. Entre elas podemos destacar: formação de micro e/ou nanopartículas, boa distribuição de tamanho de partículas, boa eficiência de encapsulamento, alta pureza dos produtos, controle do polimorfismo dos cristais, possibilidade de processar moléculas termosensíveis, processo de um único estágio e tecnologia ambientalmente aceitável (FAGES et al., 2004).

Por isto, as tecnologias que empregam fluido supercrítico são métodos que têm sido amplamente utilizados na indústria e testados experimentalmente em laboratório, tendo como aplicações desde uso em extrações, a formação de partículas, ou para esterilização e como meio de reação (CHONG et al., 2011).

Outra motivação para utilizar os fluidos supercríticos é a possibilidade de explorar suas características/propriedades peculiares, especialmente no caso do dióxido de carbono supercrítico (CO<sub>2</sub>-SC). Ele é o fluido supercrítico mais utilizado para processos de precipitação (COCERO et al., 2009). Além de ser ambientalmente limpo e versátil pode ser uma alternativa promissora para substituir técnicas nocivas com solventes orgânicos e clorofluorocarbonetos (NALAWADE et al., 2006).

Embora seja abundante na atmosfera, uma grande quantidade também é disponível como um subproduto de H<sub>2</sub>NH<sub>3</sub> e produção de etanol. Suas condições supercríticas são facilmente atingidas ( $T_c = 31,1^\circ\text{C}$ ,  $P_c = 73,8$  bar) e pode ser removido do produto mediante um sistema de despressurização simples (NALAWADE et al., 2006; COCERO et al., 2009).

O CO<sub>2</sub>-SC também fornece um meio inerte apropriado para processar facilmente substâncias oxidáveis. Além disso, a alta solubilidade da maioria dos solventes orgânicos em fluidos supercríticos

permite a obtenção de produtos isentos de solventes (MIGUEL et al., 2006).

A obtenção de nanomateriais de tamanho controlado empregando fluidos supercríticos ocorre como função de parâmetros operacionais como: natureza do solvente e do reagente, pressão, temperatura, concentração do reagente e agente encapsulante, tempo de residência no reator e aditivos empregados (cosolvente, catalisador, tensoativos) (AYMONIER et al., 2006).

Um fluido supercrítico é aquele que simultaneamente sofre aquecimento e compressão acima de sua temperatura ( $T_c$ ) e pressão crítica ( $P_c$ ) (BOZBAG; ERKEY, 2012). Suas propriedades termofísicas são intermediárias entre um gás e um líquido podendo ser ajustada por pequenas mudanças na temperatura e/ou pressão (RANDOLPH, 1990). Ainda suas características de densidade os tornam adequados como solventes para uma grande variedade de solutos (CHRASIL, 1982), onde qualquer mudança na pressão ou temperatura, perto do ponto crítico, pode alterar seu poder de diluição, assim como a sua seletividade (BOZBAG; ERKEY, 2012).

A difusividade alta combinada com sua baixa viscosidade dá ao fluido supercrítico melhores características de transferência de massa se comparado com solventes líquidos convencionais. Ainda sua baixa tensão superficial evita o colapso dos poros, que pode ocorrer quando certos materiais nanoestruturados são colocados em contato com solventes líquidos (BOZBAG; ERKEY, 2012).

A literatura vem mostrando a possibilidade da utilização da tecnologia supercrítica na obtenção de materiais sólidos micro ou nanoparticulados de interesse em indústrias de alimentos, químicas e farmacêuticas.

Park et al. (2010) obtiveram micropartículas biodegradáveis de poliácido láctico através da técnica de antissolvente supercrítico (SAS). Segundo os autores este tipo de droga deve ter uma liberação controlada, e a formação de partículas pequenas pode dar esta característica a droga.

Priamo et al. (2010), realizaram a precipitação e encapsulamento de  $\beta$ -caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica. Os autores obtiveram eficiência de encapsulamento de até 54%, tamanhos de partículas na escala micrométrica, e ressaltam que a técnica é promissora, com aplicações potenciais para produtos alimentícios e farmacêuticos.

Para obtenção do extrato de alecrim em escala micrométrica Celiktas e Uyanikgil (2012), encapsularam este extrato em um polímero biodegradável através de técnica supercrítica (GAS). Os autores

obtiveram tamanhos de partículas e eficiência de encapsulamento superiores aos métodos convencionais.

Uma vez que a viabilidade e o desempenho destes processos têm sido demonstrados pela literatura com diferentes substâncias, o próximo passo é o desenvolvimento de procedimentos sistemáticos para a concepção e aumento de escala. Novas idéias e novos produtos podem ser testados no mercado, mas para isso é necessário ainda um maior conhecimento dos fundamentos e mecanismos dos processos.

## 2.6. FORMAÇÃO DE MICRO E NANOPARTÍCULAS EMPREGANDO FLUIDOS PRESSURIZADOS

Os processos com fluidos supercríticos podem ser classificados de acordo com o papel do fluido supercrítico no processo (JUNG; PERRUT, 2001; MARTÍN; COCERO, 2008): solvente, antissolvente, co-solvente ou soluto.

Existem várias técnicas de micronização que levam em consideração as características específicas dos fluidos sub e/ou supercríticos. Estas técnicas podem ser divididas em três categorias principais, as quais preferencialmente empregam CO<sub>2</sub> como fluido pressurizado, seja como solvente, como soluto ou como antissolvente. A seguir será apresentado um breve relato de cada técnica:

### 2.6.1. Fluidos supercríticos como solventes

O processo de formação de micro e nanopartículas utilizando o fluido supercrítico como solvente é chamado de Rápida Expansão de Soluções Supercríticas (RESS) e foi proposto pioneiramente por Krukonis em 1984 para recristalização de beta-estradiol, ferroceno, dodecanolactam entre outros. Esta metodologia tira proveito das grandes variações do poder solvente do fluido supercrítico como função de variações na pressão de operação (MARTIN; COCERO 2008; COCERO et al., 2009).

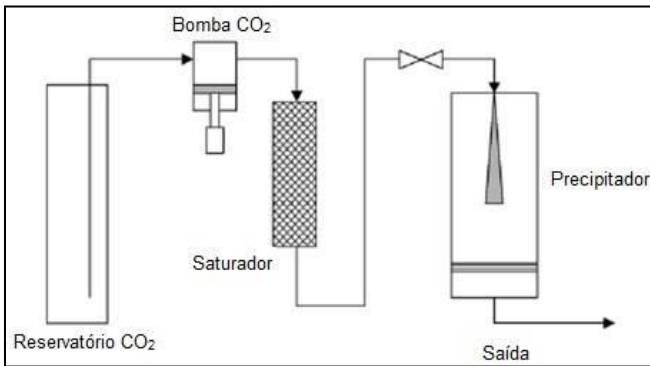
O processo é constituído em dois passos. No primeiro ocorre uma extração onde o fluido supercrítico é saturado com o substrato de interesse. Esta extração é seguida por uma etapa de despressurização brusca através de um bocal ejetor que produz uma grande diminuição no poder solvente e na temperatura do fluido, causando assim a precipitação do soluto (TURK et al., 2002; COCERO et al., 2009). A

diminuição do poder solvente do fluido supercrítico, devido à despressurização é muito grande, levando a supersaturações do soluto, que são produzidas por uma perturbação mecânica que se propaga à velocidade do som, resultando em minúsculas partículas (DEBENEDETTI et al., 1993).

A morfologia do material sólido resultante, cristalina ou amorfa, depende da estrutura química dos materiais utilizados e dos parâmetros do processo de RESS, como temperatura, queda de pressão, concentração da solução entre outros (FRANCESCHI, 2009). Outros fatores importantes relacionados ao tamanho das partículas formada são referentes a geometria e as dimensões do bocal onde ocorre a precipitação (YEO; KIRAN, 2005).

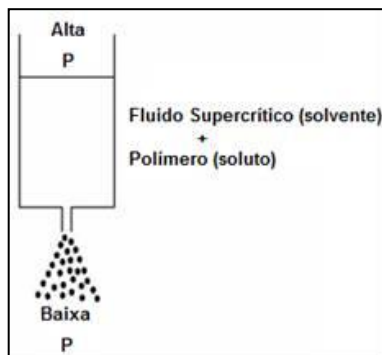
O processo RESS apresenta também a vantagem de não empregar solventes orgânicos e poder ser realizado a temperaturas moderadas sendo adequado para produtos termossensíveis (MARTIN; COCERO, 2008). A Figura 4 mostra o diagrama esquemático do processo RESS (Figura 4 a) e o fundamento da técnica (Figura 4 b) que apresenta a expansão através do bocal. O diâmetro e comprimento do bocal são fatores que influenciam o tamanho da partícula gerada.

Figura 4 – (a) Diagrama esquemático e (b) fundamentação da técnica RESS.



(a)





(b)

FONTE: Martin e Cocero, (2008); Yeo e Kiran, (2005).

A limitação deste método é a baixa solubilidade de muitas substâncias nos fluidos supercríticos, que pode ser atenuada com a adição de um cosolvente, mas, perde-se a vantagem da eliminação do solvente orgânico (JUNG; PERRUT, 2001; REVERCHON, 1999).

Asghari e Esmailzadeh, (2012) realizaram a micronização de partículas de deferasirox (DSF) (um agente quelante oral) que apresenta biodisponibilidade baixa devido a sua insolubilidade em água. Eles utilizaram a técnica RESS e obtiveram tamanhos de partículas muito menores do que o deferasirox utilizado na forma natural. Além disso, experimentos com a técnica RESS com adição de acetona como cosolvente resultou em partículas ainda menores do que àquelas empregando apenas o fluido supercrítico como solvente.

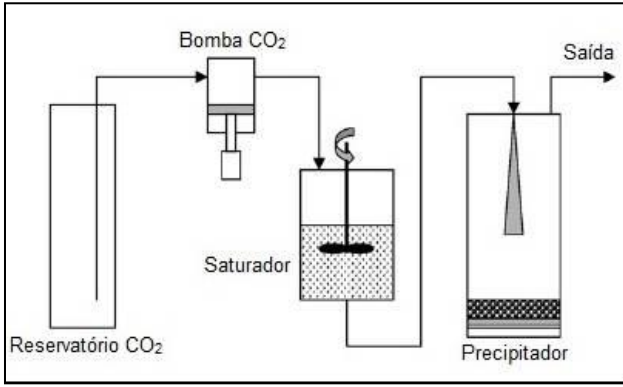
## 2.6.2. Fluidos supercríticos como solutos

A técnica chamada de Partículas de Soluções Saturadas de Gás (PGSS) emprega fluidos sub ou supercríticos como soluto. Este processo foi desenvolvido para recrystalizar compostos sólidos que não são solúveis em fluidos supercríticos. Mesmo que as aplicações industriais estejam atualmente voltadas principalmente para materiais não poliméricos, a técnica PGSS é também adequada para polímeros, pois a maioria deles não é solúvel em fluidos supercríticos ou gases (YEO; KIRAN, 2005).

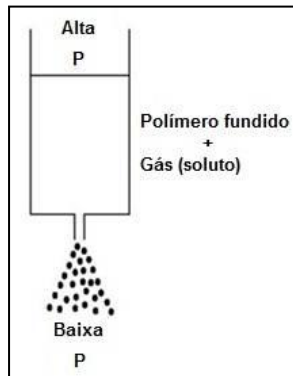
A técnica PGSS consiste em um fluido pressurizado que é dissolvido em um sólido fundido, e a mistura resultante é expandida

através de um bocal. A expansão provoca a vaporização do fluido dissolvido, que tem um efeito de arrefecimento intenso sobre o material fundido (YEO; KIRAN, 2005; MARTIN; COCERO, 2008). Um diagrama esquemático do processo e sua fundamentação são apresentados na Figura 5.

Figura 5 – (a) Diagrama esquemático e (b) fundamentação da técnica PGSS.



(a)



(b)

FONTE: Martin e Cocero, (2008); Yeo e Kiran, (2005).

Esta técnica é especialmente promissora para a impregnação de ingredientes ativos em matrizes poliméricas. Os princípios envolvem

separação de fases induzida pela pressão, temperatura e solvente (FRANCESCHI, 2009).

O processo PGSS pode ser utilizado para formação de partículas contendo compostos líquidos, onde o material de suporte é misturado com o líquido a ser encapsulado (COCERO et al., 2009).

De Paz et al. (2012) estudaram a formulação de partículas de  $\beta$ -caroteno com poli-( $\epsilon$ -caprolactona) através da técnica PGSS. Os autores estudaram a influência de vários parâmetros no tamanho das partículas, entre eles a pressão que resultou em maiores tamanhos de partículas quando elevada.

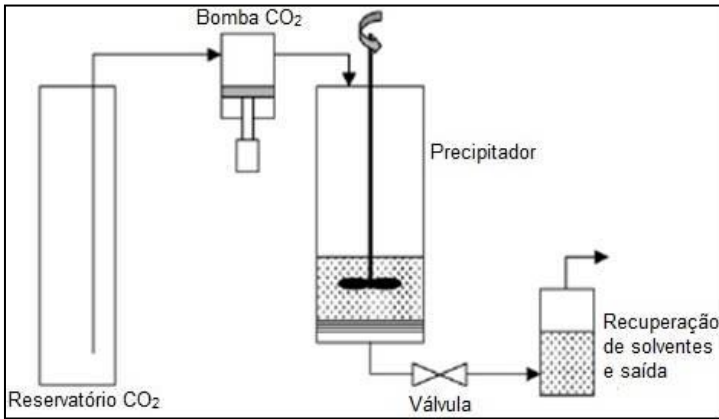
### **2.6.3. Fluidos supercríticos como antissolventes: GAS/SAS/PCA/ASES /SEDS/SFEE**

Existem várias técnicas que empregam fluidos pressurizados ou supercríticos como antissolventes, causando a precipitação do(s) substrato(s) dissolvido(s) inicialmente em uma solução orgânica. Os diferentes processos que utilizam o fluido pressurizado como antissolvente são empregados para compostos que são praticamente insolúveis em fluidos supercríticos e a principal diferença entre eles é a maneira como ocorre o contato entre a solução orgânica e o antissolvente comprimido (FRANCESCHI, 2009).

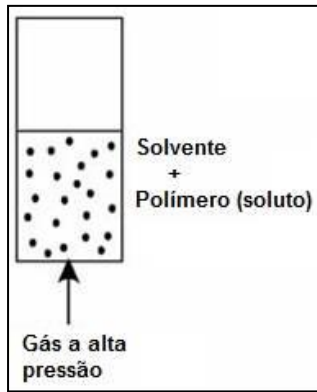
O método Gás Antissolvente (GAS) foi o primeiro método empregando antissolvente pressurizado e foi descrito por Gallagher et al. (1989), que demonstraram que a taxa de adição de um gás antissolvente pode ser programada para controlar a morfologia, tamanho e distribuição de tamanho dos cristais sob uma ampla faixa.

Este processo foi desenvolvido para recristalizar compostos sólidos que não são solúveis em fluidos supercríticos. A técnica é especialmente adequada para polímeros onde o mesmo é dissolvido em um solvente orgânico líquido e um gás é utilizado como um antissolvente para o polímero (YEO; KIRAN, 2005). Devido à dissolução do gás comprimido, o solvente expande tendo uma força menor do que o solvente puro. A mistura fica supersaturada, levando a precipitação do soluto em micropartículas (JUNG; PERRUT, 2001). A Figura 6 mostra o diagrama esquemático e fundamentação da técnica GAS.

Figura 6 – (a) Diagrama esquemático e (b) fundamentação da técnica GAS.



(a)



(b)

FONTE: Martin e Cocero, (2008); Yeo e Kiran, (2005).

A técnica GAS possui vantagem sobre a RESS em relação a sua versatilidade, pois, selecionando apropriadamente o solvente, é possível micronizar muitos produtos diferentes. Para isto basta que o soluto seja solúvel em solvente orgânico e insolúvel no fluido supercrítico (MARTIN; COCERO, 2008).

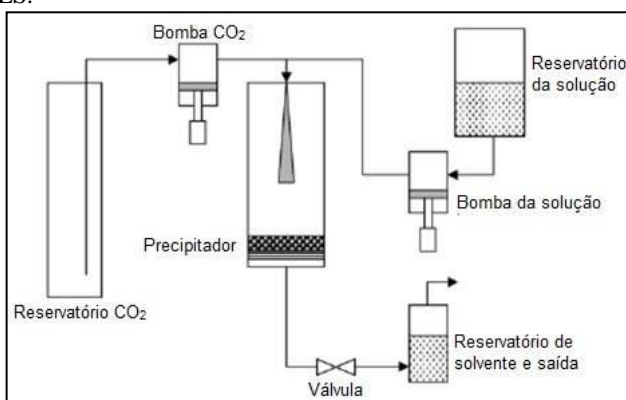
Garay et al. (2010) utilizaram a técnica GAS para obter micropartículas do copolímero de acrilato-metacrilato visando várias

aplicações tais como fase estacionária para cromatografia, adsorventes, suportes para catalisador, bem como sistemas de liberação de drogas.

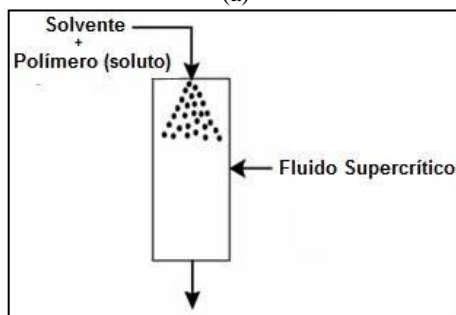
O modo contínuo da técnica GAS é conhecido como ASES (Sistema de Extração de Solvente em Aerossol) ou também como SAS (Antissolvente Supercrítico).

Nestas técnicas o que muda é a forma de contato do fluido supercrítico. O polímero é solubilizado no solvente orgânico e esta solução é pulverizada para uma câmara onde já está presente o fluido supercrítico, provocando o rápido contato entre eles, o que resulta na geração de partículas. Isto lhe confere uma vantagem importante na questão de adaptabilidade para operações contínuas com produção em grande escala de partículas (YEO; KIRAN, 2005). A Figura 7 mostra o diagrama esquemático do processo SAS/ASES e sua fundamentação.

Figura 7 – (a) Diagrama esquemático e (b) fundamentação da técnica SAS/ASES.



(a)



(b)

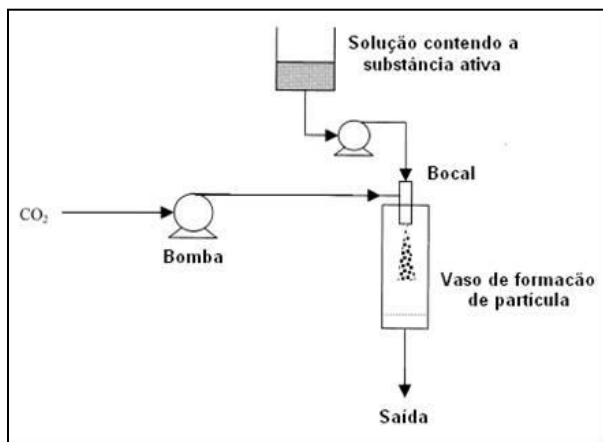
FONTE: Martin e Cocero, (2008); Yeo e Kiran, (2005).

Hu et al. (2012) comprovaram que as características de estado sólido podem ser modificadas através da técnica SAS. Eles obtiveram mudança significativa no sólido fluconazol pela recristalização usando o processo SAS. Isto pode ser importante para aplicações diferentes para um mesmo composto.

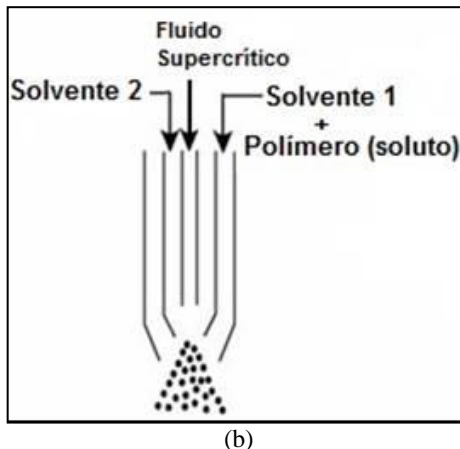
Por fim, as técnicas PCA e SEDS, que são similares às técnicas SAS e ASES, possuem praticamente a mesma configuração. A técnica PCA foi inicialmente proposta por Dixon (1992) onde, ao contrário da técnica GAS, a câmara de precipitação é carregada com o antissolvente comprimido e a solução é que é aspergida para o interior da câmara contendo o antissolvente.

Na técnica SEDS a solução líquida contendo o soluto, o solvente orgânico e o fluido supercrítico são pulverizados em conjunto pelo injetor coaxial. Dois e três canais de bicos são utilizados para precipitação de compostos individuais e binários, respectivamente. O fluido supercrítico é utilizado tanto como antissolvente como meio de dispersão para solução. A alta velocidade do contato entre os fluxos da solução e do fluido gera a precipitação das partículas (YEO; KIRAN, 2005). A Figura 8 apresenta o diagrama esquemático e fundamentação da técnica.

Figura 8 – (a) Diagrama esquemático e (b) fundamentação da técnica SEDS.



(a)



FONTE: Jung e Perrut, (2001); Yeo e Kiran, (2005).

Franceschi et al. (2008) e Priamo et al. (2010), reportaram com sucesso a utilização da técnica SEDS para precipitação de  $\beta$ -catoteno puro e copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) PHBV, utilizando dióxido de carbono supercrítico como antissolvente.

Zhang et al. (2012) tentaram melhorar a técnica SEDS e investigar a condição ideal de precipitação das micropartículas de morfina para obter liberação controlada da droga. Como resultado obtiveram um perfil de liberação onde se teve maior liberação nas primeiras 4 horas, seguida por uma liberação lenta e sustentada ao longo de um período de cerca de 168 horas.

## 2.7. MATERIAIS UTILIZADOS COMO AGENTES ENCAPSULANTES

Quando se fala em princípios ativos precipitados na ordem micrométrica, surge a necessidade de promover sua proteção frente a fatores externos que possam degradá-los. Wang et al. (2006) afirmam que esta etapa de proteção pode se dar através do encapsulamento do(s) princípio(s) ativo(s) utilizando biopolímeros como agentes encapsulantes, os quais, além do papel de proteção, definem a forma de liberação do princípio ativo, se através de difusão (pelos poros ou cadeias do polímero) ou por degradação (dada quando o polímero

degrada dentro da matriz alimentícia, resultado de processos biológicos naturais).

O agente de encapsulamento ou material de revestimento desempenha um papel importante, pois é responsável pela proteção do composto e permite uma liberação controlada do mesmo (MARTIN et al., 2010). Este material deve ser selecionado, dependendo do composto específico a ser revestido e as características desejadas das microcápsulas.

São necessários alguns requisitos para sua utilização: biocompatibilidade, ausência de toxicidade, fornecer um meio adequado para preservar as propriedades e atividade da substância ativa, fácil processamento com a técnica de precipitação selecionada (JANOVIC et al., 2008).

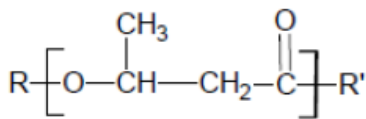
Quando se trata de proteção de óleos ou extratos este material ainda precisa ser solúvel em água, biodegradável, que forme soluções de baixa viscosidade, apresente propriedades específicas (não higroscópico, não poroso, solúvel, estável, etc.), ter um baixo custo, ser de fácil secagem e não ser reativo (MARTIN et al., 2010).

Segundo Maia et al. (2004) os polímeros biodegradáveis têm se destacado e estão sendo avaliados visando aumentar o número de materiais biocompatíveis para aplicações específicas na área farmacêutica, alimentícia, médica. Eles podem ser sintéticos ou naturais com a propriedade fundamental de biodegradabilidade, degradando in vivo ou no ambiente natural com produção de subprodutos biocompatíveis ou não tóxicos. Os biopolímeros mais frequentemente utilizados são ou biopoliésteres ou polímeros à base de amido (COCERO et al., 2009).

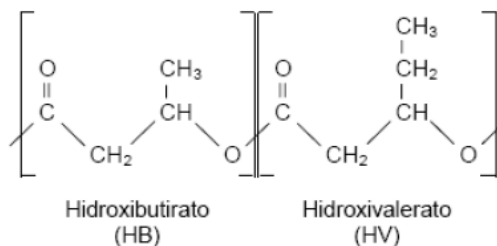
Entre os poliésteres, destacam-se os termoplásticos de origem bacteriana como o poli (hidroxibutirato) (PHB) e poli (hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV). As estruturas químicas do PHB e do PHBV são muito similares (Figura 9) aos polímeros sintéticos biodegradáveis mais usuais, porém apresentam taxa de degradação mais lenta, o que lhes confere aplicação em sistema de liberação em longo prazo (POUTON; AKNTAR, 1996).



Figura 9 – Estrutura química do (a) PHB e (b) do copolímero PHBV.



(a)



(b)

FONTE: Catoni, (2011).

O PHB é produzido como material de reserva energética por fermentação de uma variedade de cepas bacterianas, destacando-se a *Ralstonia eutropha* e a *Burkholderia saccharina*. É um poliéster isotático, semicristalino, com grande potencial como polímero biodegradável de alto consumo. Sua produção ocorre em duas etapas: uma fermentativa onde os micro-organismos são alimentados em reatores acumulando o PHB no interior da célula, e a outra onde é realizada a extração e purificação do polímero. O PHBV é produzido por um processo fermentativo semelhante ao PHB diferindo na utilização de outros substratos como fontes de carbono (SHARMA; RAY, 1995).

A degradação ocorre por erosão da superfície, o que torna o PHB um material atrativo para a aplicação na liberação controlada de compostos bioativos. Além disso, a liberação de princípios ativos com baixa massa molar, a partir do PHB e PHBV, pode se processar pela penetração de água e pela formação de poros nas matrizes poliméricas (POUTON; AKNTAR, 1996).

Nos processos com fluidos supercríticos, as propriedades do material de revestimento e especialmente as interações dos materiais de

revestimento com fluidos supercríticos são especialmente importantes (MARTIN et al., 2010).

O dióxido de carbono supercrítico, por exemplo, interage com muitos materiais poliméricos. Isto causa variações importantes em suas propriedades físicas, como inchaço, diminuição de cristalinidade, fusão e temperatura de transição vítrea (COCERO et al., 2009; KIKIC, 2009).

## 2.8. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS ENCAPSULADOS

A caracterização dos materiais encapsulados pode ser realizada em termos de morfologia, granulometria e distribuição de tamanho de partículas, além da eficiência de encapsulamento, estabilidade das partículas e taxa de liberação do material encapsulado (COCERO et al., 2009).

A liberação da substância ativa a partir da matriz do biopolímero, em geral, é controlada pela difusão da substância, erosão e degradação do polímero. A difusão ocorre quando há liberação de pequenas moléculas a partir da matriz do agente encapsulante sem degradar este material. Enquanto a erosão se refere à dissolução e degradação do polímero, causando uma perda de peso progressiva da matriz (COCERO et al., 2009).

Ambos os mecanismos dependem de parâmetros externos como a concentração da substância ativa, pH, ação enzimática; além das propriedades das partículas como: tamanho de partícula, morfologia, as interações químicas entre o princípio ativo e o polímero, características do polímero (temperatura de transição vítrea e peso molecular) (LI; JASTI, 2006).

A determinação da quantidade de substâncias encapsuladas é realizada através de vários métodos. Os métodos mais comuns envolvem a dissolução do agente encapsulante e das substâncias ativas em solventes adequados, seguido por uma análise quantitativa dos montantes de cada substância por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Cromatografia Gasosa (GC), entre outros. Também é possível determinar a quantidade de material encapsulado indiretamente através da medição da quantidade do princípio ativo que não foi incorporado. Contudo, alguns cuidados devem ser tomados para assegurar que a substância que não foi encapsulada, e que possa estar adsorvida a superfície do agente encapsulante, seja removido e devidamente contabilizado (COCERO et al., 2009).

A maioria dos agentes encapsulantes são polímeros ou materiais de base polimérica, que podem sofrer modificações durante o encapsulamento ou processo de coprecipitação, alterando a sua cristalinidade (KIRAN et al., 2008; ANTONACCI; REVERCHON, 2007).

Vários autores também relatam o efeito do polímero e da substância ativa no crescimento da partícula, quando ambos os componentes são precipitados juntos (ANTONACCI; REVERCHON, 2007; RAWLINSON et al., 2007; BERKLAND et al., 2004). Assim, é preciso estudar a cristalinidade dos materiais por técnicas que dão informações sobre a interação entre o agente encapsulante e o material encapsulado, as mudanças na cristalinidade de ambas as substâncias e as mudanças no peso molecular dos transportadores (COCERO et al., 2009).

## 2.9. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

Como a indústria vem sofrendo grandes mudanças procurando sempre desenvolver produtos com qualidade e segurança para atender a um mercado cada vez mais exigente, métodos alternativos como precipitação e encapsulamento de materiais estão surgindo. Estes métodos emergentes têm por objetivo satisfazer às necessidades dos segmentos industriais que utilizam materiais sólidos com características controladas.

Extratos vegetais e carotenoides podem ser aplicados em uma gama de produtos, como alimentos, tecidos, agrotóxicos, medicamentos e cosméticos. No entanto, a presença de compostos voláteis nestes princípios ativos limita sua aplicação, aos quais podem sofrer oxidação ou termodegradação, dependendo das condições e meios de aplicação. Neste sentido, o microencapsulamento oferece proteção através da parede polimérica, evitando que ocorram alterações químicas e sensoriais (LEIMANN, 2008).

Existem várias técnicas convencionais conhecidas para o encapsulamento de princípios ativos, contudo, em alguns casos elas não são capazes de proporcionar certas características peculiares que podem ser obtidas via técnicas envolvendo fluidos supercríticos. Dentre estas características pode ser destacada a possibilidade de obter o controle do tamanho e distribuição de tamanho das partículas.

No entanto, na área de fluidos supercríticos ainda há uma vasta gama de fatores a serem estudados frente às suas importantes

características de aplicação. Quando se trata de extratos vegetais, que se apresentam na forma líquida, a literatura científica mostra escassez de trabalhos (RODRIGUES et al., 2004; VARONA et al., 2010). Para o ESU não foram encontrados relatos sobre seu encapsulamento, principalmente relacionadas com técnicas envolvendo fluidos supercríticos, apenas extração, ressaltando a importância do presente trabalho, dado a aplicação que o ESU pode ter quando apresentado em uma forma protegida.

Em relação à astaxantina e a bixina também são poucos os trabalhos que versam o seu encapsulamento com tecnologias supercríticas, sendo que a maioria dos trabalhos já realizados é para o  $\beta$ -caroteno. Para a astaxantina, Mezzomo et al. (2012) utilizaram a tecnologia supercrítica para precipitação e encapsulamento de resíduos de casca de camarão (que é rico em astaxantina). Já para bixina existem relatos sobre sua micronização pura, para obtenção de partículas menores que originalmente ela se apresenta (SUO et al., 2005).

Neste cenário, o encapsulamento através da tecnologia com fluidos supercríticos do ESU, astaxantina e bixina se torna relevante. Dentro deste contexto, ficam evidentes os benefícios da utilização de fluidos pressurizados como alternativa na precipitação e encapsulamento de princípios ativos em biopolímeros, mostrando-se uma tecnologia bastante atraente. Outro fator de grande importância que é preciso ressaltar relacionado ao presente trabalho é a grande aplicabilidade da técnica para coprecipitação e encapsulamento de diversos compostos extraídos das mais variadas fontes, o que acarreta em benefícios com relação ao investimento inicial do equipamento, com grande flexibilidade de aplicação.

No caso do presente trabalho, os solutos utilizados podem oferecer grande oportunidade, visto que algumas matérias primas possuem baixo custo, como o extrato de semente de uva que é proveniente do resíduo da indústria do vinho. Aliando matéria prima de baixo custo e alto valor agregado do produto processado (micro/nano partículas do composto ativo encapsuladas em biopolímero) com a vantagem de oferecer maior estabilidade e vida útil prolongada ao produto, o processo SEDS torna-se de grande valia.

## CAPÍTULO 3

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são especificados os materiais e a metodologia utilizada empregando dióxido de carbono pressurizado como antissolvente para a realização dos experimentos de encapsulamento do extrato de semente de uva, astaxantina e bixina utilizando diclorometano como solvente orgânico, e caracterização das partículas encapsuladas obtidas dos princípios bioativos estudados.

#### 3.1. ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS E PROCESSAMENTO

Para os experimentos de encapsulamento foram utilizados os seguintes reagentes:

- Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (White Martins S.A., pureza de 99,8%);
- Diclorometano (DCM) (FMaia, pureza de 99,5%);
- Etanol anidro (Merck, pureza 99,9%);
- Extrato de semente das uvas Malbec e Cabernet Franc cedidas pela vinícola Villa Francioni (São Joaquim, SC). O extrato foi obtido através de extração supercrítica segundo Dalmolin et al. (2010) e gentilmente doado;

O ESU foi cedido pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e obtido por extração supercrítica, das sementes de uva das variedades Malbec e Cabernet Franc (1:1). A extração foi realizada no Laboratório de Separações Físicas (LASEFI) da Universidade Estadual de Campinas – SP. As sementes foram coletadas em Abril de 2009, após a fermentação do vinho, e secas ao sol durante sete dias até atingir a umidade de 12%, posteriormente trituradas em um moinho de facas. As condições de extração foram  $T = 313,15 \text{ K}$  e  $35 \text{ MPa}$ ; 280 g de matéria-prima, resultando em uma densidade aparente do leito de  $966 \text{ kg.m}^{-3}$  (DALMOLIN et al., 2010).

O ESU foi caracterizado segundo Dalmolin et al. (2010) que utilizaram este mesmo extrato para obtenção de dados de equilíbrio de fases do Extrato de semente de uva (ESU) + Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) + Etanol. De acordo com os autores o ESU é constituído majoritariamente pelos ácidos graxos insaturados linoleico (71,20%),

oleico (15,12%) e linolênico (0,57%) e também pelos ácidos saturados palmítico (8,14%) e esteárico (4,05%). O teor de  $\alpha$ -tocoferóis é de 3,9 mg.100g<sup>-1</sup> e  $\gamma$ -tocotrienóis 7,8 mg.100g<sup>-1</sup>. A concentração de trans-vervetrol foi determinada como 0,625 mg.dm<sup>-3</sup>. A densidade experimental determinada para o extrato de semente de uva na temperatura de 293,15 K foi de 0,9257 g.cm<sup>-3</sup> e teor de água em óleo bruto de semente de uva foi de 5,5% em massa.

- Bixina comercial em pó, CHR HANSEN, Batch: BX-124-99, Finlândia, gentilmente cedida pelo Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC);
- Extrato de Astaxantina cedida pela Universidade Federal de Rio Grande (FURG), extraída intracelularmente da microalga *Haematococcus pluvialis* na mesma Universidade;

A astaxantina foi extraída intracelularmente da microalga *Haematococcus pluvialis* na Universidade Federal de Rio Grande por Machado Jr. et al. (2012). Os cultivos estoques foram mantidos em fotobiorreatores de 1 L a 25±1°C, sob constante iluminância de 111  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  em meio de cultivo *Bold Basal Medium* (BBM) (DONG & ZHAO, 2004).

Os cultivos foram realizados na Universidade Federal de Rio Grande. Segundo os autores, os cultivos foram conduzidos à temperatura constante de 25±1°C em fotobiorreatores de 1L com aeração por borbulhamento de ar de 300 mL.min<sup>-1</sup> e sob iluminância constante de 444  $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  durante 15 dias. Inicialmente, o pH foi ajustado para 7,0 e os meios foram inoculados com inoculo correspondente a 10% do volume de cultivo.

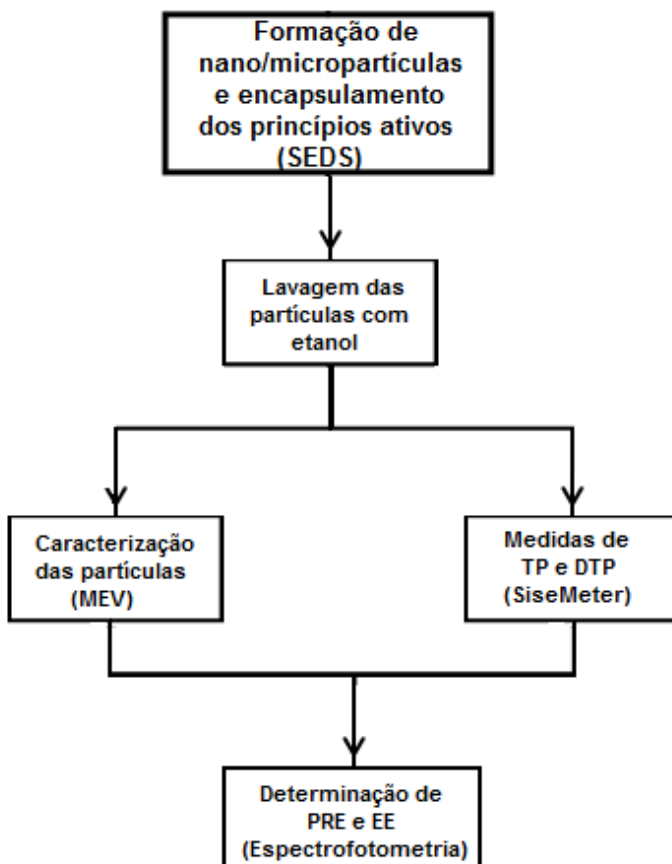
Convencionalmente, a extração dos carotenoides da biomassa é realizada através de ruptura química com dimetilsulfóxido (DMSO) e extração com acetona de acordo com Fonseca et al. (2011), após 15 dias de cultivo. No entanto, neste trabalho a ruptura química e extração dos carotenoides foram realizadas através do solvente diclorometano. Foram pesadas determinadas quantidades de biomassa conforme a concentração desejada, e adicionado o solvente. Em seguida esta solução foi deixada 10 minutos em vórtex para rompimento celular e extração. A solução foi filtrada para separar a biomassa e obter o extrato contendo a astaxantina.

- Copolímero, Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) com massa molar ( $M_w$ ) de 196.000 e índice de poli dispersão de 1,85, gentilmente cedido pela empresa PHB Industrial S/A.

O copolímero foi submetido a uma pré-purificação, pela sua dissolução em clorofórmio P.A. (Vetec, pureza de 99,5%) e posterior precipitação em n-heptano P.A. (Vetec, pureza de 99,5%) para retirada de impurezas.

A Figura 10 apresenta um fluxograma com os passos utilizados para realização deste trabalho.

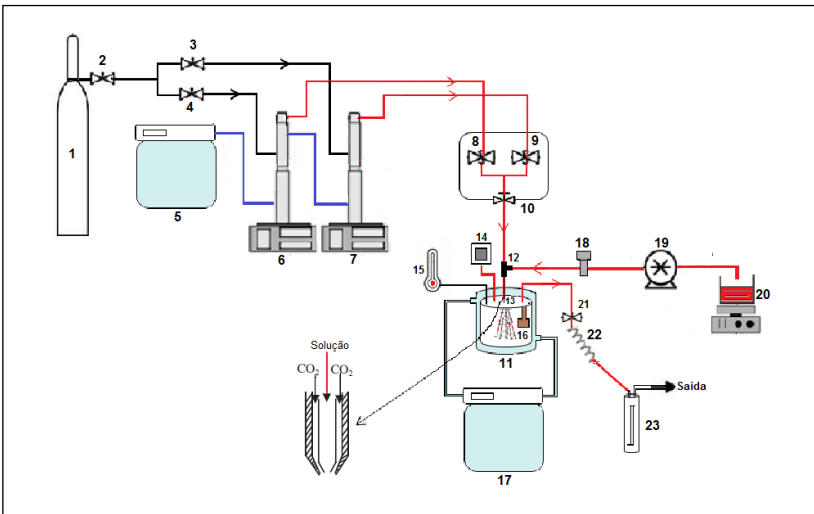
Figura 10 – Fluxograma apresentando os passos utilizados para realização deste trabalho.



### 3.2. UNIDADE EXPERIMENTAL DE COPRECIPITAÇÃO E ENCAPSULAMENTO DOS DIVERSOS PRINCÍPIOS ATIVOS

O aparato e procedimento experimentais para a coprecipitação e o encapsulamento dos diferentes princípios ativos foram baseados nos trabalhos de Franceschi et al. (2008), Franceschi et al. (2009a,b) e Priamo et al. (2010) que estudaram precipitação e encapsulamento de  $\beta$ -caroteno em PHBV. O aparato experimental foi fundamentado na técnica que emprega fluidos pressurizados como antissolventes baseada no método *Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids* (SEDS). A Figura 11 apresenta o diagrama esquemático do aparato experimental utilizado.

Figura 11 - Diagrama esquemático do aparato experimental de coprecipitação e encapsulamento utilizado.



Conforme a Figura 11, o aparato experimental para coprecipitação e encapsulamento dos princípios ativos é constituído dos seguintes elementos:

- (1) Reservatório para armazenamento do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (White Martinis);
- (2) Válvula de uma via que permite o fluxo em um único sentido (*Check-Valve* Marca HIP, Modelo 15-41AF1-T, Pressão de operação até 1034 bar)



- (3) e (4) Válvulas de Esfera que quando abertas permitem o fluxo de antissolvente para as bombas de alta pressão (Marca Swagelok, Modelo SS-83KS4, Pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);
- (5) Banho Ultratermostático de recirculação que mantém constante a temperatura nos cilindros das bombas de alta pressão (Marca Nova Ética, Modelo 521/2D);
- (6) e (7) Bombas de alta pressão que possuem um cilindro que tem a capacidade de 506 mL (Marca ISCO, Modelo 500D, pressão de trabalho de até 258 bar e vazão máxima de 170 mL.min<sup>-1</sup>). São utilizadas duas bombas para manter o fluxo de antissolvente sempre constante, e ainda através delas é pressurizado o CO<sub>2</sub> e visualizada a vazão;
- (8) e (9) Válvulas de esfera que quando abertas permitem o fluxo de antissolvente pressurizado das bombas para a câmara de precipitação (Marca Swagelok, Modelo SS-83KS4, Pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente). Sempre são utilizadas alternadamente, dependendo da bomba que está deslocando o antissolvente para a câmara;
- (10) Válvula métrica tipo agulha para controlar o fluxo e vazão de antissolvente das bombas de alta pressão para câmara de precipitação (Marca HIP, Modelo 15-11AF1, pressão de operação até 1034 bar);
- (11) Câmara de precipitação cilíndrica de aço inox 316 encamisada com capacidade de 600 mL (diâmetro interno de 8 cm e altura 12cm). Ela é constituída de cinco entradas na tampa: uma central, e quatro periféricas, onde uma está fechada. A Figura 12 apresenta a vista da câmara de precipitação e a tampa com as cinco entradas.

Figura 12 – Fotografias (a) Câmara de precipitação conectada a todas as linhas da unidade experimental e (b) Tampa com as cinco entradas.



(a)



(b)

FONTE: Franceschi, (2009); Priamo, (2011).

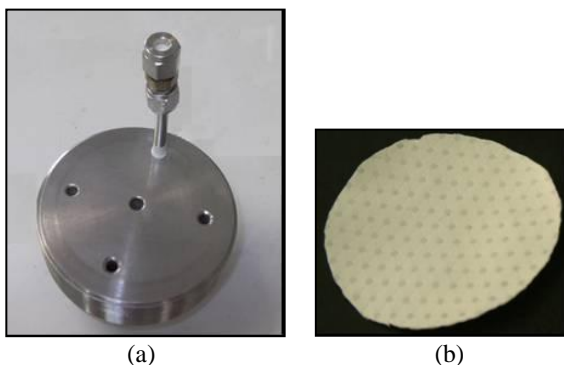
- (12) Entrada central coaxial – conexão tipo T (Marca Swagelok) à qual estão conectadas a linha de antissolvente e a linha de solução, que são injetados simultaneamente. Até esta conexão o antissolvente e a solução orgânica fluem por linhas separadas e a partir dela até a câmara de precipitação pertence a mesma linha. Contudo, a solução escoar por dentro do tubo capilar (13) e o antissolvente escoar por fora do tubo capilar e por dentro de um tubo de aço inox com diâmetro de 1,58 mm;
- (13) Tubo capilar de sílica Fundida que faz com que ocorra a dispersão do jato da solução orgânica dentro da câmara de precipitação. Ele passa por dentro de um *PEEK Tubing* (diâmetro interno de 0,254 mm) ao qual está conectado em uma extremidade da união T (12) por um sistema de anilhas. Sua montagem requer bastante cuidado para apertá-lo o suficiente para não cair e também para não impedir a vazão da solução. Neste trabalho foi utilizado um capilar com diâmetro interno de 100 $\mu$ m. A Figura 13 apresenta a fotografia da conexão tipo T montada com o tubo capilar e *PEEK Tubing*.

Figura 13 – Sistema montado com: (1) *PEEK Tubing* anilado com o capilar; (2) Conexão tipo T; (3) Tubo inox por onde escoo o antissolvente; (4) Capilar de sílica fundida por onde escoo a solução orgânica.



- (14) Entrada periférica que apresenta um transdutor de pressão que monitora a pressão dentro da câmara de precipitação. Ele está conectado à linha entre a válvula (10) e a câmara de precipitação (Transdutor absoluto – 0 à 250 bar, Marca SMAR, Modelo LD 301);
- (15) Entrada periférica onde fica um sensor de temperatura (termopar) ligado à um indicador de temperatura (Universal, Marca NOVUS, Modelo N 1500);
- (16) Suporte constituído por dois filtros de politetrafluoretileno, disposto na saída da câmara, para retenção das partículas precipitadas no se interior, permitindo apenas o fluxo do antissolvente e solvente orgânico. Um filtro apresenta porosidade de 1 $\mu$ m, diâmetro de 8 mm e espessura de 1 mm que serve de base para o outro filtro membrana de porosidade 0,22  $\mu$ m, espessura de 150  $\mu$ m e mesmo diâmetro que o primeiro. A Figura 14 mostra a tampa da câmara de precipitação com o suporte de filtros e os filtros utilizados.

Figura 14 - (a) Tampa mostrando o suporte onde o filtro é inserido e (b) Filtro de membrana de politetrafluoretileno.



- (17) Banho Ultratermostático de recirculação (Marca Nova Ética, Modelo 512/2D), que serve para controlar a temperatura da câmara de precipitação, através da sua ligação com a camisa da câmara;
- (18) Válvula de regulagem de pressão constituída de aço inox 316 com uma porta de entrada e outra de saída (*Back Pressure Regulator*, Marca GO-Regulador, Série BP-66, Modelo 1A11QE151). Ela permite a regulagem da pressão independentemente da vazão, permitindo uma pressão maior anterior a ela e menor depois dela;
- (19) Bomba de HPLC Digital Série III (Marca Acuflow), que é utilizada para deslocar a solução orgânica para a câmara de precipitação. Esta bomba possui um único pistão que permite operar em fluxo constante;
- (20) Recipiente para solução orgânica na qual o princípio ativo a ser precipitado é dissolvido no solvente orgânico;
- (21) Válvula métrica tipo agulha (Marca HOKE, Modelo 1315G2Y) que fica na saída da câmara de precipitação. Através desta válvula é possível controlar o fluxo de saída da câmara de precipitação, juntamente com a válvula (10). A válvula (21) possui abertura um pouco maior que a válvula (10) para compensar o fluxo de entrada da solução, mantendo assim a pressão constante dentro da câmara de precipitação;
- (22) Fita de aquecimento (Marca FISATON, Modelo 5, 200 W de potência) que envolve a válvula (21). Ela é utilizada

devido ao efeito Joule-Tomphson ser pronunciado pela expansão do antissolvente após esta válvula congelando-a. A temperatura utilizada na fita de aquecimento é 200°C, impedindo o congelamento da válvula e permitindo o controle do fluxo;

- (23) *Trap* de segurança, recheado com algodão, onde era possível observar a ocorrência de arraste dos princípios ativos quando o algodão apresentava coloração. Do *trap* de segurança o antissolvente e o solvente orgânico se deslocavam para saída.

A Figura 15 apresenta uma vista mais detalhada da unidade de coprecipitação e encapsulamento utilizada neste trabalho.

Figura 15 - Vista da unidade experimental de coprecipitação e encapsulamento.



### 3.3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE NANO/MICROPARTÍCULAS E ENCAPSULAMENTO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS

O procedimento experimental utilizado para coprecipitação e encapsulamento em PHBV do ESU, astaxantina e bixina foi baseado no trabalho de Franceschi, (2009). O procedimento é iniciado com a preparação da solução orgânica contendo os compostos de interesse (extrato de semente de uva, astaxantina ou bixina) e o polímero (PHBV) solubilizados em diclorometano como solvente orgânico nas proporções desejadas.

O próximo passo é carregar as bombas de alta pressão (6 e 7) com CO<sub>2</sub> proveniente do reservatório de estocagem. Neste trabalho foram

utilizadas duas bombas de alta pressão, pois o CO<sub>2</sub> precisa estar em fluxo contínuo, de forma que, quando uma bomba está deslocando CO<sub>2</sub> para a câmara de precipitação, a outra está sendo preenchida novamente pelo fluido e vice versa.

O deslocamento do fluido do cilindro para a câmara interna de cada bomba se dá mantendo as válvulas **1 a 4** abertas. Apesar da pressão de vapor do CO<sub>2</sub> ser alta na temperatura ambiente (64 bar em 25°C) a simples abertura da válvula do cilindro não é suficiente para deslocar a quantidade necessária de CO<sub>2</sub> para a câmara das bombas. Assim, para liquefazer a maior quantidade de CO<sub>2</sub> possível, a temperatura da camisa do cilindro das bombas foi ajustada em 7°C com o auxílio do banho de recirculação **5** e o reservatório de CO<sub>2</sub> é deixado aberto por um tempo variando de 30 minutos a 1 hora. Nestas condições, geralmente era possível armazenar cerca de 500 mL de CO<sub>2</sub> no estado líquido dentro da câmara das bombas.

Enquanto ocorre a liquefação do CO<sub>2</sub> nas bombas, é realizada a montagem da câmara de precipitação. Foram inseridos cuidadosamente os filtros de retenção, de forma a evitar que durante o experimento houvesse um deslocamento destes e posterior arraste do material precipitado pelo fluxo de saída. Primeiramente, foi colocado o filtro de politetrafluoretileno com maior porosidade servindo de suporte para o filtro membrana que vinha logo a seguir. A tampa da câmara era fechada para posteriormente as outras conexões serem colocadas.

Antes de conectar todas as entradas na câmara, outro passo importante a ser realizado foi o ajuste da vazão e pressão da solução na bomba de HPLC. Nesta etapa, assim como também para limpeza da bomba após os experimentos, utilizou-se apenas diclorometano puro evitando gastos desnecessários com solução contendo os princípios ativos. O ajuste da vazão da solução foi realizado diretamente no controlador da bomba. Já a pressão foi ajustada manipulando-se a *Back pressure* (**18**) de modo a restringir a passagem do fluxo aumentando a pressão até o valor de 2900 Psi (200 bar) para evitar qualquer possibilidade de refluxo do antissolvente pela linha da solução. Após estabilização da pressão e da vazão a bomba de HPLC foi desligada para montagem da câmara.

Para finalizar, a montagem da câmara foi efetuada a conexão da linha de entrada de CO<sub>2</sub> e da solução, do sensor de temperatura, a linha de saída e em seguida a câmara foi conectada ao banho termostático. Após a montagem da câmara a válvula **10** foi gradualmente aberta para permitir o enchimento da câmara com CO<sub>2</sub> na sua pressão de vapor em

temperatura ambiente, mantendo-se ainda toda a linha aberta desde o cilindro de armazenagem até a câmara.

Quando a câmara de precipitação estava preenchida com CO<sub>2</sub>, a válvula **10** foi fechada e acionada o sistema de aquecimento, controlado pelo banho de recirculação **17**. O controle da temperatura desejada dentro da câmara foi captado pelo sensor de temperatura e monitorada pelo indicador de temperatura.

Durante o período de estabilização da temperatura no valor estipulado para o experimento, a válvula do reservatório de CO<sub>2</sub> e as válvulas **1 a 4** foram fechadas e a pressão elevada nas bombas de seringa pelo deslocamento do cilindro interno destas, pressurizando toda a linha desde as válvulas **1 e 2** até a válvula **10** na pressão de 200 bar, ou seja, entre as bombas e a câmara de precipitação. Este valor de pressão nas bombas de seringa foi estipulado para manter um alto diferencial de pressão entre as bombas e a câmara de precipitação. Este diferencial de pressão tem como objetivo evitar possível refluxo da câmara de precipitação para as linhas podendo causar precipitação do composto utilizado ou do polímero nas linhas e também para fazer com que o CO<sub>2</sub> entre com alta velocidade na câmara de precipitação intensificando a dispersão do jato de solução durante os experimentos de precipitação (Franceschi, 2009).

No momento em que a temperatura atingia o valor fixado para o experimento a válvula **10** era novamente aberta gradualmente de modo a permitir o fluxo de CO<sub>2</sub> para dentro da câmara até a obtenção da pressão experimental desejada. Uma vez que a pressão na câmara atingisse o valor desejado, a válvula **21** era gradualmente aberta, mantendo-se a válvula **10** ainda aberta, no sentido de ajustar o fluxo de antissolvente na câmara de precipitação, mantendo-se a pressão constante. Neste momento também era possível regular a vazão de CO<sub>2</sub> que era mantida constante durante todo experimento.

Para controlar a pressão dentro da câmara foi realizado o ajuste através da válvula **21** e o monitoramento pelo visor do controlador de pressão. Como dependendo da condição experimental o congelamento da válvula **21** era pronunciado, a mesma foi envolta por uma fita de aquecimento ligada ao controlador de temperatura. A temperatura foi mantida em 200°C para evitar o bloqueio do fluxo neste ponto pelo congelamento.

Quando a temperatura e pressão estavam constantes o CO<sub>2</sub> era deixado fluir até alcançar o estado estacionário. O tempo necessário para alcançar este estado variou de 5 a 10 minutos dependendo da pressão e temperatura de precipitação. A partir do momento em que o fluxo de

CO<sub>2</sub> entrava em regime estacionário se iniciava então a injeção da solução para dentro da câmara de precipitação. Em cada experimento o volume de solução adicionado à câmara foi de 45 mL. O volume foi fixado neste valor assumindo que a quantidade de sólido (extrato de uva, astaxantina ou bixina) a ser precipitado era suficiente para a realização das análises de caracterização e eficiência de encapsulamento.

Após ter sido injetado o volume especificado da solução, a bomba de HPLC era desligada e o fluxo da solução interrompido. Para efetuar a “secagem” das partículas precipitadas e retirar o solvente residual, o fluxo de CO<sub>2</sub> era mantido constante em 20 mL.min<sup>-1</sup> por aproximadamente 120 minutos, baseado em trabalhos na literatura que reportam tempos de secagem variando entre 30 e 120 minutos (KIM et al., 2007; KANG et al., 2008; HONG et al., 2009). Em uma condição para a coprecipitação do ESU e PHBV foi utilizado maior tempo de secagem para avaliar este efeito sobre a formação das partículas.

Depois de proceder à secagem das partículas, o fluxo de CO<sub>2</sub> era interrompido pela válvula **10** que era mantida fechada. Iniciava-se a despressurização da câmara de precipitação até a pressão atmosférica, através da abertura lenta da válvula **21**, evitando assim o arraste de partículas. Este procedimento levou em torno de 40 minutos, mantendo-se a temperatura constante no valor estipulado.

Terminada a despressurização, a temperatura do experimento era diminuída através do banho **17** e em seguida eram desconectadas as linhas da câmara de precipitação e iniciava-se o procedimento de abertura da mesma para a retirada do material precipitado. As partículas precipitadas foram retiradas cuidadosamente e colocadas em frascos âmbar de 5 mL. As amostras foram coletadas na parede, no fundo e na tampa da câmara de precipitação. A retirada foi realizada rapidamente para evitar ao máximo que as partículas absorvessem umidade, e posteriormente, foram armazenadas em geladeira ao abrigo da luz e umidade.

### 3.4. SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS UTILIZADAS

A literatura aponta que o mecanismo de precipitação nas técnicas antissolvente, depende das condições de operação tais como, pressão e temperatura de precipitação, concentração de sólido na solução orgânica e vazão de solução e de antissolvente, sendo que os valores destes parâmetros de processo é que determinam as características das



partículas precipitadas, como tamanho, distribuição de tamanho e morfologia (LENGSFELD et al., 2000).

Segundo Franceschi et al. (2009a), quando se trata do encapsulamento de princípios ativos, uma condição primordial para o sucesso dos experimentos é que as partículas precipitadas do material a ser encapsulado sejam menores do que as do material encapsulante. Por isso estes autores realizaram testes de precipitação de um agente encapsulante (PHBV) e do composto a ser encapsulado ( $\beta$ -caroteno) em separados. Desta forma, os valores dos parâmetros de processo foram selecionados com base na condição experimental de precipitação que gerou menor tamanho de partícula para o  $\beta$ -caroteno e maior tamanho de partícula para o PHBV.

Já para o extrato de semente de uva, Cesaro (2010) tentou realizar a precipitação dele puro através de técnicas supercríticas. O autor verificou que não houve precipitação do extrato, ocorrendo ainda acúmulo do mesmo no fundo da câmara. Além disso, o autor avaliou o perfil de solubilidade do extrato em diclorometano obtendo resultados de  $17 \text{ mg.mL}^{-1}$  à  $25^\circ\text{C}$ .

Desta forma, mostrou-se necessário realizar a coprecipitação do extrato de semente uva e de PHBV em diclorometano e não dos mesmos separadamente. Da mesma maneira foi realizada para a astaxantina e a bixina. Assim, foram montados três conjuntos de experimentos (um para cada composto em estudo) variando-se os parâmetros experimentais da seguinte forma:

- (1) Extrato de semente de uva: pressão de precipitação (80 - 120bar), razão mássica entre extrato de semente de uva e polímero na solução orgânica (1:1, 1:2 e 1:3) e temperatura de precipitação ( $35 - 45^\circ\text{C}$ ). Foi realizado também um experimento variando-se a quantidade de  $\text{CO}_2$  para secagem. A concentração de PHBV foi mantida constante em  $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A Tabela 1 mostra o delineamento experimental utilizado para o extrato de semente de uva. Os parâmetros foram escolhidos baseando-se em trabalhos realizados no grupo de trabalho (FRANCESCHI et al., 2009 (a) FRANCESCHI et al., 2009 (b); PRIAMO et al. 2010; CESARO 2010, DALMOLIN et al., 2010). As soluções orgânicas foram preparadas de acordo com a solubilidade do ESU em diclorometano ( $17 \text{ mg.mL}^{-1}$  à  $25^\circ\text{C}$ ).

Tabela 1 – Condições experimentais de coprecipitação do extrato de semente de uva e PHBV em diclorometano com as variáveis utilizadas.

Exp.	T (°C)	P (bar)	Relação massa ESU:PHBV	Concentração de ESU (mg.mL <sup>-1</sup> )	Concentração de PHBV (mg.L <sup>-1</sup> )
<b>1</b>	35	80	1:1	20,00	20,00
<b>2</b>	35	80	1:3	6,69	20,01
<b>3</b>	35	120	1:1	20,00	20,00
<b>4</b>	35	120	1:3	6,70	20,02
<b>5</b>	40	80	1:3	6,67	20,03
<b>6</b>	40	80	1:2	10,02	20,00
<b>7</b>	40	80	1:1	20,02	20,02
<b>8</b>	40	100	1:2	10,03	20,03
<b>9</b>	40	100	1:2	10,01	20,03
<b>10</b>	40	100	1:2	10,02	20,01
<b>11*</b>	40	100	1:2	10,05	20,02
<b>12</b>	45	80	1:1	20,02	20,02
<b>13</b>	45	80	1:3	6,69	20,01
<b>14</b>	45	120	1:1	20,00	20,00
<b>15</b>	45	120	1:3	6,67	20,00

\* O experimento 11 foi realizado nas mesmas condições que 8, 9 e 10, mas com maior tempo de secagem (3L de CO<sub>2</sub>) para analisar um possível efeito do tempo de secagem na morfologia das partículas.

(2) Astaxantina: pressão de precipitação (80-100bar), concentração de astaxantina na solução orgânica (5, 8 e 10 mg.mL<sup>-1</sup>), e mantida a temperatura de precipitação constante em 35°C e a concentração de PHBV em 20 mg.mL<sup>-1</sup>. A Tabela 2 mostra o delineamento experimental utilizado para Astaxantina. Foram realizados apenas seis experimentos para verificar a possibilidade de encapsulamento da astaxantina extraída intracelularmente das microalgas *H. pluvialis* utilizando técnicas supercríticas.

Tabela 2 – Condições experimentais de coprecipitação da astaxantina e PHBV em diclorometano com as variáveis utilizadas.

<b>Experimento</b>	<b>T (°C)</b>	<b>P (bar)</b>	<b>Concentração de Astaxantina (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração de PHBV (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>
1	35	80	5,00	20,00
2	35	80	8,01	20,02
3	35	80	10,0	20,02
4	35	100	5,02	20,01
5	35	100	8,00	20,02
6	35	100	10,0	20,00

(3) Bixina: pressão de precipitação (80-100bar), concentração de bixina na solução orgânica (0,4 - 1 g.L<sup>-1</sup>), temperatura de precipitação (35 e 40°C) e concentração de PHBV na solução orgânica (2, 5 e 20 mg.mL<sup>-1</sup>). A Tabela 3 mostra o delineamento experimental utilizado para bixina. As condições experimentais foram baseadas segundo Suo et al. (2005) que realizaram a micronização da bixina pela mesma técnica. Em relação a concentração de PHBV na solução, inicialmente baseou-se na concentração constante utilizada para o ESU e Astaxantina. No entanto, os resultados de eficiência de encapsulamento preliminares foram baixos, por isto optou-se por variar também a concentração do polímero na solução orgânica. Nas condições com baixa concentração de PHBV foram utilizadas maiores quantidades de solução orgânica e CO<sub>2</sub> para secagem para obtenção de amostra suficiente para as posteriores análises.

Tabela 3 – Condições experimentais de coprecipitação da bixina e PHBV em diclorometano com as variáveis utilizadas.

<b>Experimento</b>	<b>T (°C)</b>	<b>P (bar)</b>	<b>Concentração de Bixina (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração de PHBV (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>
1	35	80	0,6	20,02
2	35	100	0,6	19,88
3	40	80	0,6	20,87
4	40	100	0,6	19,78
5	35	80	0,8	20,24
6	35	100	0,8	20,04
7	40	80	0,8	20,18
8	40	100	0,8	20,13
9	35	80	1,0	20,04
10	40	80	1,0	20,09
11	35	80	0,4	20,02
12*	35	80	0,6	5,01
13*	35	80	0,6	2,03
14*	40	80	0,6	2,06
15*	35	80	0,6	1,00

\* Experimentos onde foi utilizada maior quantidade de solução e CO<sub>2</sub> (±80 mL e 2,5L de CO<sub>2</sub> para secagem) devido à diminuição drástica da concentração de PHBV, resultando em menores quantidades de amostra.

Para todos os compostos estudados foram mantidas fixas ainda as seguintes condições:

- Vazão da solução orgânica (1 mL.min<sup>-1</sup>);
- Vazão de alimentação do antissolvente (20 mL.min<sup>-1</sup>) para a câmara de precipitação;
- Vazão de secagem com antissolvente (20 mL.min<sup>-1</sup>);
- Volume de antissolvente (CO<sub>2</sub>) para secagem (2L) - com exceção dos experimentos 12, 13 e 14 da bixina onde foram passados 2,5L em função de terem sido utilizados maiores volumes de solução;
- Pressão de alimentação do antissolvente (200bar);

- Volume de solução orgânica (diclorometano + PHBV + composto) na câmara de precipitação (45 mL) - com exceção dos experimentos 12, 13 e 14 da bixina onde foram passados 80 mL devido a baixa concentração de PHBV na solução orgânica e em consequência formação de menor quantidade de amostra; Temperatura da câmara de precipitação para abertura e retirada da amostra (20°C).

### 3.5. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

A morfologia das partículas de extrato de semente de uva, de astaxantina e de bixina encapsuladas em PHBV foi avaliada por observação visual das micrografias de MEV e/ou FEG obtidas para todas as condições experimentais de formação de partículas testadas. As análises necessárias para a obtenção das micrografias das partículas do Extrato de semente de uva foram realizadas no laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Química da UNICAMP - SP. Foi utilizado um aparelho de Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectrometria de Energia Dispersiva (MEV/EDS), com filamento de tungstênio marca JEOL, modelo JSM-T300. As amostras precipitadas foram manualmente dispersas sobre fitas condutoras dupla-face e dispostas em porta-amostra de alumínio, recobertas com uma fina camada de ouro utilizando um aparelho metalizador e então analisadas.

A morfologia das partículas de astaxantina e de bixina foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, com um Microscópio Eletrônico marca JEOL, modelo JSM-6390LV (MEV) para astaxantina e Microscópio Eletrônico de Varredura marca JEOL, modelo JSM-6701F (FEG) para bixina. Foi utilizada a análise de FEG para bixina devido à degradação das partículas utilizando o equipamento de MEV. O procedimento de análise empregado foi o mesmo procedimento citado anteriormente para o extrato de semente de uva.

A partir das micrografias de MEV/FEG, procedeu-se a determinação do tamanho das partículas dos solutos (extrato de semente de uva, astaxantina e bixina) coprecipitadas utilizando o *software Size Meter* versão 1.1 (CARLSON; BOLZAN, 2001). O método consiste na avaliação das medidas do comprimento e da espessura (maior medida característica) para aproximadamente 600 a 700 partículas para cada condição experimental testada para cada sistema. Seguindo a

recomendação do autor do *software*, adotou-se como critério de avaliação a maior dimensão característica das partículas, ou seja, se as partículas apresentavam como maior tamanho característico o comprimento, este era medido e assim por diante. Assim foi possível obter o tamanho real da partícula. Além das medidas de tamanho característico ainda foi calculado seus respectivos desvios padrão e variância.

### 3.6. DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL REAL DE ENCAPSULAMENTO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

A determinação do teor de material encapsulado (extrato de semente de uva, astaxanatina e bixina) foi realizada por espectrometria na região UV visível. Esta metodologia foi empregada por Franceschi et al. (2009a) e também é utilizada em outros trabalhos na literatura (HONG et al., 2007; HE et al., 2007; MAJERIK et al., 2007).

Nesta metodologia, a determinação do percentual e da eficiência de encapsulamento se dá através da suspensão de determinada massa do coprecipitado (princípio ativo e polímero) em um solvente capaz de dissolvê-los, e posteriormente quantificar este material encapsulado através de leituras no espectrofotômetro UV-VIS.

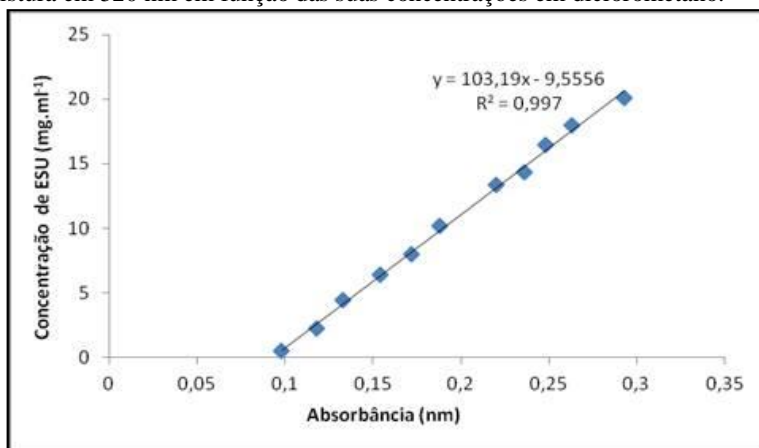
Foi construída uma curva padrão (calibração) para cada composto estudado neste trabalho utilizando o diclorometano como solvente. Primeiramente foi realizada uma varredura de cada composto obtendo-se o comprimento de onda onde ocorre a maior absorção no UV-VIS. Após estipulado o valor de comprimento de onda para cada composto foi realizada a curva de calibração utilizando soluções com diferentes concentrações em diclorometano para os três princípios ativos. Estas soluções dos compostos em diclorometano foram preparadas de modo que abrangesse toda a concentração utilizada deles na etapa de encapsulamento.

Foram realizadas duas curvas de calibração para cada composto. Uma com o princípio ativo de interesse puro em diclorometano e outra com o composto de interesse e o polímero utilizado em diclorometano. Isto foi realizado para verificar uma possível influência do PHBV na absorbância máxima obtida na leitura do espectrofotômetro. Notou-se que praticamente não havia interferência do PHBV nas leituras de absorbância máxima, por isso, optou-se por fazer as análises com as curvas de calibração que apresentavam o composto puro. Isto foi observado também por Franceschi, (2009) para construção da curva de

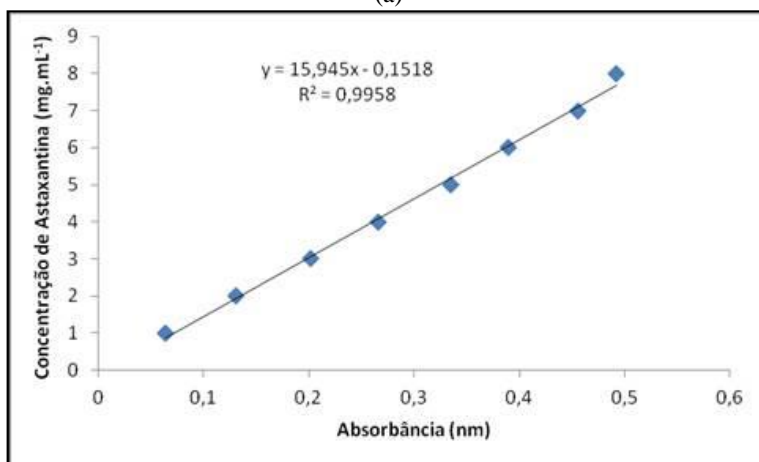
calibração de  $\beta$ -caroteno puro e para a mistura  $\beta$ -caroteno e PHBV. Ele constatou que a presença de PHBV na solução não tinha efeito significativo nos valores de absorvância máxima do  $\beta$ -caroteno.

A Figura 16 mostra as curvas de calibração (padrão) dos compostos puros utilizados nos ensaios de precipitação. Na Figura 16 (a) é apresentado o resultado para o extrato de semente de uva, na Figura 16 (b) para a astaxantina e na Figura 16 (c) para a bixina.

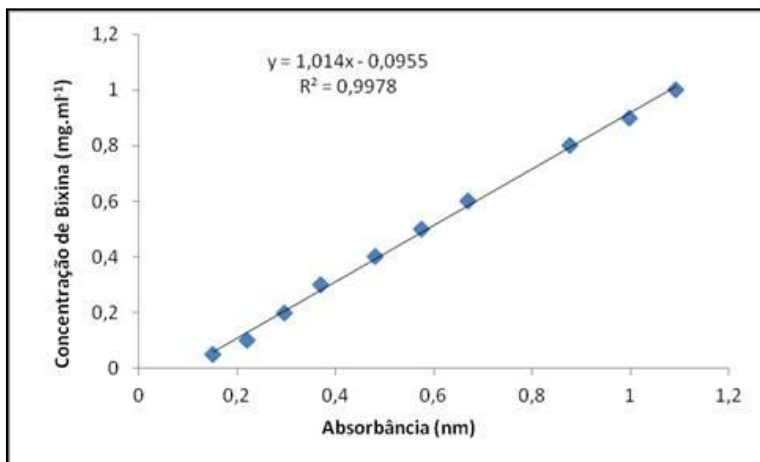
Figura 16 – Curva padrão de absorvância de (a) Extrato de semente de uva na mistura em 410 nm, (b) astaxantina na mistura em 455 nm e (c) bixina na mistura em 520 nm em função das suas concentrações em diclorometano.



(a)



(b)



(c)

Através das curvas de calibração foram realizados os cálculos de percentual real (PRE) e eficiência de encapsulamento (EE). Para a adequada determinação do percentual de encapsulamento foi realizada a lavagem das partículas evitando que algum material não encapsulado (substância ativa), aderido na superfície das cápsulas, fosse contabilizado na eficiência de encapsulamento, interferindo no resultado real.

O procedimento de lavagem foi realizado com etanol onde determinada massa de amostra ( $\pm 0,10\text{g}$ ) foi submetida à lavagem com aproximadamente 10 mL de etanol em agitação manual por 30 segundos. Este solvente foi escolhido devido à alta solubilidade dos compostos que poderiam não estar encapsulados no mesmo, e a não solubilização do polímero no etanol, evitando assim o rompimento das cápsulas. Após a lavagem a solução era filtrada com o auxílio de um filtro de politetrafluoretileno, ligado a um suporte de polietileno de alta densidade (Marca Millipore, Modelo FGLP) com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ . O sólido retido no filtro foi seco por 24 horas em temperatura ambiente e pesado para posterior análise.

Para as análises em espectrofotômetro, determinada massa de amostra coprecipitada de cada condição experimental, lavada e seca, foi pesada ( $\pm 0,100\text{g}$ ) em balança analítica (AY220 Shimadzu) e adicionados 10 mL de diclorometano. Este solvente foi utilizado por ser capaz de solubilizar o polímero e o composto de interesse, e a solução



resultante foi analisada em um Espectrofotômetro de UV-VIS 800XI FEMTO nas faixas de comprimento de onda de 410 nm para o extrato de semente de uva, 455 nm para a astaxantina e 520 nm para a bixina. As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Supercrítica (LATESC) da Universidade Federal de Santa Catarina.

A partir dos resultados de absorvância do extrato de semente de uva, da astaxantina e da bixina, obtidas em espectrofotômetro UV-VIS, para cada condição experimental, foram determinadas as concentrações destes componentes em diclorometano a partir das curvas de calibração (Figura 16 (a), 16 (b) e 16 (c)).

Com os valores de concentração e sabendo-se o volume de diclorometano no preparo de cada solução, foi possível obter a massa de extrato de semente de uva, de astaxantina e de bixina. Com os valores da massa de cada composto em cada amostra analisada, e da massa conhecida do coprecipitado após a filtração e secagem, determinou-se o percentual real de encapsulamento (PRE) e a eficiência de encapsulamento (EE) para cada condição experimental, através das Equações a seguir (KALOGIANNIS et al., 2006):

$$PRE \% = \frac{\text{massa do composto encapsulado}}{(\text{massa composto} + \text{massa PHBV}) \text{ após filtração}} \times 100 \quad (1)$$

$$EE \% = \frac{\text{percentual do composto encapsulado}}{\text{percentual teórico de encapsulamento}} \times 100 \quad (2)$$

onde, o percentual teórico de encapsulamento é a razão entre a massa do composto e a soma das massas do composto analisado e PHBV utilizadas nos experimentos do coprecipitação. Este percentual corresponde ao percentual máximo de encapsulamento de extrato de semente de uva, de astaxantina e de bixina em PHBV.

## CAPÍTULO 4

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos, os quais são pertinentes para encapsulamento dos princípios ativos, além de uma proposta exploratória de ampliação de produção de nano/micropartículas através da técnica SEDS.

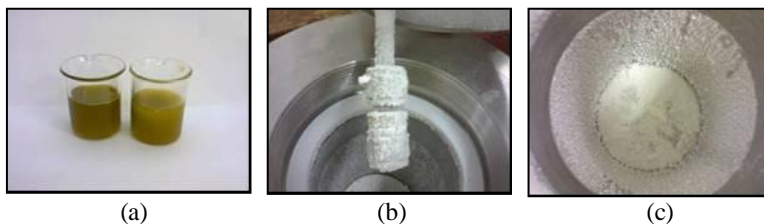
#### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

A análise morfológica das partículas dos três compostos estudados foi realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e (FEG), conforme descrito no item 3.6, após a limpeza das partículas (lavagem) com etanol. Esse material que não está encapsulado precisa ser retirado e é um parâmetro importante na determinação da qualidade do produto, pois as partículas presentes ao redor das cápsulas continuam sujeitas aos processos de degradação como a oxidação, levando, portanto à redução da qualidade do material e diminuindo a aceitabilidade do produto em que ele seja utilizado (DRUSCH; BERG, 2008).

##### 4.1.1. Caracterização das partículas e eficiência de encapsulamento do extrato de semente de uva

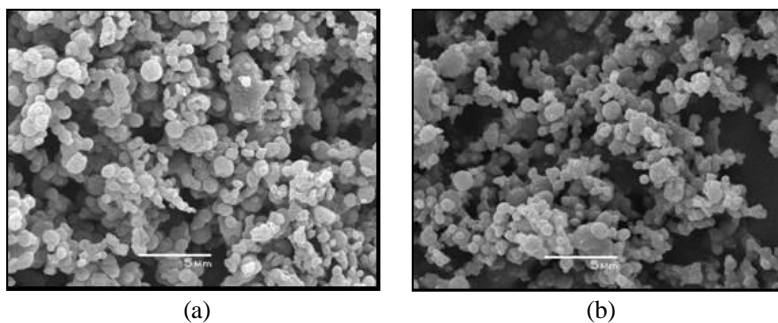
A Figura 17 ilustra a câmara de precipitação e encapsulamento aberta com as partículas de extrato de semente de uva formadas nas condições citadas no item 3.5, e o extrato bruto.

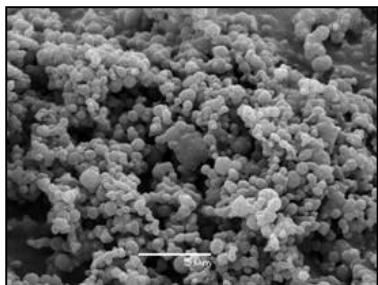
Figura 17 – Fotografias de: (a) Extrato de semente de uva bruto (b) Tampa e Suporte do filtro cobertos de partículas e (c) Câmara de precipitação e encapsulamento aberta com as partículas de ESU + PHBV formadas.



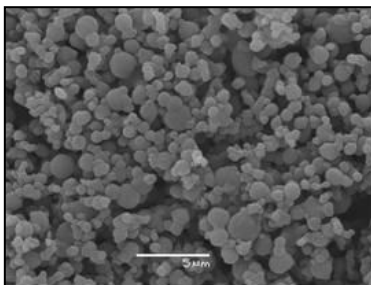
A morfologia das partículas encapsuladas de ESU em PHBV é de grande importância para a sua funcionalidade e, dependendo da condição adotada, as partículas apresentam diferentes características morfológicas. Sendo assim, visando observar o efeito das condições de processo na morfologia das partículas de ESU encapsulado em PHBV, a Figura 18 apresenta as micrografias obtidas empregando as condições dos experimentos 1, 2, 3, 8, 9, e 10, respectivamente, conforme listado na Tabela 1 (Capítulo 3).

Figura 18 – Micrografias das partículas de extrato de semente de uva em PHBV nas condições de: (a) Experimento 1 – 35°C, 80 bar, relação ESU:PHBV 1:1; (b) Experimento 2 – 35°C, 80 bar, relação ESU:PHBV 1:3; (c) Experimento 3 – 35°C, 120 bar, relação ESU:PHBV 1:1; (d) Experimento 8 – 40°C, 100 bar, relação ESU:PHBV 1:2; (e) Experimento 9 – 40°C, 100 bar, relação ESU:PHBV 1:2 e (f) Experimento 10 – 40°C, 100 bar, relação ESU:PHBV 1:2.

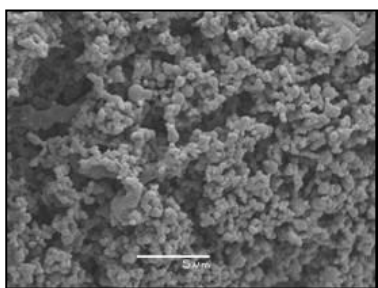




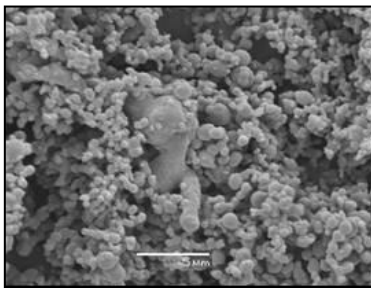
(c)



(d)



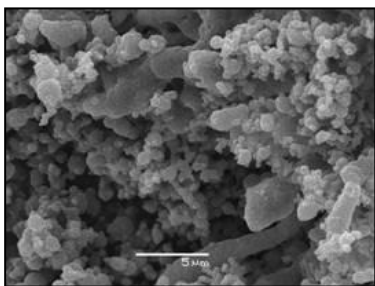
(e)



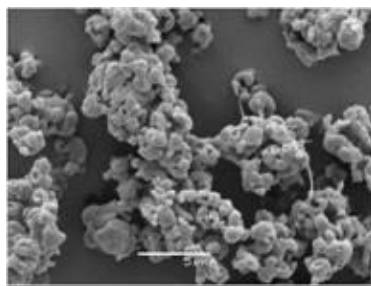
(f)

Na sequência a Figura 19 apresenta as micrografias dos experimentos 4, 5, 6, 7, 11\*, 12, 13, 14 e 15 respectivamente, segundo o plano de ensaios descrito na Tabela 1 (Capítulo 3).

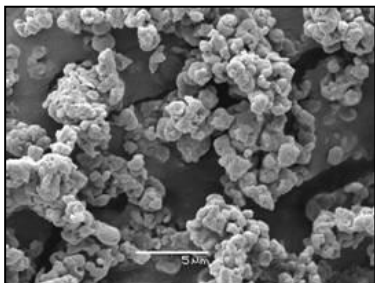
Figura 19 – Micrografias: (a) Experimento 4 – 35°C, 120 bar, relação ESU:PHBV 1:3; (b) Experimento 5 – 40°C, 80 bar, relação ESU:PHBV 1:3; (c) Experimento 6 – 40°C, 80 bar, relação ESU:PHBV 1:2; (d) Experimento 7 – 40°C, 80 bar, relação ESU:PHBV 1:1; (e) Experimento 11\* – 40°C, 100 bar, relação ESU:PHBV 1:2, maior secagem; (f) Experimento 12 – 45°C, 80 bar, relação ESU:PHBV 1:1; (g) Experimento 13 – 45°C, 80 bar, relação ESU:PHBV 1:3; (h) Experimento 14 – 45°C, 120 bar, relação ESU:PHBV 1:1 e (i) Experimento 15 – 45°C, 120 bar, relação ESU:PHBV 1:3.



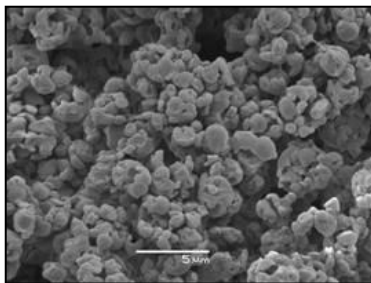
(a)



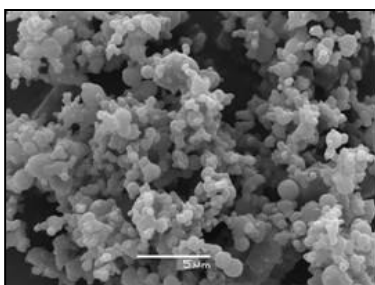
(b)



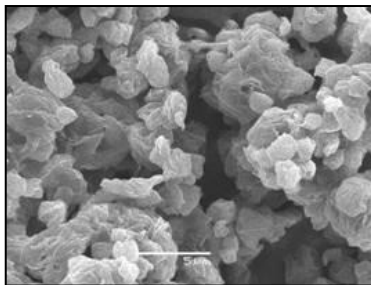
(c)



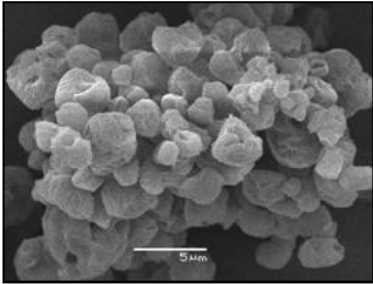
(d)



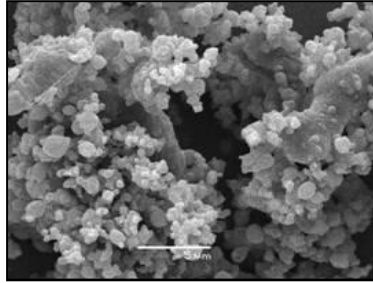
(e)



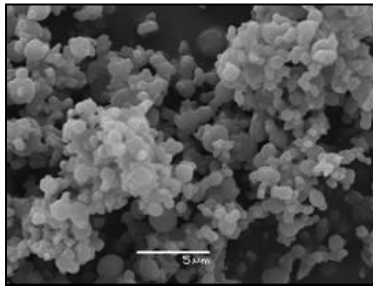
(f)



(g)



(h)



(i)

Como pode-se notar pelas análises de MEV, nas condições apresentadas na Figura 18 foram obtidas partículas com morfologia esférica. Os demais experimentos (Figura 19) apresentaram a formação de partículas aglomeradas, com formas irregulares, ocorrendo ainda a formação de fibras poliméricas.

Segundo Reverchon et al. (2008) os pesquisadores que estudam a formação de partículas almejam a obtenção de morfologias esféricas, devido as grandes possibilidades de aplicação industrial deste tipo de partícula. Como exemplo pode ser citado a utilização de microesferas de polímero como fase estacionária em cromatografia, bem como em sistemas de liberação controlada de princípios ativos (REVERCHON et al., 2008).

Varona et al. (2013) realizaram três procedimentos para encapsular óleo de lavanda verificando sua atividade antibacteriana, com processos envolvendo técnicas com fluidos supercríticos (PGSS, PGSS-*drying*) e convencionais (*spray drying*). O processo de PGSS-*drying* foi o que resultou em partículas esféricas e estas apresentaram uma atividade antibacteriana muito maior do que os processos onde foram obtidas partículas irregulares. Além disso, os autores

comprovaram que a tecnologia com CO<sub>2</sub> supercrítico apresenta a vantagem de não ocorrer degradação do óleo, um importante aspecto para preservar a alta atividade antibacteriana das partículas obtidas.

Se forem comparadas as micrografias em relação à morfologia das partículas, obtiveram-se tanto partículas esféricas (Figura 18) quantas partículas aglomeradas e fibrosas (Figura 19) em todas as concentrações da solução orgânica (1:1, 1:2 e 1:3). Esta observação evidencia que a temperatura e a pressão foram as variáveis que apresentaram maior influência nas mudanças de morfologia das partículas coprecipitadas de ESU e PHBV.

Isto é confirmado por Cocero e Ferrero (2002), ao afirmar que a expansão volumétrica da fase líquida (a causa da precipitação) depende das condições operacionais de temperatura e pressão. Essas variáveis são dependentes entre si e a seleção de uma implica a escolha da outra para a obtenção de uma expansão volumétrica apropriada.

Ao comparar as Figuras 18 e 19 é possível notar que em algumas condições em que a temperatura é aumentada, prevalece a tendência de aglomerações, partículas irregulares e fibras, comportamento contrário quando a temperatura é menor. Isto pode ser afirmado quando verificada a Figura 18 (a, b, c) que nas menores temperaturas utilizadas (35°C) foram obtidas partículas esféricas. A única exceção utilizando a mesma temperatura foi no experimento 4 (Figura 19-a) onde foram obtidas partículas fibrosas, provavelmente devido há alguma oscilação no decorrer do experimento, já que nesta condição era difícil o controle de pressão devido ao efeito Joule-Thomson pronunciado.

Já nos experimentos que utilizaram 40°C foram obtidas partículas esféricas para os experimentos em triplicata (Figura 18-d,e,f) e partículas aglomeradas para os experimentos onde foram utilizadas as mesmas temperaturas (Figura 19-b,c,d). No entanto, para os experimentos da Figura 19 foi utilizada uma pressão menor (80bar) evidenciando também o efeito da pressão na morfologia das partículas. Em menores pressões pode ter diminuído a solubilidade do extrato no solvente (VARONA et al., 2010), aumentando a viscosidade da solução e afetando a transferência de massa, gerando aglomerados (COSTA et al., 2007).

Em contapartida, no experimento 11\* (Figura 19-e) onde foram utilizadas as mesmas condições dos experimentos de triplicata (Figura 18-c,d,e), variando apenas a quantidade de CO<sub>2</sub> para secagem das partículas, a morfologia obtida também foi de aglomeração. Isto ocorreu provavelmente devido ao aumento de colisões entre as partículas formadas pelo aumento da quantidade de CO<sub>2</sub>, causando aglomerados.

Quando são analisadas as maiores temperaturas utilizadas (45°C-Figura 19-f,g) com menores pressões, há formação de partículas aglomeradas e irregulares. Nas condições com maiores temperaturas (45°) e maiores pressões (120 bar Figuras 19-h,i) apenas aglomerações.

A ocorrência de partículas irregulares e aglomeradas devido ao aumento das temperaturas podem ser explicadas segundo Cocero e Ferrero (2002), que versam a possível ocorrência de uma redissolução destas partículas em temperaturas mais elevadas. Os autores afirmam ainda que baixos valores de temperatura implicam em menor aglomeração e menor crescimento de cristais comparado com temperaturas mais altas de operação, resultando em maior tamanho dos cristais obtidos.

Resultados semelhantes foram observados por Kessler e Mazzotti, (2000) e Kalogiannis et al. (2006), que também demonstraram que a coalescência pode ser produzida pela interação do solvente que está dissolvido no antissolvente supercrítico com as partículas de soluto.

A formação de fibras e partículas aglomeradas pode ser devido a viscosidade das soluções. Se as soluções estiverem com alta viscosidade, isto implica em um aumento nas forças de cisalhamento dificultando a difusão do CO<sub>2</sub> para dentro das gotículas formadas na dispersão da solução. Assim, a evaporação do solvente orgânico das gotículas pela ação do CO<sub>2</sub> é mais afetada causando um decréscimo na taxa de transferência de massa, e de acordo com a cinética de precipitação, gerando partículas maiores ou aglomeradas (COSTA et al., 2007).

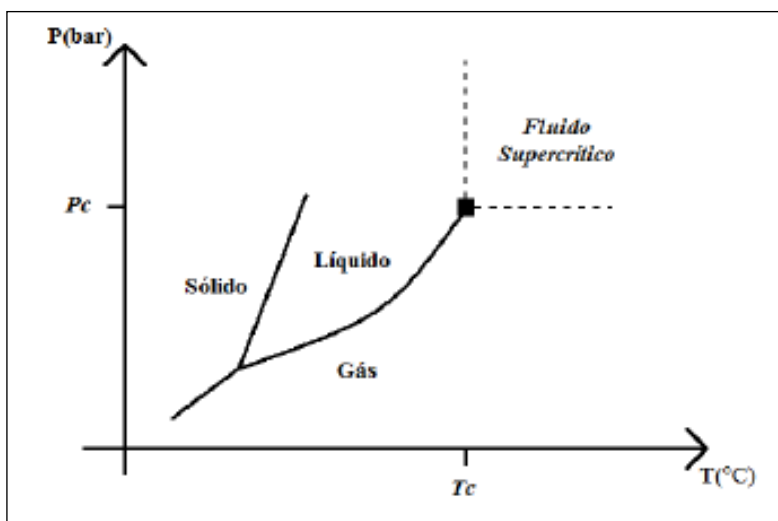
A obtenção de partículas esféricas em temperaturas mais brandas de operação é muito importante, pois reduz a degradação do produto natural (ESU), e em termos industriais pode ser reduzida a energia fornecida e o custo inicial com o equipamento (espessura de parede) (COCERO; FERRERO, 2002).

Em se tratando da técnica SEDS recomenda-se, em geral, que a pressão de operação dentro na câmara de precipitação, numa dada temperatura de experimentação, esteja localizada na região de uma única fase no diagrama de fases envolvendo o soluto, o solvente e o antissolvente, evitando assim a coexistência das fases líquida e vapor (conforme pode ser ilustrado pela Figura 20, que mostra o diagrama de fases de uma substância pura). Assim, se torna relevante o estudo de equilíbrio de fases do sistema de interesse. No grupo de trabalho foram realizados estudos sobre o equilíbrio de fases do sistema binário CO<sub>2</sub> + DCM por Corazza et al. (2003) e por Dalmolin (2013) para o sistema pseudo-ternário CO<sub>2</sub> + DCM + ESU. O comportamento do diagrama de



fases obtido por Dalmolin, (2013) é praticamente idêntico ao sistema binário  $\text{CO}_2$  + DCM obtido por Corazza et al. (2003), não havendo interferência pela presença do ESU (concentração máxima estudada de  $15 \text{ kg.m}^{-3}$ ). Assim, para o sistema contendo o ESU a precipitação deve ocorrer onde se apresenta uma única fase do sistema binário  $\text{CO}_2$  + DCM (visto que o ESU não interfere no sistema), assim o solvente e antissolvente são totalmente miscíveis.

Figura 20 - Diagrama Pressão *versus* temperatura para uma substância pura, (TP) ponto triplo; (CP): ponto crítico; ( $P_c$ ) pressão crítica e ( $T_c$ ) temperatura crítica.

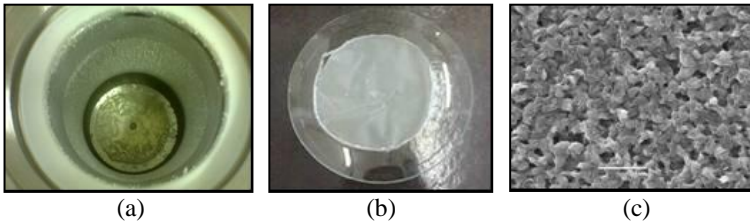


FONTE: Reid, Prausntz e Poling, (1988); Sandler, (1989).

Quando a precipitação não ocorre na região de única fase no diagrama de fases, pode ocorrer a formação de filme como foi obtido para uma condição de trabalho ( $35^\circ\text{C}$  e  $80 \text{ bar}$ ) observado na Figura 21. Este resultado de obtenção de filme ao invés de partículas, pode ter ocorrido devido a oscilações de pressão e temperatura durante o experimento (já que esta condição é muito próxima ao ponto crítico do antissolvente), levando ao deslocamento para a região de equilíbrio líquido-vapor no diagrama de fases. Isto pode ser comprovado, visto que, nesta condição foi obtido um filme no fundo da câmara (Figura

21a), enquanto que na parte superior da parede e tampa a formação de partículas (Figura 21b).

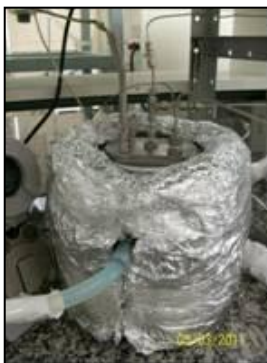
Figura 21 – Experimento na condição de 35°C, 80 bar, relação PHBV:ESU 1:1, na qual houve oscilações: (a) fotografia da câmara de precipitação após experimento com formação de filme polimérico na parte inferior e partículas nas paredes superiores da câmara; (b) fotografia do filme formado e (c) MEV do filme.



Através da análise de MEV do filme obtido (Figura 21 c), é possível perceber certa uniformidade na sua estrutura com poros distribuídos de forma ordenada. Este resultado obtido aponta certa relevância se considerando que novos produtos podem ser obtidos com a adição de compostos antioxidantes e antimicrobianos em filmes biodegradáveis através da tecnologia supercrítica.

Para que não ocorressem oscilações nos experimentos e consequente formação de filmes poliméricos, principalmente em condições próximas ao ponto crítico do  $\text{CO}_2$  ( $T_c = 31,1^\circ\text{C}$  e  $P_c = 73,8$  bar) foram realizadas algumas modificações no sistema, a fim de melhorar seu desempenho, diminuindo ao máximo as possíveis oscilações que ocorrem durante o processo. Sendo assim, foram isoladas termicamente as mangueiras dos banhos e colocado uma manta de fibra e alumínio em volta da câmara de precipitação para menor troca possível de calor com o ambiente, ilustrada na Figura 22).

Figura 22 – Fotografia da câmara de precipitação isolada termicamente através de uma manta de fibra de vidro.



Um comportamento observado para os experimentos 12, 13, 14 e 15 (Figura 19-f, g, h, i) onde eram utilizadas temperaturas maiores ( $45^{\circ}\text{C}$ ), foi a ocorrência de um leve amarelamento do filtro na saída da unidade, e também no algodão de recheio do *trap* de segurança. Este fato aponta que um provável arraste ou fracionamento do extrato pode ter ocorrido. Com o aumento da temperatura o ESU pode ter sido solubilizado no  $\text{CO}_2$  e assim ser carregado com o solvente (COSIJNS et al., 2009). Esta observação é de grande importância, visto que, como o extrato é multicomponente pode ocorrer o seu fracionamento. Nos demais experimentos isto não foi constatado levando a crer que nestas condições (Experimentos 1 à 11), houve menor ou nenhum arraste do extrato e que o mesmo está presente nas partículas coprecipitadas.

Após análise das micrografias foi realizada a medida do tamanho das partículas (Tabela 4). É importante ressaltar que as medidas foram realizadas do maior tamanho característico, ou seja, do comprimento ou espessura que se apresentassem como maior característica.

As medidas estão dispostas como tamanho mínimo ( $X_{\text{mínimo}}$ ), tamanho máximo ( $X_{\text{máximo}}$ ), tamanho médio ( $\bar{X}$ ) bem como seu respectivo desvio padrão ( $\sigma$ ) e coeficiente de variação (CV%).

Tabela 4 – Medidas de tamanho mínimo ( $X_{\text{mínimo}}$ ), tamanho máximo ( $X_{\text{máximo}}$ ), tamanho médio ( $\bar{X}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ) e coeficiente de variação (CV) das partículas de ESU e PHBV coprecipitadas.

Exp.	T (°C)	P (bar)	Relação	$X_{\text{mínimo}}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$X_{\text{máximo}}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$\bar{X}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]	CV (%)
			massa ESU:PHBV					
1	35	80	1:1	0,21	1,54	0,70	0,3	38
2	35	80	1:3	0,19	2,40	0,72	0,3	43
3	35	120	1:1	0,24	1,50	0,64	0,2	36
8	40	100	1:2	0,18	2,01	0,62	0,3	40
9	40	100	1:2	0,23	2,04	0,71	0,3	41
10	40	100	1:2	0,11	1,65	0,53	0,2	42

Observando os dados da Tabela 4 é possível verificar que não foram realizadas medidas para todas as condições experimentais, apenas das condições onde foram produzidas partículas esféricas e menos aglomeração. É constatado que o menor tamanho de partícula ( $\bar{X} = 0,53 \mu\text{m}$ ) foi obtido no experimento 10 e o maior tamanho de partícula ( $\bar{X} = 0,72 \mu\text{m}$ ) no experimento 2. Em relação à distribuição de tamanho de partícula observado pelo valor do desvio padrão e do coeficiente de variação, apresentados na Tabela 4, a condição experimental que apresentou uma distribuição mais estreita foi a 3 a qual apresentou um coeficiente de variação de 36% em torno do tamanho médio de partícula.

Na literatura não foram encontrados dados referentes à coprecipitação do extrato de semente de uva e PHBV, bem como dados sobre tamanho de partícula e distribuição de tamanho. Por esse motivo, no presente trabalho foi realizada uma comparação com os trabalhos já realizados em nosso grupo de pesquisa como os dados de Franceschi et al. (2009a) e de Priamo et al. (2010) que utilizaram a técnica SEDS para a precipitação do  $\beta$ -caroteno e do PHBV puros, onde foram obtidos coeficientes de variação semelhantes (25-59% e 23-57% respectivamente para precipitação de  $\beta$ -caroteno e de PHBV puros), e tamanhos de partículas para  $\beta$ -caroteno e PHBV da ordem de 3,8 - 246,8  $\mu\text{m}$  e de 2,18 - 51,89  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Os resultados obtidos para os coeficientes de variação para o ESU e PHBV coprecipitados (36-46%) estão dentro da faixa dos valores obtidos pelos autores citados anteriormente. No que diz respeito aos tamanhos de partículas, para o

ESU e PHBV coprecipitadas houve uma redução sensível nos tamanhos obtidos. Este comportamento pode ter sido devido a diferença de estado em que se encontram os compostos utilizados nos dois trabalhos ( $\beta$ -caroteno no estado sólido e ESU no estado líquido). O ESU por ser tratar de “líquido” pastoso e possivelmente por apresentar maior solubilidade do que o  $\beta$ -caroteno no antissolvente, pode conduzir a maiores valores de supersaturação, induzindo desta maneira a formação de partículas menores.

São poucos os trabalhos encontrados na literatura que versam sobre o encapsulamento de óleos ou de extratos em biopolímeros, principalmente referentes ao emprego de fluidos supercríticos como meio de coprecipitação. A maioria dos trabalhos trata a respeito de técnicas convencionais como Goula e Adamopoulos (2012), que utilizaram a técnica de spray drying para encapsulamento do óleo de semente de romã. Os autores obtiveram variação nos tamanhos médios de partícula entre 5,8 e 18,7  $\mu\text{m}$ .

Com relação à tecnologia supercrítica, no caso de óleos essenciais, Varona et al. (2009) utilizaram a tecnologia de Partículas de Soluções Saturadas de Gás (PGSS) para produzir partículas de polietilenoglicol (PEG) com óleo essencial de lavanda obtendo microcápsulas esféricas de tamanhos que variam entre 80 $\mu\text{m}$  e 130 $\mu\text{m}$ . Os autores também utilizaram este método para produzir microcápsulas de óleo de lavanda, neste caso utilizando amido como material de revestimento obtendo tamanho das partículas entre 15 $\mu\text{m}$  e 200 $\mu\text{m}$ , no entanto, não apresentaram resultados referentes ao coeficiente de variação das partículas obtidas.

Segundo Bakan (1973, *apud* King, 1993), o tamanho de partículas encapsuladas pode ser classificado em nanopartículas (< 0,2  $\mu\text{m}$ ), micropartículas (0,2–5000  $\mu\text{m}$ ) e macropartículas (> 5000  $\mu\text{m}$ ). Considerando os resultados da Tabela 4 o presente trabalho possibilitou a formação de partículas coprecipitadas com tamanho médio que variou de 0,53 a 0,72  $\mu\text{m}$ , que podem então ser consideradas do ponto de vista da engenharia como micropartículas ( $\bar{X} = 0,72 \mu\text{m}$ ).

Analisando os valores de tamanho de partículas obtidos é possível perceber que em maiores pressões (100 e 120 bar) há uma tendência em diminuir os valores de tamanho de partícula (Tabela 4, experimentos 3, 8 e 10). Este comportamento também foi observado por Franceschi et al. (2009a) e (2009b), para a precipitação do PHBV puro, onde com o aumento de pressão de 80 para 120 bar ocorria uma diminuição no tamanho médio das partículas precipitadas do polímero.

Na sequência a Tabela 5 apresenta os resultados referentes a eficiência de encapsulamento do extrato de semente de uva.

Tabela 5 – Resultados do percentual real de encapsulamento (PRE) e eficiência de encapsulamento (EE) do extrato de semente de uva encapsulado em PHBV.

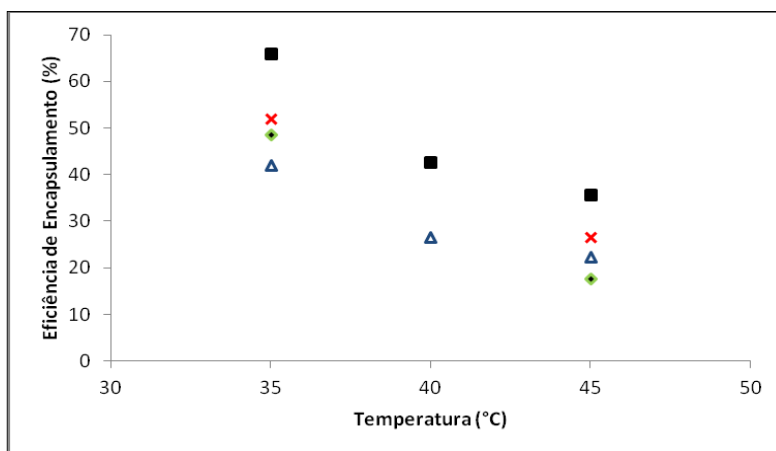
<b>Experimento</b>	<b>T (°C)</b>	<b>P (bar)</b>	<b>Relação massa ESU:PHBV</b>	<b>PRE (%)</b>	<b>EE (%)</b>
<b>1</b>	35	80	1:1	33,01	66,01
<b>2</b>	35	80	1:3	10,55	42,07
<b>3</b>	35	120	1:1	26,01	52,01
<b>4</b>	35	120	1:3	12,18	48,56
<b>5</b>	40	80	1:3	6,66	26,65
<b>6</b>	40	80	1:2	9,56	28,56
<b>7</b>	40	80	1:1	21,33	42,67
<b>8</b>	40	100	1:2	12,70	38,07
<b>9</b>	40	100	1:2	12,93	38,79
<b>10</b>	40	100	1:2	12,65	37,93
<b>11*</b>	40	100	1:2	12,44	37,26
<b>12</b>	45	80	1:1	17,86	35,72
<b>13</b>	45	80	1:3	5,62	22,40
<b>14</b>	45	120	1:1	13,26	26,52
<b>15</b>	45	120	1:3	4,45	17,79

\* Experimento com maior tempo de secagem (3L de CO<sub>2</sub>).

Conforme dados da Tabela 5 percebe-se que o maior valor obtido de percentual real de encapsulamento (PRE = 33,01%) e de eficiência de encapsulamento (EE = 66,01%) foram obtidos no experimento 1, onde foi adotada a menor pressão (80 bar), a menor temperatura (35°C) e a maior concentração de ESU na solução orgânica (ESU em relação à massa de PHBV de 1:1). Já os menores valores de PRE (4,45%) e de EE (17,79%) foram encontrados no experimento 14 que, ao contrário do experimento 1, foram obtidos nas maiores temperaturas, pressões e menores concentrações de ESU na solução orgânica.

É possível perceber a influência dos três parâmetros (temperatura, pressão e concentração de ESU na solução orgânica) na percentagem real e eficiência de encapsulamento. A Figura 23 mostra a influência da concentração do ESU na solução orgânica e da temperatura sobre a EE, mantendo a pressão fixa.

Figura 23 – Eficiência de encapsulamento em função da temperatura de precipitação e concentração de ESU na solução orgânica: ■ 80 bar e concentração de ESU de 1:1; ▲ 80 bar e concentração de ESU 1:3; X 120 bar e concentração de ESU 1:1; ◆ 120 bar e concentração de ESU 1:3.



A Figura 23 mostra os resultados de eficiência de encapsulamento de ESU em PHBV para as três isotermas (35, 40 e 45°C), variando a concentração de ESU na solução orgânica (1:1 e 1:3) em condições fixas de pressão (80 e 120 bar), onde é possível observar que a eficiência de encapsulamento aumenta com o aumento da concentração de ESU na solução para todas as isotermas. Este comportamento também foi observado por Priamo et al. (2010) quando era aumentada a concentração de  $\beta$ -caroteno nos experimentos de coprecipitação em PHBV. Franceschi et al. (2009a) também observaram para o  $\beta$ -caroteno que o aumento da sua concentração implicava no aumento da eficiência de encapsulamento.

O aumento da eficiência de encapsulamento com o aumento da concentração do ESU na solução orgânica pode ser devido à cinética de precipitação ser mais rápida em maiores concentrações do princípio ativo, e ocorrer a precipitação simultânea do polímero e do ESU,

resultando no seu encapsulamento. Já quando a concentração do princípio ativo é menor, a cinética de precipitação é mais lenta, sendo obtidas mais partículas de polímero do que do extrato, acarretando na sua precipitação na superfície das partículas de PHBV (FRANCESCHI, 2009).

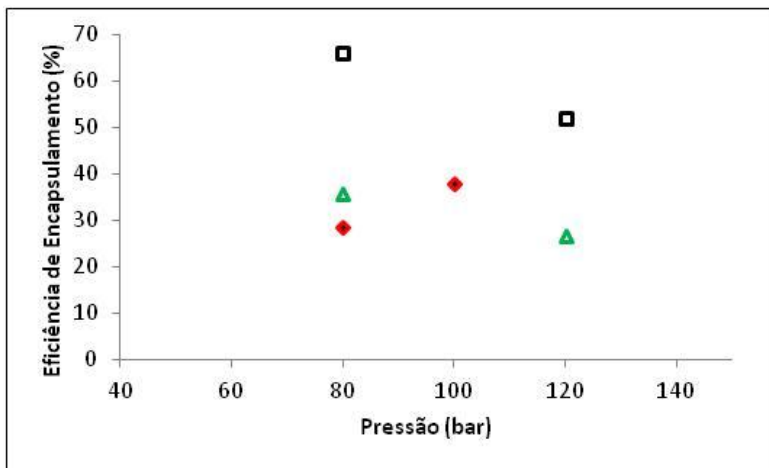
Segundo De Paz et al. (2012) a eficiência de encapsulamento pode estar vinculada também a concentração do agente encapsulante (que neste caso foi mantida fixa em  $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Se esta concentração for alta, pode envolver mais facilmente as partículas ou gotículas de extrato. Este comportamento é também comprovado pela etapa de lavagem das cápsulas coprecipitadas de ESU e PHBV, onde não foi observado extrato precipitado ao redor delas.

Provavelmente então, o ESU que não foi encapsulado, foi carregado junto com o solvente (compostos com alta volatilidade), confirmado pelo amarelamento do filtro de saída de unidade e algodão de recheio do *trap* de segurança, como citado anteriormente. Através da Figura 21 é possível também verificar a influência da temperatura na EE. Quando é aumentada a temperatura, diminui a EE. Segundo Cosijns et al. (2009) o aumento da temperatura faz com que as interações entre o solvente supercrítico e o extrato sejam mais fortes do que as interações entre o extrato e o polímero, ocorrendo aumento da solubilidade do ESU em diclorometano que é o solvente orgânico utilizado, fazendo com que o extrato seja arrastado com o solvente. Além do efeito da solubilidade, pode ter ocorrido degradação do extrato, visto que óleos essenciais ou extratos são suscetíveis à degradação frente a temperaturas mais elevadas ( $45^\circ\text{C}$ ).

A Figura 24 mostra a influência da pressão na eficiência de encapsulamento para as três isoterms ( $35$ ,  $40$ ,  $45^\circ\text{C}$ ) onde foi mantida fixa a concentração de ESU na solução orgânica.



Figura 24 – Eficiência de encapsulamento em função da pressão de precipitação, □ 35°C e concentração de ESU 1:1; ♦ 40°C e concentração de ESU de 1:2, ▲ 45°C e concentração de ESU de 1:1.



Através da Figura 24 é possível notar que há uma tendência a diminuição da EE com o aumento da pressão, com exceção da isoterma a 40°C com concentração de ESU na solução de 1:2, possivelmente um resultado experimental espúrio. Este comportamento de redução da EE com a pressão está de acordo com os estudos de encapsulamento de óleo essencial de lavanda com biopolímeros pela técnica PGSS (VARONA et al., 2010). Estes autores argumentam que isto pode ser explicado considerando que em pressões acima do ponto crítico da mistura (como é o caso de 120 bar), a solubilidade do extrato no solvente também aumenta tornando-o completamente miscível em CO<sub>2</sub>.

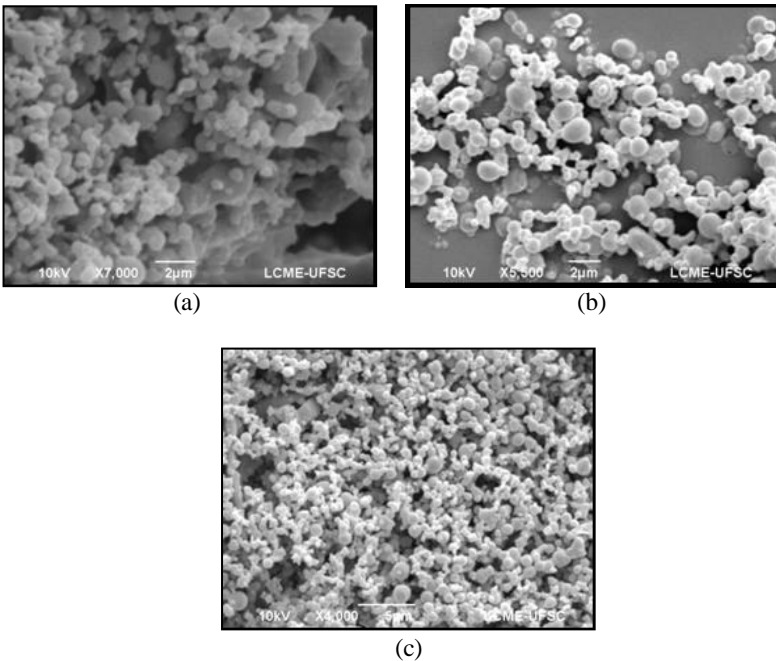
O comportamento de maior eficiência de encapsulamento em menores pressões também foram encontrados por Comin et al. (2012) que estudaram a impregnação de ácido oleico em amido de milho através de fluidos supercríticos. Foram obtidos melhores impregnações de ácido oleico em temperaturas e pressões mais baixas. Os valores de encapsulamento encontrados para o ESU estão de acordo com o encontrado por Varona et al. (2009) que realizaram encapsulamento de óleo de lavanda pela técnica PGSS e obtiveram eficiência de encapsulamento entre 14 e 66%. Os experimentos centrais (8, 9, 10 e 11\*) apresentaram valor de eficiência de encapsulamento semelhantes. Mesmo o experimento 11\*, que foi realizado com maior taxa de

secagem, esta não teve interferência no encapsulamento, atestando a boa reprodutibilidade dos experimentos com pequenas diferenças atribuídas às incertezas experimentais aleatórias.

#### 4.1.2. Caracterização das partículas e Eficiência de Encapsulamento da Astaxantina

A Figura 25 mostra as micrografias das partículas obtidas na coprecipitação de astaxantina e PHBV pela técnica SEDS produzidas nas diferentes condições de operação estudadas (Tabela 2 do item 3.5).

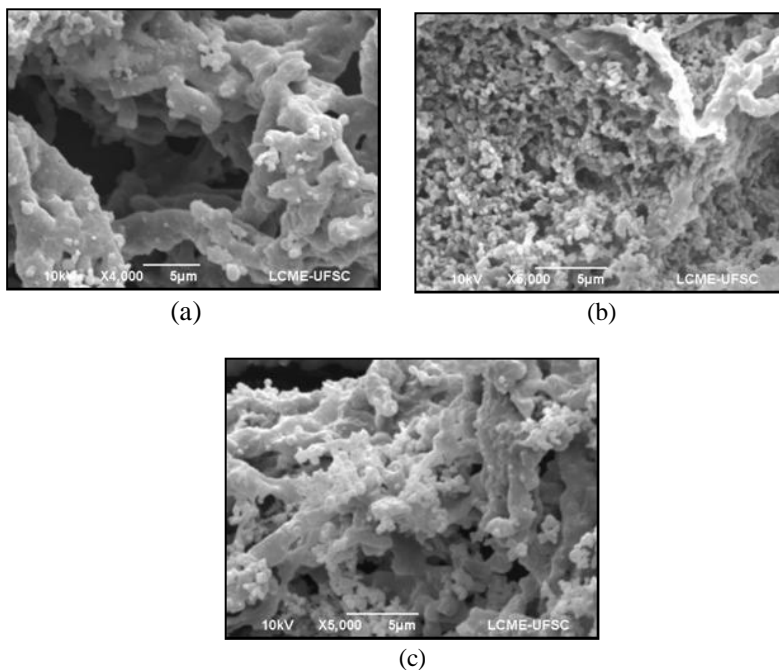
Figura 25 – Micrografias (a) Experimento 2 – 35°C, 80 bar, concentração de astaxantina na solução 8 mg.mL<sup>-1</sup>; (b) Experimento 3 – 35°C, 80 bar, concentração de astaxantina na solução 10 mg.mL<sup>-1</sup>; (c) Experimento 5 – 35°C, 100 bar, concentração de astaxantina na solução 8 mg.mL<sup>-1</sup>.



Através das micrografias é possível observar a morfologia das partículas na forma esférica. Hong et al. (2009) realizaram um estudo sobre a micronização da astaxantina pura através da mesma técnica

utilizada neste trabalho. Os resultados destes autores em relação à morfologia das partículas foram muito diferentes do encontrado neste trabalho para sua coprecipitação em PHBV. As partículas formadas não apresentavam morfologia esférica e sim em formato de placas, o que evidencia a mudança na morfologia quando a astaxantina está encapsulada em PHBV. Para as demais condições experimentais do presente trabalho não houve formação de partículas esféricas, mas sim aglomerados e fibras, como pode ser visualizada na Figura 26. Taberero et al. (2012) também encontraram condições em que foram obtidas aglomerações para precipitação do ácido retinóico e acetaminofeno utilizando a técnica SEDS.

Figura 26 – Micrografias (a) Experimento 1 – 35°C, 80 bar, concentração de astaxantina na solução 5 mg.mL<sup>-1</sup>; (b) Experimento 4 – 35°C, 100 bar, concentração de astaxantina na solução 5 mg.mL<sup>-1</sup>; (c) Experimento 6 – 35°C, 100 bar, concentração de astaxantina na solução 10 mg.mL<sup>-1</sup>.



Segundo Reverchon et al. (2010) o aparecimento de agregados pode ser devido a formação de muitos núcleos no interior da partícula, e ocorrer uma ligação entre os mesmos forçando várias partículas a crescerem como uma única partícula. Dirksen & Ring, (1991) explicam que esta formação de agregados pode também acontecer devido ao movimento browniano dentro da câmara de precipitação, ou seja, o movimento aleatório das partículas no fluido, podendo induzir à colisões entre estas partículas, produzindo o fenómeno de coalescência e a formação de agregados.

A seguir, na Tabela 6, são apresentadas as medidas de tamanho das partículas coprecipitadas de astaxantina extraída de *Haematococcus pluvialis* em PHBV. Os resultados são apresentados pelo tamanho mínimo ( $X_{\text{mínimo}}$ ), tamanho máximo ( $X_{\text{máximo}}$ ), tamanho médio ( $\bar{X}$ ) e os respectivos valores de desvio padrão ( $\sigma$ ) e coeficiente de variação (CV%) para cada condição experimental estudada.

Tabela 6 – Medidas de tamanho mínimo ( $X_{\text{mínimo}}$ ), tamanho máximo ( $X_{\text{máximo}}$ ), tamanho médio ( $\bar{X}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ) e coeficiente de variação (CV) das partículas de astaxantina e PHBV coprecipitadas.

Exp.	T (°C)	P (bar)	Concentração Astaxantina (g.ml <sup>-1</sup> )	$X_{\text{mínimo}}$ [μm]	$X_{\text{máximo}}$ [μm]	$\bar{X}$ [μm]	$\sigma$ [μm]	CV (%)
2	35	80	8,01	0,16	0,38	0,26	0,06	25
3	35	80	10	0,03	0,65	0,19	0,12	62
5	35	100	8,00	0,05	0,26	0,13	0,04	32

Novamente não foi possível realizar a medida de tamanho de todas as amostras, pois o método empregado possibilita a avaliação de tamanho de partículas esféricas e nos ensaios 1, 4 e 6 foram obtidas partículas aglomeradas e fibrosas. Conforme os dados da Tabela 6 o menor tamanho de partícula foi obtido no experimento 5 ( $\bar{X} = 0,13 \mu\text{m}$ ), enquanto que o maior tamanho de partícula foi produzido no experimento 2 ( $\bar{X} = 0,26 \mu\text{m}$ ) juntamente com a mais estreita distribuição de tamanho de partícula, com coeficiente de variância de 25%.

Outros trabalhos são encontrados na literatura referentes ao tamanho das partículas de astaxantina, como Hong et al. (2009) que para a micronização pela técnica SEDS da astaxantina pura extraída da *H.*

*pluvialis*, encontraram tamanhos de 0,2 a 10  $\mu\text{m}$ , utilizando pressões até 200 bar e temperatura de 50°C.

Já Mezzomo et al. (2012) que realizaram o encapsulamento de extrato de resíduos de camarão, ricos em astaxantina, em amido através da técnica SFEE obtiveram tamanhos de partículas entre 0,8 a 7  $\mu\text{m}$ . Os autores utilizaram também a técnica SAS, a qual foi obtida micropartículas de tamanhos acima de 1  $\mu\text{m}$ .

Tachaprutinun et al. (2009) estudaram a prevenção da degradação térmica da astaxantina com três polímeros diferentes pela processo de deslocamento de solvente, o qual obtiveram tamanho de partículas de 312 nm. Higuera-Ciapara (2004), estudando a microencapsulação de astaxantina na matriz de quitosano encontraram microcápsulas com tamanho não homogêneo e diâmetro entre 5-50  $\mu\text{m}$ . Se comparados os resultados na literatura com os dados da Tabela 6 é possível detectar que o tamanho de partícula produzido no presente trabalho foi menor ( $\bar{X}$  de 0,13 até 0,26  $\mu\text{m}$ ) com estreita distribuição de tamanho de partícula.

É possível notar pelos resultados da Tabela 6 (experimento 5), que um aumento da pressão resulta em uma diminuição no tamanho da partícula. Isto foi observado para quase todas as concentrações de solutos estudados neste trabalho, exceto para a concentração de 5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  onde não foram obtidas partículas esféricas e portanto não foi realizada a medida de tamanho de partícula. Este efeito da pressão também foi observado por Hong et al. (2009) que na micronização da astaxantina pura obteve tamanhos de partículas de 1-4  $\mu\text{m}$  em 80 bar e 0,5-3  $\mu\text{m}$  quando a pressão era aumentada para 200 bar.

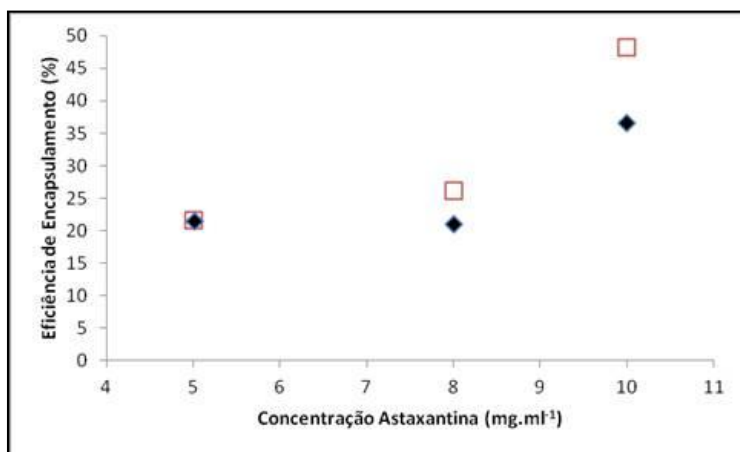
Segundo Chen et al. (2007) o aumento da pressão, em temperatura fixa, acarreta no aumento da densidade do fluido supercrítico ( $\text{CO}_2$ ). Isto melhora a dispersão da solução no antissolvente, diminuindo o tamanho das gotículas formadas e aumentando a transferência de massa. Em consequência ocorre uma rápida difusão do  $\text{CO}_2$  para dentro das gotículas extraindo o solvente e causando a precipitação. Apesar de apenas três condições apresentarem morfologia esférica, foi possível determinar a eficiência de encapsulamento de todas as amostras obtidas, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados do percentual real de encapsulamento (PRE) e eficiência de encapsulamento (EE) da astaxantina obtida da microalga *H. pluvialis*.

Exp.	T (°C)	P (bar)	Concentração Astaxantina (g.ml <sup>-1</sup> )	Concentração PHBV (mg.ml <sup>-1</sup> )	PRE (%)	EE (%)
1	35	80	5	20	4,31	21,55
2	35	80	8,01	20	7,47	26,12
3	35	80	10	20	16,07	48,25
4	35	100	5,02	20	4,29	21,41
5	35	100	8	20	5,97	20,93
6	35	100	10	20	12,18	36,55

A tabela mostra que o aumento da concentração de astaxantina na solução orgânica resulta na melhoria dos valores de eficiência, atingindo os maiores valores no experimento 3, com PRE de 16,07% e EE de 48,25%. A Figura 27 ilustra mais claramente o efeito da concentração da solução orgânica na eficiência de encapsulamento da astaxantina para duas condições isobáricas (80 e 100 bar) com a temperatura constante (35°C).

Figura 27 - Influência da concentração de astaxantina em solução orgânica sobre a eficiência de encapsulamento nas condições fixas de pressão e temperatura: □ 80 bar e 35°C e ◆ 100 bar e 35°C.

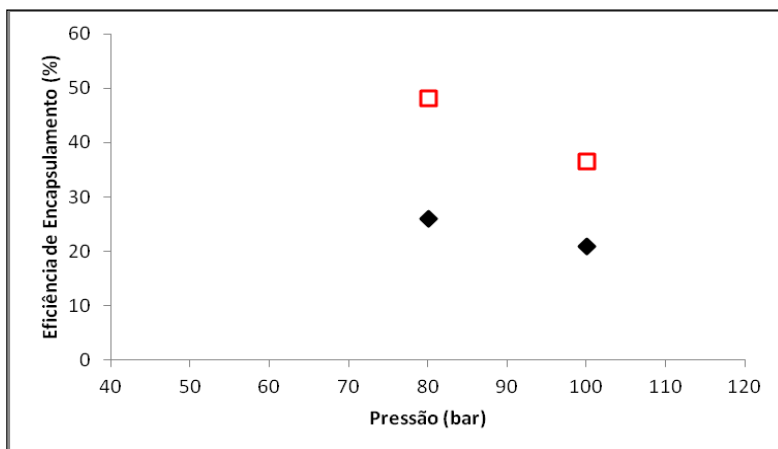


É possível observar com a figura uma tendência de aumento da EE com a elevação da concentração de astaxantina na solução, para as duas pressões estudadas. Franceschi et al. (2009a) também observaram para o  $\beta$ -caroteno que o aumento da sua concentração implicava no aumento da eficiência de encapsulamento.

Novamente o aumento da eficiência de encapsulamento com o aumento da concentração da astaxantina na solução orgânica pode ser explicado pela cinética de precipitação, como descrito para o ESU (Item 4.1.1).

A Figura 28 mostra a influência da pressão na EE da astaxantina para as duas concentrações estudadas (8 e 10 mg.mL<sup>-1</sup> de astaxantina na solução), onde é possível notar que a maior eficiência foi na condição de menor pressão para as duas concentrações, resultado semelhante também foi observado para o encapsulamento do extrato de semente de uva em PHBV, como discutido anteriormente (Figura 24). Novamente este comportamento pode ser devido ao fato de que em maiores pressões aumenta a solubilidade do soluto em CO<sub>2</sub> tornando-o completamente miscível no antissolvente podendo ser arrastado por ele (VARONA et al., 2010).

Figura 28 – Eficiência de encapsulamento em função da pressão de precipitação nas condições de: □ concentração de astaxantina de 10 mg.mL<sup>-1</sup>, ◆ concentração de astaxantina de 8 mg.mL<sup>-1</sup>.



Mezzomo et al. (2010), ao estudarem o encapsulamento de extrato do resíduo de camarão rosa (rico em astaxantina, mas não contendo astaxantina pura) relataram uma eficiência de encapsulação de 71%, com a utilização da técnica antissolvente SAS nas condições experimentais de 35°C e 100 bar. Quando os autores utilizaram temperatura de 40°C e pressão de 100 bar obtiveram até 74% de EE para este extrato.

Lee et al. (2011) realizaram o encapsulamento da astaxantina obtida da *Xanthophyllomyces dendrorhous* em alginato de cálcio e obtiveram eficiência de encapsulamento que variou de 23 a 31%.

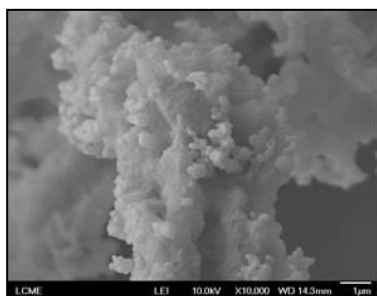
Comparando os dados obtidos com a literatura pode-se perceber que a técnica pode ser aplicada para encapsulamento da astaxantina extraída da microalga *H. pluvialis* e se torna um caminho promissor, com a utilização de condições brandas de operação, apresentando proteção e evitando a degradação da astaxantina.

#### **4.1.3. Caracterização das partículas e Eficiência de Encapsulamento da Bixina**

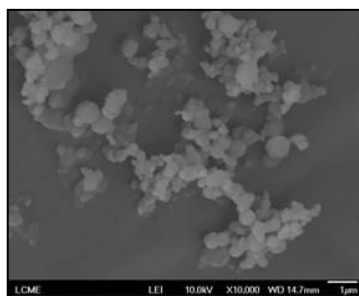
As condições experimentais utilizadas no processo SEDS para o encapsulamento da bixina em PHBV foram baseadas no trabalho de Suo et al. (2005) que realizaram a micronização da bixina pura pela mesma técnica e utilizando o mesmo solvente (DCM) que neste trabalho. A Figura 29 apresenta as micrografias das partículas obtidas na coprecipitação de bixina e PHBV pelo método SEDS conforme as condições expostas na Tabela 3 do Item 3.5.



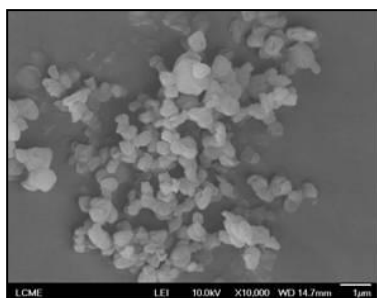
Figura 29 – Micrografias (FEG) de: (a) Experimento 1 – 35°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,6 g.L<sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL<sup>-1</sup>; (b) Experimento 2 – 35°C, 100 bar, concentração de Bixina 0,6 g.L<sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL<sup>-1</sup>; (c) Experimento 3 – 40°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,6 g.L<sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL<sup>-1</sup>; (d) Experimento 4 – 40°C, 100 bar, concentração de Bixina 0,6 g.L<sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL<sup>-1</sup>; (e) Experimento 5 – 35°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,8 g.L<sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL<sup>-1</sup>; (f) Experimento 6 – 35°C, 100 bar, concentração de Bixina 0,8 g.L<sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL<sup>-1</sup>; (g) Experimento 7 – 40°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,8 g.L<sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL<sup>-1</sup>; (h) Experimento 8 – 40°C, 100 bar, concentração de Bixina 0,8 g.L<sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL<sup>-1</sup>; (i) Experimento 9 – 35°C, 80 bar, concentração de Bixina 1 g.L<sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL<sup>-1</sup>; (j) Experimento 10 – 40°C, 80 bar, concentração de Bixina 1 g.L<sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL<sup>-1</sup>; (k) Experimento 11 – 35°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,4 g.L<sup>-1</sup> e PHBV 20 mg.mL<sup>-1</sup>; (l) Experimento 12\* – 35°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,6 g.L<sup>-1</sup> e PHBV 5 mg.mL<sup>-1</sup>, (m) Experimento 13\* – 35°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,6 g.L<sup>-1</sup> e PHBV 2 mg.mL<sup>-1</sup>; (n) Experimento 14\* – 40°C, 80 bar, concentração de Bixina 0,6 g.L<sup>-1</sup> e PHBV 2 mg.mL<sup>-1</sup>.



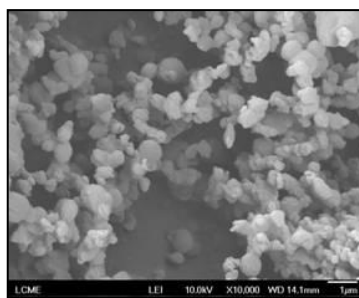
(a)



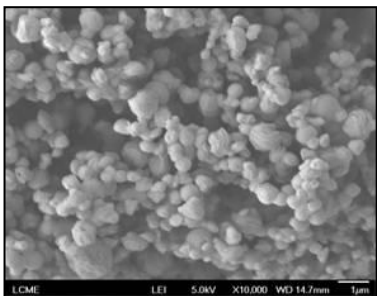
(b)



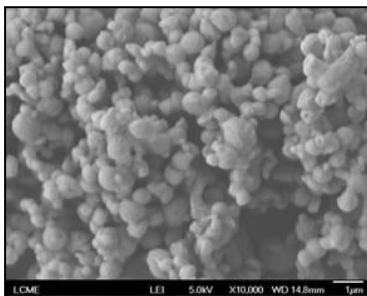
(c)



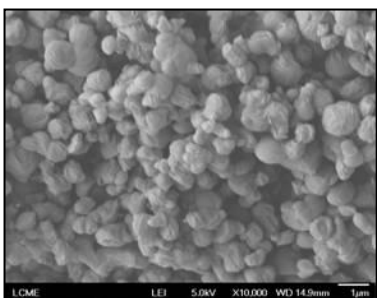
(d)



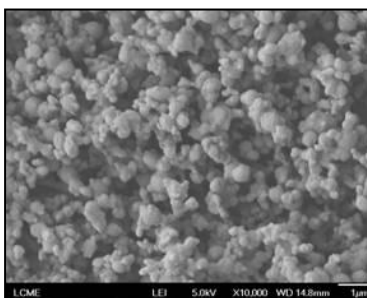
(e)



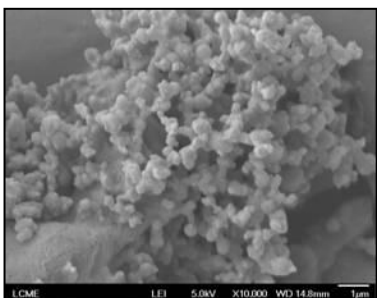
(f)



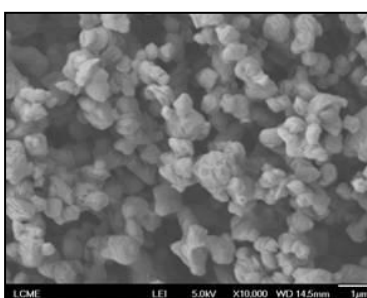
(g)



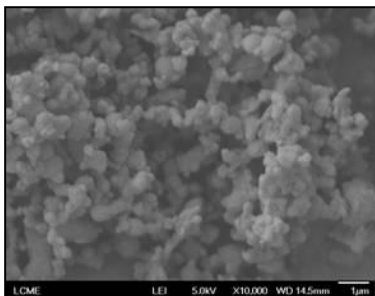
(h)



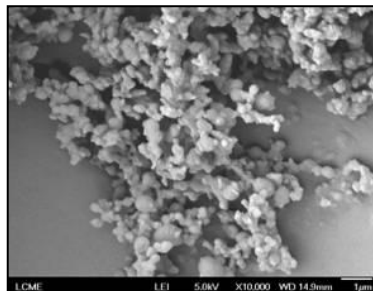
(i)



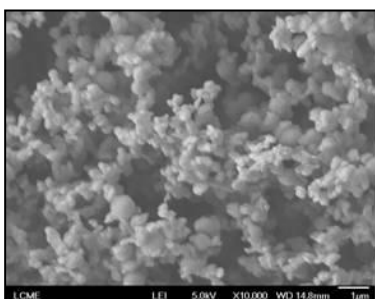
(j)



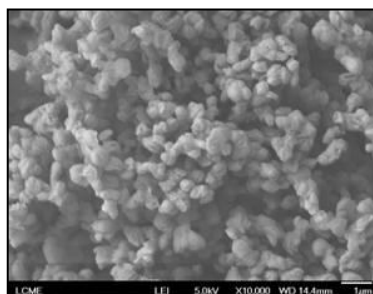
(k)



(l)



(m)



(n)

Como pode ser observado pelas micrografias, as partículas de bixina apresentaram praticamente o mesmo comportamento em relação à sua morfologia para todas as condições experimentais empregadas. Elas se apresentaram com tendência a morfologia esférica com exceção do experimento 1, que apresentou estrutura fibrosa, onde pode ter ocorrido devido a flutuação de ordem experimental. Não está apresentada a micrografia do experimento 15\*, pois não houve tempo suficiente para fazê-la. Algumas condições experimentais empregadas apresentaram partículas com tendência esféricas, mas aglomeradas, como pode ser observado nos experimentos 12, 13 e 14. Nestas condições houve uma diminuição da concentração de PHBV ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) na solução orgânica, e isto pode ter levado a este comportamento.

Suo et al. (2005) realizaram a micronização da bixina pura através da tecnologia SEDS variando a concentração da bixina na solução orgânica (diclorometano) de 0,6, 0,8 e  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , pressão (100 e 200 bar), a temperatura (35, 40 e  $50^\circ\text{C}$ ) e a taxa de solvente e antissolvente. Com relação à morfologia das partículas obtidas os

autores relatam que a forma encontrada foi de agulhas longas ou curtas, comportamento diferente do encontrado neste trabalho, quando a bixina se encontra encapsulada.

Após as análises de micrografias foram realizadas as medidas das dimensões das partículas, com os valores de tamanho mínimo ( $X_{\text{mínimo}}$ ), tamanho máximo ( $X_{\text{máximo}}$ ) e tamanho médio ( $\bar{X}$ ) bem como os respectivos desvios padrão ( $\sigma$ ) e coeficiente de variação (CV%) para cada ensaio realizado. Os resultados estão apresentados na Tabela 8. Para o experimento 1 (35°C, 80 bar, concentração de bixina e PHBV na solução orgânica de 0,6 g.L<sup>-1</sup> e 20 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente) não foi possível determinar as medidas de tamanho de partículas (diâmetro equivalente) uma vez que a morfologia encontrada nesse experimento foi fibrosa e não esférica. E para o experimento 15\* (35°C, 80 bar, concentração de bixina e PHBV na solução orgânica de 0,6 g.L<sup>-1</sup> e 1 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente), não foram determinadas as medidas das dimensões por não ter sido realizada a análise de FEG.

Tabela 8 – Medidas de tamanho mínimo ( $X_{\text{mínimo}}$ ), tamanho máximo ( $X_{\text{máximo}}$ ), tamanho médio ( $\bar{X}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ) e coeficiente de variação (CV) das partículas de bixina e PHBV coprecipitadas.

Exp.	T (°C)	P (bar)	[BIXINA] g/L	$X_{\text{mínimo}}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$X_{\text{máximo}}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$\bar{X}$ [ $\mu\text{m}$ ]	$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]	CV (%)
1	35	80	0,6	-	-	-	-	-
2	35	100	0,6	0,12	0,61	0,24	0,08	35
3	40	80	0,6	0,24	0,56	0,39	0,08	21
4	40	100	0,6	0,27	0,59	0,4	0,07	19
5	35	80	0,8	0,12	0,62	0,35	0,09	28
6	35	100	0,8	0,16	0,64	0,34	0,1	30
7	40	80	0,8	0,29	0,74	0,51	0,1	20
8	40	100	0,8	0,21	0,5	0,34	0,07	23
9	35	80	1	0,12	0,59	0,27	0,09	35
10	40	80	1	0,22	0,7	0,54	0,09	23
11	35	80	0,4	0,11	0,64	0,29	0,08	27
12*	35	80	0,6	0,12	0,45	0,25	0,07	29
13*	35	80	0,6	0,12	0,45	0,27	0,07	27
14*	40	80	0,6	0,23	0,5	0,35	0,05	16
15*	35	80	0,6	-	-	-	-	-

\* Experimentos com maior quantidade de solução e  $\text{CO}_2$  para secagem.

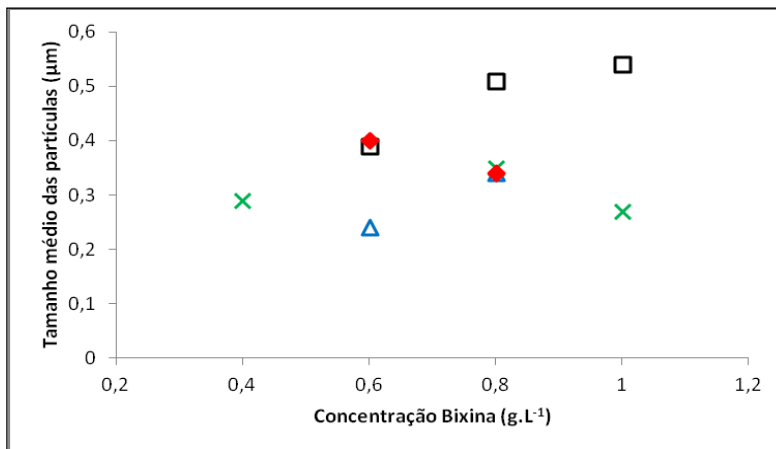
A Tabela mostra que a condição onde foi obtido menor tamanho de partícula ( $\bar{X} = 0,24 \mu\text{m}$ ) foi do experimento 2 onde se utilizou a menor temperatura e a maior pressão (35°C e 100 bar). Novamente é observada a influência da temperatura e pressão no tamanho das partículas da bixina assim como também foi encontrado e explicado para ESU (item 4.1.1.) e para a astaxantina (item 4.2.2.). Os experimentos 12 e 13 também apresentaram valores semelhantes de tamanho de partículas ( $\bar{X} = 0,25$  e  $\bar{X} = 0,27 \mu\text{m}$ , respectivamente), mas em temperaturas e pressões menores (35°C e 80 bar). Este fato pode ter ocorrido pela diminuição da concentração de PHBV na solução orgânica (5  $\text{mg.mL}^{-1}$  e 2  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) comparado com os experimentos 1 à 11 (20  $\text{mg.mL}^{-1}$ ). Esta diminuição da concentração de PHBV na solução pode ter deixado a solução com menor viscosidade, facilitando a difusão do

CO<sub>2</sub>, aumentando a transferência de massa e proporcionando a precipitação de partículas menores (COSTA et al., 2007). Franceschi et al. (2009a) também observaram para o encapsulamento de β-caroteno em PHBV que a diminuição da concentração do polímero gerava partículas de tamanhos menores.

Já o experimento 14 (realizado nas condições de 40°C, 80 bar e concentração de bixina e PHBV na solução 0,6 g.L<sup>-1</sup> e 2mg.mL<sup>-1</sup>, e ainda com maior quantidade de solução e de CO<sub>2</sub> para secagem) não apresentou tamanhos semelhantes mesmo com a diminuição da concentração de PHBV, isto pode ter ocorrido em função da temperatura utilizada ter sido a mais elevada, podendo acarretar na coalescência das partículas e conseqüentemente o aumento no tamanho das mesmas (COCERO; FERRERO, 2002). Outro fator também pode ter sido a quantidade maior de CO<sub>2</sub> para secagem, que pode ter aumentado a colisão entre as partículas e proporcionado partículas maiores pela sua aglomeração (DIRSKSEN; RING, 1991).

Através da tabela é possível observar também que o maior tamanho de partícula foi obtido no experimento 10 ( $\bar{X} = 0,54 \mu\text{m}$ ) onde foi utilizada a maior concentração de bixina (1 gL<sup>-1</sup>) e a maior temperatura (40°C). A Figura 30 mostra a influência da concentração da bixina e da pressão no tamanho médio das partículas obtidas, para as duas isotermas (35 e 40°C) deixando a concentração de PHBV constantes.

Figura 30 – Influência da concentração da bixina e da pressão no tamanho médio das partículas:  $\square$  40°C, 80 bar e concentração de PHBV 20 mg.mL<sup>-1</sup>;  $\blacklozenge$  35°C, 80 bar e concentração de PHBV 20 mg.mL<sup>-1</sup>;  $\times$  40°C, 100 bar e concentração de PHBV 20 mg.mL<sup>-1</sup>;  $\blacktriangle$  35°C, 100 bar e concentração de PHBV 20 mg.mL<sup>-1</sup>.



Através da Figura 30 é possível observar que o aumento da concentração da bixina na solução orgânica, acarreta no aumento do tamanho médio das partículas. Mas isto ocorre quando estão associadas menores temperaturas e maiores pressões (Experimentos 2 e 6,  $\blacktriangle$  no gráfico) e menores temperaturas com menores pressões (Experimentos 3, 7 e 10,  $\square$  no gráfico). Suo et al. (2005) também observaram o aumento do tamanho das partículas, quando era aumentada a concentração da bixina na sua micronização pura pela mesma técnica. Segundo Reverchon et al. (2002) o aumento do tamanho da partícula acontece porque a precipitação do soluto ocorre muito cedo, devido a saturação da solução, e o mecanismo de crescimento da partícula se une ao mecanismo de nucleação, formando partículas maiores

É observado o efeito contrário quando associadas maiores temperaturas com maiores pressões (Experimentos 4 e 8,  $\blacklozenge$  no gráfico), bem como menores temperaturas com maiores pressões (Experimentos 2 e 6,  $\times$  no gráfico), onde a concentração não apresenta grande efeito mas é evidenciado o efeito da pressão no tamanho médio das partículas. O aumento da pressão acarreta na diminuição do tamanho das partículas. Isto também foi observado por Suo et al. (2005). Os autores relatam que em pressões de 200 bar foram obtidos tamanhos de partículas de 0,2-0,4

$\mu\text{m}$  de largura e 4-8  $\mu\text{m}$  de comprimento, e em pressões de 100 bar encontraram 0,8-1,2  $\mu\text{m}$  de largura e 8-16  $\mu\text{m}$  de comprimento. Segundo Suo et al. (2005) o efeito da pressão pode ser explicada devido a expansão volumétrica do solvente no  $\text{CO}_2$  supercrítico aumentar com o aumento da pressão, reduzindo a densidade e o volume molar do solvente, provocando a geração de partículas menores. Através destes resultados é possível observar o quanto as variáveis pressão e temperatura são dependentes entre si para a obtenção de uma expansão volumétrica apropriada, e assim a precipitação das partículas (COCERO; FERRERO, 2002).

Franceschi et al. (2009a) realizaram a coprecipitação do carotenoide  $\beta$ -caroteno e PHBV pela mesma técnica SEDS e obtiveram tamanho médio em torno de 4,6  $\mu\text{m}$ . Segundo Barbosa et al. (2005) se forem comparados os carotenoides  $\beta$ -caroteno e bixina, a molécula de bixina é menor e mais polar, este fato pode ser o responsável pela obtenção de menores partículas (0,24 – 0,54  $\mu\text{m}$ ), neste trabalho, além de ser motivo pelo qual existem muitos trabalhos relacionados ao  $\beta$ -caroteno e poucos da bixina (BARBOSA et al., 2005).

Trabalhos relacionados para a formação de partículas de bixina empregando técnicas convencionais mostraram resultados com tamanhos de partículas ainda maiores, como mostrado por Zhang e Zhong (2013) que encontraram tamanhos de 1 até 20  $\mu\text{m}$  das cápsulas de bixina encapsuladas em caseinato de sódio produzidas por *spray drying*. A Tabela 9 apresenta os resultados de eficiência de encapsulamento da bixina e PHBV coprecipitadas, calculada conforme item 3.4, para cada condição experimental estudada.



Tabela 9 – Resultados do percentual real de encapsulamento (PRE) e eficiência de encapsulamento (EE) da coprecipitação da bixina e PHBV utilizando diclorometano como solvente e CO<sub>2</sub> como antissolvente.

Exp.	T (°C)	P (bar)	[BIXINA] g/L	[PHBV] mg/mL	PRE (%)	EE (%)
<b>1</b>	35	80	0,6	20	0,90	27,13
<b>2</b>	35	100	0,6	20	2,72	74,25
<b>3</b>	40	80	0,6	20	1,14	29,4
<b>4</b>	40	100	0,6	20	0,68	20,98
<b>5</b>	35	80	0,8	20	0,46	10,55
<b>6</b>	35	100	0,8	20	0,27	6,36
<b>7</b>	40	80	0,8	20	0,41	9,07
<b>8</b>	40	100	0,8	20	0,82	18,58
<b>9</b>	35	80	1,0	20	2,12	40,17
<b>10</b>	40	80	1,0	20	2,96	54,42
<b>11</b>	35	80	0,4	20	1,09	48,94
<b>12*</b>	35	80	0,6	5,0	2,16	18,18
<b>13*</b>	35	80	0,6	2,0	3,96	17,19
<b>14*</b>	40	80	0,6	2,0	18,37	80,67
<b>15*</b>	35	80	0,6	1,0	34,89	92,02

\* Experimentos com maior quantidade de solução e CO<sub>2</sub> par secagem.

Como pode ser observado na Tabela 9, a condição que apresentou maior PRE (34,89%) e EE (92,02%) foi do experimento 15 (35°C, 80 bar, concentração de bixina 0,6 g.L<sup>-1</sup> e PHBV 1 mg.mL<sup>-1</sup>), seguido pelo experimento 14 com EE = 80,67% e 2 com EE = 74,25%. Se forem comparados os resultados da Tabela 9 é possível perceber que para o conjunto de experimentos (1 à 11) onde foi mantida a concentração de PHBV fixa em 20 mg.mL<sup>-1</sup>, está presente a tendência de um aumento da concentração da bixina na solução orgânica levar a uma diminuição da EE, quando mantida a pressão e temperatura constantes. Isto pode ser evidenciado se analisados, por exemplo, os experimentos 2 e 6 (temperatura e pressão constantes) em que a diminuição da concentração da bixina (0,8 g.L<sup>-1</sup> para 0,6 g.L<sup>-1</sup>) fez aumentar a EE em

11 vezes (6,36 para 74,25%). Este comportamento foi observado para praticamente todas as condições deste conjunto.

Nos experimentos 12, 13 e 15 onde foi apenas variada a concentração de PHBV na solução orgânica (5, 2 e 1 mg.mL<sup>-1</sup>) foi constatado que na menor concentração do polímero (experimento 15) foi obtida a maior EE. Através destes resultados verificou-se que a concentração do PHBV foi a variável que teve maior influência sobre a EE. Se forem comparados os experimentos 2, 14 e 15, onde foram obtidas as maiores EE, em relação a quantidade de PHBV, é possível observar que o experimento 2 (EE = 74%), apresenta uma concentração de PHBV 10 vezes maior que o experimento 14 (EE = 80%) e quase 20 vezes maior que o experimento 15 (EE = 92%). Provavelmente em concentrações menores de PHBV a bixina está mais bem dispersa podendo ser envolvida pelo agente encapsulante.

Quando a concentração de PHBV é alta pode ocorrer a precipitação da bixina sobre as partículas de polímero que já estão precipitadas de maneira independente da bixina. Na etapa de lavagem pode ser comprovado este comportamento, visto que a solução de lavagem das partículas apresentava coloração igual à da bixina. Franceschi (2009) também observou este tipo de comportamento para o encapsulamento do  $\beta$ -caroteno em PHBV, em que concentrações mais elevadas de polímero proporcionavam menores EE.

No que diz respeito às porcentagens encontradas de bixina encapsulada, os valores obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura científica, como demonstrada por Zhang e Zhong (2013) que obtiveram resultados em torno de 90% para encapsulamento de bixina em caseinato de sódio. Barbosa et al. (2005) encapsularam bixina em goma arábica e maltodextrina por *spray drying* e obtiveram eficiência de encapsulamento de 75 a 86%. Estes trabalhos versam o encapsulamento da bixina através de técnicas convencionais, o que ressalta a importância do presente trabalho, onde foram obtidos valores semelhantes de EE (92%) através da técnica SEDS. Além disso, foram obtidas partículas de morfologia predominantemente esféricas, com tamanhos na escala de nano/micropartículas. Isto é de grande relevância, para posterior aplicação na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica aumentando a vida de prateleira e diminuindo a degradação do produto.

## 4.2. PROPOSTA EXPLORATÓRIA PARA AMPLIAÇÃO DE PRODUÇÃO DE NANO /MICROPARTÍCULAS

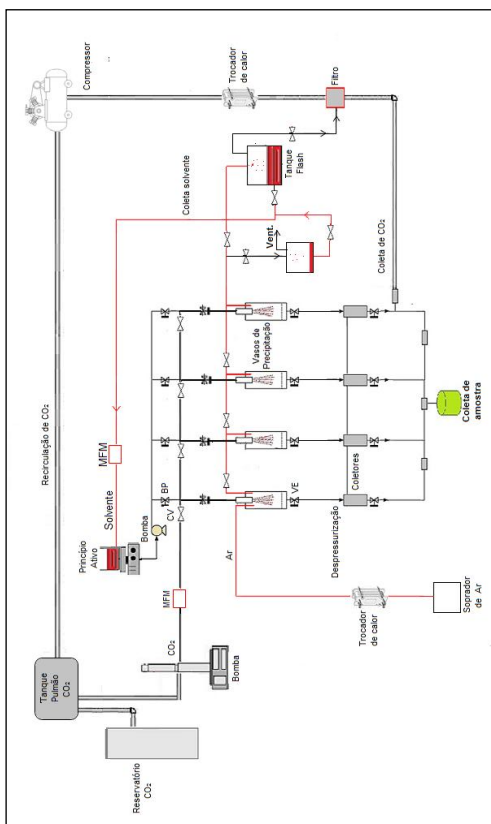
Com base na investigação realizada no presente trabalho, entendeu-se como pertinente elaborar uma proposta, ainda que em caráter exploratório, da ampliação de escala de produção de nano/micropartículas utilizando a tecnologia de dispersão da solução aumentada por fluidos supercríticos (SEDS). A Figura 31 apresenta o diagrama esquemático do equipamento proposto e as Figuras 32 a 38 apresentam os diagramas em 3D da unidade (APÊNDICE A).

Nesta proposta exploratória, não foram realizados cálculos de dimensionamento de equipamento, avaliação de custos, necessidade de utilidades específicas, nem mesmo a exploração dos fenômenos envolvidos para a ampliação do processo (como número de Reynolds, transferência de massa entre outros). A ideia foi conceber um layout básico para discussão e, num segundo momento, prosseguir com os demais passos pertinentes.

A proposta é baseada no aumento do número de câmaras de precipitação, que podem apresentar o mesmo tamanho da câmara utilizada em escala de laboratório. No layout são apresentadas quatro câmaras de precipitação, mas é possível adicionar quantas forem desejadas. Elas podem trabalhar de forma independente uma da outra, ou todas trabalharemos de forma sequencial, onde cada câmara possui seu coletor de amostra, interligada a um coletor geral. Além disso, existe a possibilidade da recirculação do CO<sub>2</sub> e do reaproveitamento do solvente utilizado, evitando desperdícios, minimizando possivelmente custos e danos ambientais.

Outro diferencial seria a mudança da forma de secagem das partículas que foram precipitadas. Após a formação das gotículas (partículas úmidas) a secagem seria realizada por corrente de ar quente ao invés do emprego do CO<sub>2</sub>. Isto acarretaria em menores quantidades de CO<sub>2</sub> utilizado, proporcionando economia do processo.

Figura 31 - Diagrama esquemático do aparato experimental de coprecipitação e encapsulamento utilizado.



Os itens contidos no fluxograma do equipamento proposto são:

**Reservatório de CO<sub>2</sub>** – para armazenamento do fluido empregado como antissolvente que vai ser bombeado continuamente para o processo.

**Bomba de alta pressão** – na qual em uma pressão fixa será mantida vazão contínua e constante do antissolvente.

**MFM** – medidor de fluxo mássico de CO<sub>2</sub>.

**CV** - Válvulas de uma via (*Check-Valve*) que permite a vazão em um único sentido.

**BP** - Válvula de regulagem de Pressão (*Back Pressure*). Esta válvula permite que se realize a regulagem da pressão desde a bomba de HPLC

até ela independentemente da vazão, permitindo assim uma pressão maior anterior a ela e menor depois dela.

**Bomba de HPLC** - Bomba de HPLC utilizada para deslocar a solução orgânica para a câmara de precipitação.

**MFM** – medidor de fluxo mássico de solvente.

**Vasos de precipitação** – no diagrama estão dispostos 4 vasos, mas pode ser inserido um maior número. Estes vasos de precipitação poderão operar de forma independente ou não. Cada um deles terá um coletor de amostra independente, que poderá ser encaminhado para um coletor de amostra geral. **VE** – válvulas esferas utilizadas para despressurizar o sistema e coletar as amostras.

**Coletores** – onde são coletadas as amostras quando abertas as VE.

**Filtro** – filtro de retenção disposto na saída dos vasos de precipitação com a finalidade de reter as partículas e permitindo apenas a passagem do solvente e antissolvente.

**Trocadores de calor** – para estabilizar a temperatura do CO<sub>2</sub> na saída do vaso precipitador e do ar na entrada dos vasos de precipitação.

**Compressor** – utilizado para bombear o CO<sub>2</sub> que vai ser recirculado no processo.

**Soprador** – para deslocar ar quente para secagem das partículas.

**Tanque pulmão** – onde estará disposto o CO<sub>2</sub> proveniente da saída.

**Tanque Flash** – onde vai ser retido o solvente que sai do processo com o antissolvente, e que em seguida poderá ser reutilizado no processo novamente.

**Tanque de Ar** - onde o ar passa, carregando o restante de solvente que ficará retido no tanque, para ser reaproveitado. O ar é eliminado sem resíduos de solvente.

**Trocador de calor** – para estabilizar a temperatura do ar na entrada dos vasos de precipitação.

## CAPÍTULO 5

### 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste capítulo são apresentadas as conclusões decorrentes do desenvolvimento do trabalho, além, das sugestões para trabalhos futuros.

#### 5.1. CONCLUSÕES

Foram encapsulados três “princípios ativos” diferentes em PHBV utilizando a técnica SEDS e o CO<sub>2</sub> como antissolvente. Estes resultados mostram a aplicação e versatilidade da técnica SEDS para o encapsulamento de diferentes princípios ativos, o que é de grande relevância em tecnologia supercrítica.

Foram obtidos resultados de Eficiência de Encapsulamento para o ESU até 66%, astaxantina até 48% e bixina até 92%, condizentes com a literatura, e ainda melhores quando relacionados com técnicas convencionais de encapsulamento.

Dependendo das condições utilizadas foram obtidas partículas esféricas para os três compostos encapsulados, com tamanho médio de partículas que variaram de 0,53 à 0,72 µm para o ESU, de 0,13 à 0,26 µm para a astaxantina e de 0,24 à 0,54 µm para a bixina. Esta formação de partículas na escala de micro ou nanopartículas e morfologia esférica é muito importante para sua aplicação tanto na indústria alimentícia, quanto na cosmética e farmacêutica.

O encapsulamento de compostos líquidos formando pós é inovador e em se tratando de ESU não há relatos na literatura. Este processo se torna um caminho promissor, utilizando-se de resíduos da indústria do vinho. Outro fator importante é que a utilização de óleos e extratos está cada vez mais difundida, ressaltando suas aplicações com agentes antimicrobianos, antioxidantes e medicinais.

Neste tipo de encapsulamento há obtenção do produto em uma única etapa de processamento, obtenção de tamanhos de partículas na escala de micro e nanopartículas, além de poder ser operado em condições brandas de pressão e temperatura. Pelos resultados obtidos é constatada a importância deste fator, já que os melhores resultados são em condições mais brandas de operação, principalmente em temperaturas menores (35°C). Assim, para a ampliação exploratória proposta isto diminuiria os custos de equipamentos e possibilitaria

processar produtos termossensíveis, dando proteção e maior qualidade a produto final.

## 5.2. SUGESTÕES

Como sugestões neste trabalho estão:

- Estudar a influência de cada parâmetro separadamente na formação das partículas e eficiência de encapsulamento para astaxantina e bixina, principalmente em relação a razão polímero: princípio ativo, com o intuito de melhorar ainda mais a eficiência do processo;
- Estudar o equilíbrio de fases  $\text{CO}_2 + \text{DCM} + \text{astaxantina}$  e  $\text{CO}_2 + \text{DCM} + \text{bixina}$ , para avaliar melhor os perfis utilizados para posterior etapa de coprecipitação e encapsulamento;
- Verificar os perfis de liberação *in vitro* dos compostos encapsulados e submetê-los a diferentes meios de dissolução;
- Com posse dos resultados de liberação, aplicar em sistemas modelos para posteriormente aplicação na indústria;
- Realizar o encapsulamento do ESU por técnicas convencionais, para fins de comparação;
- Realizar testes de PRE e EE por outras metodologias como Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC), Cromatografia Gasosa (CG) entre outras;
- Testar outros polímeros e outros solventes para encapsulamento pela técnica SEDS.

## CAPÍTULO 6

### 6. PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DECORRENTE DA EXECUÇÃO DESTE TRABALHO

O referente capítulo apresenta a produção técnico-científica decorrente da execução do trabalho relacionando patentes, artigos publicados e submetidos além de trabalhos divulgados em anais de congressos.

#### 6.1. PATENTE DE INOVAÇÃO

“Sistema e processo de estabilização/encapsulamento de extratos ou óleos vegetais em micro/nanoestruturas utilizando fluidos pressurizados”. Depósito de Patente em 16 dezembro de 2011, pelo número de registro, INPI: PI016110006900.

#### 6.2. TRABALHOS PUBLICADOS/SUBMETIDOS EM PERIÓDICOS

1. PRIAMO, W.L.; DALMOLIN, I.; BOSCHETTO, D.L.; MEZZOMO, N.; FERREIRA, S.R.S.; OLIVEIRA, J.V. Micronization Processes by Supercritical Fluid Technologies: A Short Review on Process Design (2008-2012). Acta Scientiarum Technology, aceito para publicação, 2013.
2. BOSCHETTO, D.L.; DALMOLIN, I.; CESARO, A.M.; RIGO, A.A.; FERREIRA, S.R.S.; MEIRELES, M.A.A.; BATISTA, E.A.C.; OLIVEIRA, J.V. Phase behavior and process parameters effect on grape seed extract encapsulation by SEDS technique. Industrial Crops and Products, submitted, 2013.
3. BOSCHETTO, D.L.; ARANHA, E.M.; DE SOUZA, A.A.U.; SOUZA, S.M.A.G.U.; FERREIRA, S.R.S.; OLIVEIRA, J.V.; PRIAMO, W.L. Encapsulation of bixin in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation, submitted, 2013.
4. MACHADO JR, F.R.S.; REIS, D.F.; BOSCHETTO, D.L.; BURKERT, J.F.M.; FERREIRA, S.R.S.; OLIVEIRA, J.V.; BURKERT, C.A.V. Encapsulation of astaxanthin from



*Haematococcus pluvialis* in PHBV from SEDS technique using supercritical CO<sub>2</sub>. The Journal of Supercritical Fluids, submitted, 2013.

### 6.3. TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

1. BOSCHETTO, D.L.; DALMOLIN, I.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, J.V. Coprecipitação do extrato de semente de uva e PHBV empregando dióxido de carbono como antissolvente. **9º SLACA SLACA – Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 2011.
2. BOSCHETTO, D.L.; DALMOLIN, I.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, J.V. Coprecipitação do extrato de semente de uva e PHBV empregando dióxido de carbono como antissolvente. **XI ERSCTA – Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Curitiba, 2011.
3. BOSCHETTO, D.L.; DALMOLIN, I.; CESARO, A.M.; RIGO, A.A.; FERREIRA, S.R.S.; MEIRELES, M.A.A.; BATISTA, E.A.C.; OLIVEIRA, J.V. Adaptation and optimization of a unit experimental particle formation via SEDS for co-precipitation of plant extracts. In: **16th World Congress of Food Science and Technology**, Foz do Iguaçu, 2012.

## CAPÍTULO 7

### 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANARJAN, N.; MIRHOSSEINI, H.; BAHARIN, B.S.; TAN, C.P. Effect of processing conditions on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. **Food Chemistry**, v. 123, p. 477–483, 2010.

ANARJAN, N.; TAN, C.P.; NEHDI, I.A.; LING, T.C. Colloidal astaxanthin: Preparation, characterisation and bioavailability evaluation. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1303–1309, 2012.

ANTONACCI, A.; REVERCHON, E. Drug-polymer microparticles produced by supercritical assisted atomization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 1626–1637, 2007.

ASGHARI, I.; ESMAEILZADEH, F. Formation of ultrafine deferasirox particles via rapid expansion of supercritical solution (RESS process) using Taguchi approach. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 433, p. 149–156, 2012.

AYMONIER, C.; SERANI, A.L.; REVERÓN, H.; GARRABOS, Y.; CANSSELL, F. Review of supercritical fluids in inorganic materials science. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 242–251, 2006.

BAHRAMI, M.; RANJBARIAN, S. Production of micro- and nano-composite particles by supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, p. 263–283, 2007.

BAIL, T.E.; FERNHDEZ, Y.G.; GONZALO, J.R.; BUELGA, C.S. Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del Pais grape seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1794–1799, 1992.

BALASWAMY, K.; PRABHAKARA RAO, P.G.; SATYANARAYANA, A.; RAO, D.G. Stability of bixin in annatto oleoresin and dye powder during storage. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, p. 952–956, 2006.

BALU, M.; SANGEETHA, P.; MURALI, G.; PANNEERSELVAM, C. Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats. **Brain Research Bulletin**, v. 68, p. 469–473, 2006.

BARBOSA, M.I.M.J.; BORSARELLI, C.D.; MERCADANTE, A.Z. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. **Food Research International**, v. 38, p. 989–994, 2005.

BAYDAR, N.G.; OZKAN, G. Tocopherol contents of some Turkish wine by-products. **European Food Research and Technology**, v. 223, p. 290–293, 2006.

BENTIVEGNA, S.S.; WHITNEY, K.M.; Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1731–1743, 2002.

BERKLAND, C.; KIPPER, M.J.; NARASIMHAN, B.; KIM, K.; PACK, D.W. Microsphere size, precipitation kinetics and drug distribution control drug release from biodegradable polyanhydride microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 94, p. 129–141, 2004.

BOZBAG, S.E.; ERKEY, C. Review - Supercritical fluids in fuel cell research and development. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 62, p. 1–31, 2012.

CALICETI, P.; SALMASO, S.; ELVASSORE, N.; BERTUCCO, A., Effective protein release from PEG/PLA nano-particles produced by compressed gas anti-solvent precipitation techniques. **Journal of Controlled Release**, v. 94, p. 195 – 205, 2004.

CALVO, P.; HERNANDEZ, T.; LOZANO, M.; GONZALEZ-GOMEZ, D. Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray-drying: influence of wall material and olive quality. **European Journal of Lipid Science Technology**, v. 112, p. 852–858, 2010.

CAO, X.; ITO, Y. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1021, p.117–124, 2003.

CARLSON, L.H.C.; BOLZAN, A. Size Meter, Versão 1.1. **Laboratório de Controle de Processos (LCP)**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

CATONI, S.E.M. Biossíntese e obtenção de PHB e PHBV plastificados com PEG visando aplicação em liberação controlada de fármacos. **Dissertação de Mestrado. Universidade da Região de Joinvile, Santa Catarina, Joinvile, SC - Brasil**, novembro de 2011.

CELIK TAS, O.Y.; UYANIKGIL, E.O.C. 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.

CEZARO, A. M. Precipitação e encapsulamento do extrato de semente de uva em PHBV empregando tecnologia supercrítica. **Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, RS – Brasil**, 2010.

CHAN, W.C. Bionanotechnology progress and advances. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 12, p. 87 – 91, 2006.

CHANG, C. J.; RANDOLPH, A. D.; CRAFT, N. E., Separation of b-carotene mixtures precipitated from liquid solvents with high-pressure CO<sub>2</sub>. **Biotechnology Progress**, v.7, p. 275 – 278, 1991.

CHAO, C.L.; CHANG, N.C.; WENG, C.S.; LEE, K.R.; KAO, S.T.; HSU, J.C.; HO, F.M. Grape seed extract ameliorates tumor necrosis factor-induced inflammatory status of human umbilical vein endothelial cells. **European Journal of Nutrition**, v. 50, p. 401–409, 2011.

CHEN, A.Z.; PU, X.M.; KANG, Y.Q.; LIAO, L.; YAO, Y.D.; YIN, G.F. Study of poly(L-lactide) microparticles based on supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, p. 2339 – 2345, 2007.

CHEN, X.; CHEN, R.; GUO, Z.; LI, C.; LI, P. The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with b-cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 101(4), p. 1580–1584, 2007.

CHONG, G.H.; YUNUS, R.; CHOONG, T.S.Y.; ABDULLAH, N.; SPOTAR, S.Y. Simple guidelines for a self-built laboratory-scale supercritical anti-solvent system. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 60, p. 69–74, 2011.

CHRASIL, J. Solubility of solids and liquids in supercritical gases. **Journal of Physical Chemistry**, v. 86, p. 3016, 1982.

COCERO, M. J.; FERRERO, S. Crystallization of b-carotene by a GAS process in batch Effect of operating conditions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, p. 237–245, 2002.

COCERO, M. J.; MARTIN, A.; MATTEA, F.; VARONA, S. Review: Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 546-555, 2009.

COMIN, L.M.; TEMELLI, F.; SALDAÑA, M.D.A. Impregnation of flax oil in pregelatinized corn starch using supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 221– 228, 2012.

CORAZZA, M. L.; CARDOZO FILHO, L.; ANTUNES, O. A. C.; DARIVA, C. High pressure phase equilibria of the related substances in the limonene oxidation in supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 48, p. 354 – 358, 2003.

COSIJNS, A.; NIZET, D.; NIKOLAKAKIS, I.; VERVAET, C.; DE BEER, T.; SIEPMANN, F.; SIEPMANN, J.; EVRARD, B.; REMON, J.P. Porous pellets as drug delivery system. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, p. 655–662, 2009.

COSTA, M.S.; DUARTE, A.R.C.; CARDOSO, M.M.; DUARTE, C.M.M. Supercritical antisolvent precipitation of PHBV microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 72 – 77, 2007.

DALMOLIN, I.; MAZUTTI, M. A.; BATISTA, E. A. C.; MEIRELES, M. A. A.; OLIVEIRA, J. V. Chemical characterization and phase behaviour of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **Journal of Chemical Thermodynamics**. v. 42, p. 797–801, 2010.

DALMOLIN, I.A.L. Uso de sementes de uva, um resíduo da agroindústria vinícola, empregando tecnologias supercríticas. **Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP – Brasil, Março de 2013.**

DE PAZ, E.; MARTIN, A.; DUARTE, C.M.M.; COCERO, M.J. Formulation of  $\beta$ -carotene with poly-( $\epsilon$ -caprolactones) by PGSS process. **Powder Technology**, v. 217, p. 77–83, 2012.

DEBENEDETTI, P.G.; TOM, J.W.; YEO, S.D.; LIM, G.B. Application of Supersaturation fluids for the production of sustained delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 24, p. 27–44, 1993.

DINICOLA, S.; CUCINA, A.; PASQUALOTO, A.; D'ANSELMINI, F.; PROIETTI, S.; LISI, E.; PASQUA, G.; ANTONACCI, D.; BIZZARRI, M. Antiproliferative and apoptotic effects triggered by grape seed extract (GSE) versus epigallocatechin and procyanidins on colon cancer cell lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 651–664, 2012.

DIRKSEN, J.A.; RING, T.A. Fundamentals of crystallization: kinetic effects on particle size distributions and morphology. **Chemical Engineering Science**, v. 10, p. 2389–2427, 1991.

DIXON, D.J. Formation of polymeric materials by precipitation with a compressed fluids antisolvent. **Ph.D. Thesis, Austin, Texas, 1992.**

DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; TORRES-MUÑOZ, J. A. Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 249-252, 2004.

DONG, Q.; ZHAO, X.M. In situ carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*. **Catalysis Today**, v. 98, p. 537–544, 2004.

DRUSCH, S. BERG, S. Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: localisation, determination and impact on oxidative stability. **Food Chemistry**, v. 109(1), p. 17-24, 2008.

EL-AGAMEY, A.; LOWE, G.M.; MCGARVEY, D.J.; MORTENSEN, A.; PHILIP, D.M.; TRUSCOTT, T.G. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 430(1), p. 37–48, 2004.

EMERICH, D.F.; THANOS, C.G. Nanotechnology and medicine. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 3, p. 655 – 663, 2003.

FAGES, J.; LOCHARD, H.; LETOURNEAU, J.J.; SAUCEAU, M.; RODIER, E., Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. **Powder Technology**, v. 141, p. 219 – 226, 2004.

FAILLA, M.L.; CHITCHUMROONCHOKCHAI, C. In vitro models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in foods. **Harvest Plus Technical Monograph**, v. 3, p. 1–32, 2005.

FAOSTAT - Food and agriculture Organization of the United Nations. Referência bibliográfica de documento eletrônico. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: Junho de 2013.

FIORI, L. Grape seed oil supercritical extraction kinetic and solubility data: critical approach and modeling. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 43–54, 2007.

FIORI, L.; DE FAVERI, D.; CASAZZA, A.; PEREGO, P. Grape by-products: extraction of polyphenolic compounds using supercritical CO<sub>2</sub> and liquid organic solvent – a preliminary investigation Subproductos de la uva: extraccion de compuestos polifenolicos usando CO<sub>2</sub> supercritico y disolventes organicos liquidos. **CyTA – Journal of Food**, v. 7, p. 163–171, 2009.

FLORIS, T.; FILIPPINO, G.; SCRUGLIA, S.; PINNA, M. B.; ARGIOLOS, F.; ARGIOLOS, A.; MURRU, M.; REVERCHONC, E. Antioxidant compounds recovery from grape residues by a supercritical antisolvent assisted process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 165–170, 2010.

FONSECA, R.A.S.; RAFAEL, R.S.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V.; BURKERT, J.F.M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.7, p.1165-1171, 2011.

FRANCESCHI, E. Precipitação e encapsulamento de  $\beta$ - caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica. **Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC - Brasil**, abril de 2009.

FRANCESCHI, E.; CESARO, A. M.; FEITEN, M.; FERREIRA, S. R. S.; DARIVA, C.; KUNITA, M. H.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of  $\beta$ -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 259-269, 2009a.

FRANCESCHI, E.; CESARO, A. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of  $\beta$ -carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 656-663, 2009b.

FRANCESCHI, E.; DE CESARO, A. M.; FEITEN, M.; FERREIRA, S. R. S.; DARIVA, C.; KUNITA, M. H.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of  $\beta$ -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 259-269, 2008.

FREITAS, L.S.; JACQUES, R.A.; RICHTER, M.F.; SILVA, A.L.; CAMARÃO, E.B. Pressurized liquid extraction of vitamin E from Brazilian grape seed oil. **Journal of Chromatography. A**, v. 1200, p. 80–83, 2008.

FULEKI, T.; DA SILVA, J. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1156–1160, 1997.

GALAGHER, P.M.; COFFEY, M.P. KRUKONIS, V.J.; KLASITUS, N. Gas antisolvent recrystallization: new process to recrystallize compounds in supercritical fluids. **American Chemical Society Symposium Series**, v. 406, p. 334-354, 1989.



GARAY, I.; POCHEVILLE, A.; MADARIAGA, L. Polymeric microparticles prepared by supercritical antisolvent precipitation. **Powder Technology**, v. 197, p. 211–217, 2010.

GHIGGI, V. Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por *Haematococcus pluvialis*. **Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba**, 2007.

GONG, X.; CHEN, F. Optimization of culture medium for growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Phycology**, v. 30, p. 829–833, 1997.

GOODWIN, T.W. Distribution of carotenoids. In: *Methods in enzymology*. (L. Packer, ed.), v. 213, p. 167-172. San Diego: Academic Press, 1992.

GOULA, A.M.; ADAMOPOULOS, K.G. A method for pomegranate seed application in food industries: Seed oil encapsulation. **Food and Bioproducts Processing**, v.90, p. 639–652, 2012.

GRANADO, F.; OLMEDILLA, B.; BLANCO, I. Review article: nutritional and clinical relevance of lutein in human health. **Brazilian Journal Nutrition**, v. 90, p. 487, 2003.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M.E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. **Trends in Biotechnology**, v. 21 No.5, 2003.

HANNAY, J.B.; HOGARTH, J. On the solubility of solids in gases. **Proceedings of the Royal Society (London)**, v. 29, 324, 1879.

HE, W.; SUO, Q.; HONG, H.; SHAN, A; LI, C.; HUANG, Y.; LI, Y.; ZHU, M. Production of natural carotene-dispersed polymer microparticles by SEDS-PA co-precipitation. **Journal of Materials Science**, v. 42, p. 3495 – 3501, 2007.

HENEZKA, M.; BALDYGA, J.; SHEKUNOV, B.Y., Particle formation by turbulent mixing with supercritical antisolvent. **Chemical Engineering Science**, v. 60, p. 2193 – 2201, 2005.

HIGUERA-CIAPARA, I.; VALENZUELA, F.L.; GOYCOOLEA, F. M. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46(2), p. 185–196, 2006.

HIGUERA-CIAPARA, I.; VALENZUELA, L.F.; GOYCOOLEA, F.M.; MONAL, W.A. Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 41–45, 2004.

HONG, H. L.; SUO, Q. L.; HAN, L. M.; LI, C. P. Study on precipitation of astaxanthin in supercritical fluid. **Powder Technology**, v. 191 (3), p. 294–298, 2009.

HONG, H.L.; SUO, Q.L.; HE, W.Z.; LI, C.P. Formation of carotene/proanthocyanidin composite microparticles via the solution-enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS) process through prefilming atomization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 6630 – 6634, 2007.

HSIEH, W. C.; CHANG, C. P.; GAO, Y. L. Controlled release properties of Chitosan encapsulated volatile Citronella Oil microcapsules by thermal treatments. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, p. 209–214, 2006.

HU, D.; LIN, C.; LIU, L.; LI, S.; ZHAO, Y. Preparation, characterization, and in vitro release investigation of lutein/zein nanoparticles via solution enhanced dispersion by supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 545–552, 2012.

HUSSEIN, G.; SANKAWA, U.; GOTO, H.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H. Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 443–449, 2006.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Referência bibliográfica de documento eletrônico. Disponível em: < [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br) >. Acesso em: Junho de 2013.

JACOB, J.K.; HAKIMUDDIN, F.; PALIYATH, G.; FISHER, H. Antioxidant and antiproliferative activity of polyphenols in novel high-polyphenol grape lines. **Food Research International**, v. 41(4), p. 419–424, 2008.

JAVANOVIC, N.; BOUCHARD, A.; HOFLAND, G.W.; WITJAMO, G.J.; CROMMELIN, D.J.A.; JISKOOT, W. Stabilization of IgG by supercritical fluid drying: optimization of formulation and process parameters. **European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics**, v. 68, p. 183–190, 2008.

JAYAPRAKASHA, G.K.; NEGI, P.S.; SAGARIKA, S.; RAO, J.L.; SAKARIAH, K.K. Antibacterial activity of Citrus reticulate peel extracts. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 56c, p. 1030–1034, 2000.

JUNG, J.; PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 20, p. 179-219, 2001.

JYONOUCHI, H.; SUN, S.; IJIMA, K.; GROSS, M. D. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. **Nutrition and Cancer-an International Journal**, v. 36(1), p. 59-65, 2000.

KALOGIANNIS, C.G.; MICHAILOF, C. M.; PANAYIOTOU, C. G. Microencapsulation of amoxicillin in poli (L-lactic acid) by supercritical antisolvent precipitation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 8738-8743, 2006.

KANG, Y.; YIN, G.; OUYANG, P.; HUANG, Z.; YAO, Y.; LIAO, X.; CHEN, A.; PU, X. Preparation of PLLA/PLGA microparticles using solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 322 (1), p. 87 – 94, 2008.

KATIYAR, S. Grape seed proanthocyanidins and cancer prevention: inhibition of oxidative stress and protection of immune system. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52(1), p. 871–876, 2008.

KESSLER, A.; MAZZOTTI, M. Experimental study of the effect of process parameters in the recrystallization of an organic compound using compressed carbon dioxide as antisolvent, **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 39 (7), p. 2260, 2000.

KHALIFA, F.K.; KHALIL, F.A.; BARAKAT, H.A.; HASSAN, M.M. Protective role of wheat germ and grape seed oils in chlorpyrifos-induced oxidative stress, biochemical and histological alterations in liver

of rats. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, p. 54–66, 2011.

KHORASSANI, M. A.; TAYLOR, L.T. Sequential fractionation of grape seeds into oils, polyphenols and procyanidins via a single system employing CO<sub>2</sub>-based fluids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2440–2444, 2004.

KIKIC, I. Polymer – supercritical fluid interactions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, no. 3, p. 458-465, 2009.

KIM, M. S.; LEE, S.; PARK, J. S.; WOO, J. S.; HWANG, S. J. Micronization of cilostazol using supercritical antisolvent (SAS) process: effect of process parameters. **Powder Technology**, v. 177 (2), p. 64 – 70, 2007.

KING, A. H. Encapsulation of food ingredients. In: Encapsulation and controlled release of food ingredients; Risch, S. J.; Reineccius, G.A. Eds. **American Chemical Society, Washington, DC**, p. 26–37, 1993.

KIRAN, E.; LIU, K.; RAMSDELL, K. Morphological changes in poly ([epsilon] – caprolactone) in dense carbon dioxide. **Polymer**, v. 49, p. 1853-1859, 2008.

KITTIKAIWAN, P.; POWTHONGSOOK, S.; PAVASANT, P.; ARTIWAN, S. Encapsulation of *Haematococcus pluvialis* using chitosan for astaxanthin stability enhancement. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 378–385, 2007.

KOBAYASHI, M.; SAKAMOTO, Y. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 265–269, 1999.

KRUKONIS, V.J.; MCHUGH, M.A.; SECHNER, J. Xenon as a supercritical solvent. **Journal Physical Chemistry**, v. 88 (13), p. 2687–2689, 1984.

LEE, J.S.; PARK, S.A.; CHUNG, D.; LEE, H.G. Encapsulation of astaxanthin-rich *Xanthophyllomyces dendrorhous* for antioxidant delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.49, p. 268-273, 2011.

LEIMANN, F.V. Microencapsulação de óleo essencial de capim limão utilizando o processo de coacervação simples. **Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina**, Faculdade de Engenharia Química, Florianópolis, SC, 2008.

LENGSFELD, C. S.; DELPLANQUE, J. P.; BAROCAS, V. H.; RANDOLPH, T. W. Mechanism governing microparticle morphology during precipitation by a compressed antisolvent: atomization vs nucleation and growth. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, p. 2725 – 2735, 2000.

LI, X.; JASTI, B.R. (Eds.), Design of Controlled Release Drug Delivery Systems. **McGraw-Hill**, ISBN 0-07-141759-1, 2006.

LI, Y.; YANG, D.J.; ZHOU, W.; CHEN, S.B.; CHEN, S.L. Recrystallization of puerarin using the supercritical fluid antisolvent process. **Journal of Crystal Growth**, v. 340, p. 142–148, 2012.

LIN, C.; NG, K. M.; WIBOWO, C. Production nanoparticles using precipitation with compressed antisolvent. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 3580-3589, 2007.

LORENZ, T.; CYSEWSKI, G. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Tibtech**, v.18, p. 160-167, 2000.

LUTTERODT, H.; SLAVIN, M.; WHENT, M.; TURNER, E.; YU, L. Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. **Food Chemistry**, v. 128, p. 391–399, 2011.

MACHADO JR., F.R.S.; REIS, D.F.; OLIVEIRA, K.D.; TREVISOL, T.C.; BURKERT, C.A.V.; BURKERT, J.F.M. *Haematococcus pluvialis*: crescimento celular e extração de carotenoides com diferentes solventes. In: **XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Anais**, Búzios, p. 9526-32, 2012.

MACHMUDAH, S.; SHOTIPRUK, A.; GOTO, M.; SASAKI, M.; HIROSE, T. Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*

using supercritical CO<sub>2</sub> and ethanol as entrainer. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 3652–3657, 2006.

MADAVI, D.L.; SALUNKHE, D.K. Toxicological aspects of food antioxidants. In MADAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. (Eds.), **Food antioxidants**, p. 267. New York: Marcel Dekker Inc. 1995.

MAIA, J.L.; SANTANA, M.H.A.; RÉ, M.I. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n.1, p.1-12, 2004.

MAIER, T.; SCHIEBER, A.; KAMMERER, D.R.; CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 112, p. 551–559, 2009.

MAJERIK, V.; CHARBIT, G.; BADENS, E.; HORVÁTH, G.; SZOKONYA, L.; BOSCH, N.; TEILLAUD, E. Bioavailability enhancement of an active substance by supercritical antisolvent precipitation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, p. 101 – 110, 2007.

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

MARTÍN, A.; GUTIÉRREZ, L.; MATTEA, F.; COCERO, M.J. Precipitation of mandelic acid with a supercritical antisolvent process: experimental and theoretical analysis, optimization, and scale up. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 1552-1562, 2007.

MARTÍN, A.; VARONA, S.; NAVARRETE, A.; COCERO, M.J. Encapsulation and Co-Precipitation Processes with Supercritical Fluids: Applications with Essential Oils. **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 4, p. 31-41, 2010.

MATTEA, F.; MARTIN, M.; COCERO, M.J. Co-precipitation of  $\beta$ -carotene and polyethylene glycol with compressed CO<sub>2</sub> as an

antisolvent: effect of temperature and concentration. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 3900-3906, 2008.

MCCLEMENTS, D.J. Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7(6), p. 2297–2316, 2011.

MEZZOMO, N.; DE PAZB, E.; MARASCHINC, M.; MARTIN, A.; COCERO, M.J. FERREIRA, S.R.S. Supercritical anti-solvent precipitation of carotenoid fraction from pink shrimp residue: Effect of operational conditions on encapsulation efficiency. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 342– 349, 2012.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S.R.S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 10–16, 2009.

MIGUEL, F.; MARTÍN, A.; COCERO, M.J. Supercritical anti solvent precipitation of lycopene: Effect of the operating parameters. **Journal Supercritical Fluids**, v. 36 (3), p. 225–235, 2006.

MIGUEL, F.; MARTIN, A.; MATTEA, F.; COCERO, M.J. Precipitation of lutein and coprecipitation of lutein and poly-lactic acid with the supercritical antissolvent process. **Chemical Engineering Processing**, v. 47, p. 1594, 2008.

MIKI, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63(1), p. 141-146, 1991.

MONTENEGRO, M.A.; RIOS ADE, O.; MERCADANTE, A.Z.; NAZARENO, M.A.; BORSARELLI, C.D. Model studies on the photosensitised isomerisation of bixin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 367–373, 2004.

MORAIS, F.L. Carotenoides: Características biológicas e químicas. Monografia (Curso de Qualidade em Alimentos) - **Universidade de Brasília, Brasília**, p. 70, 2006.

NAGUIB, Y.M.A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 48, p. 1150–1154, 2000.

NALAWADE, S.P.; PICCHIONI, F.; JANSSEN, L.P.B.M. Supercritical carbon dioxide as a green solvent for processing polymer melts: Processing aspects and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 19–43, 2006.

NASSIRI-ASL, M.; HOSSEINZADEH, H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1197–1204, 2009.

NOBRE, B.P.; MENDES, R.L.; QUEIROZ, E.M.; PESSOA, F.L.P.; COELHO, J.P.; PALAVRA, A.F. Supercritical carbon dioxide extraction of pigments from *Bixaorellana* seeds (experiments and modeling). **Brazilian Journal Chemical Engineering**, v. 23, p. 251–258, 2006.

OLAIZOLA, M.; HUNTLEY, M.E. Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae. In **Biomaterials and Bioprocessing** (Fingerman, M. and Nagabhushanam, R., eds), Science Publishers, 2003.

OLIVEIRA, D.A.; SALVADOR, A.A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; SMÂNIA, E.F.A.; MARASCHINC, M.; FERREIRA, S.R.S. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. **Journal of Biotechnology**, v. 164, p. 423–432, 2013.

ONCEL, S.S.; IMAMOGLU, E.; GUNERKEN, E.; SUKAN, F. V. Comparison of different cultivation modes and light intensities using mono-cultures and co-cultures of *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella zofingiensis*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, p. 414–420, 2010.

PALMA, M.; TAYLOR, L. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. **Journal of Chromatography A**, v. 849, p. 117–124, 1999.

PAN, X.; DAI, LI, Y.; NIU, X.; LI, N.; LIU, W.; ZHAO, F.; YU, Y.Z. Inhibition of arsenic-induced rat liver injury by grape seed extract through suppression of NADPH oxidase and TGF/Smad activation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, p. 323–331, 2011.



PARK, S.J.; CHOI, S.H.; YOON, H.H. Preparation of poly-lactic acid nano/microparticles using supercritical anti-solvent with enhanced mass transfer. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 16, p. 101–105, 2010.

PASSOS, C. P.; SILVA, R. M.; SILVA, F. A.; COIMBRA, M. A.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, p. 634–640, 2010.

PASSOS, C.P.; SILVA, R.M.; SILVA, F.A.; COIMBRA, M.A.; SILVA, C.M.; Enhancement of the supercritical fluid extraction of grape seed oil by using enzymatically pre-treated seed. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, p. 225–229, 2009.

PENG, C.H.; CHANG, C.H.; PENG, R.Y.; CHYAU, C.C. Research paper - Improved membrane transport of astaxanthine by liposomal encapsulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, p. 154–161, 2010.

PERUMALLA, A.V.S.; HETTIARACHCHY, N.S. Review - Green tea and grape seed extracts — Potential applications in food safety and quality. **Food Research International**, v. 44, p. 827–839, 2011.

PESCHEL, W.; SANCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZIA, I.; JIMENEZ, D. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97(1), p. 137–150, 2006.

POUTON, C.W.; AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 18, p. 133-162, 1996.

PRESTON, H.D.; RICKARD, M.D. Extraction and chemistry of annatto. **Food Chemistry**, v. 5, p. 47–56, 1980.

PRIAMO, W. L.; DE CEZARO, A. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation and encapsulation of  $\beta$ -carotene in

PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 103-109, 2010.

PRIAMO, W.L. Encapsulamento de  $\beta$ -caroteno em PHBV com dióxido de carbono e avaliação da liberação *in vitro*. **Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC – Brasil**, Fevereiro de 2011.

PRIAMO, W.L.; CEZARO, A.M.; FERREIRA, S.R.S.; OLIVEIRA, J.V. Precipitation and encapsulation of  $\beta$ -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 103–109, 2010.

PU, J.; BANKSTON, J.D.; SATHIVEL, S. Developing microencapsulated flaxseed oil containing shrimp (*Litopenaeus setiferus*) astaxanthin using a pilot scale spray Dryer. **Biosystems Engineering**, v. 108, p. 121-132, 2011.

RAMAMOORTHY, S.; DOSS, F.P.; KUNDU, K.; SATYANARAYANA, V.S.V.; KUMAR, V. Molecular characterization of bixin—An important industrial product. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 48–53, 2010.

RANDOLPH, T.W. Supercritical fluid extractions in biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 8, p. 78, 1990.

RAO, A.V.; RAO, L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55 (3), p. 207–216, 2007.

RAWLINSON, C. F.; WILLIAMS, A. C.; TIMMINS, P.; GRIMSEY, I. Polymer-mediated disruption of drug crystallinity. **International Journal Pharmaceutics**, v. 336, p. 42–48, 2007.

REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M, POLING, B. E. **The properties of gases & liquids**. 4a ed. ed. [S.l.]: McGraw-Hill Book Company, 1988. p. 741.

REVERCHON, E. Supercritical antisolvent precipitation of micro and nanoparticles. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 15 (1), p. 1–21, 1999.

REVERCHON, E., Supercritical-assisted atomization to produce micro- and/or nanoparticles of controlled size and distribution. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 41, p. 2405 – 2411, 2002.

REVERCHON, E.; ADAMI, R.; CAPUTO, G.; DE MARCO, I. Spherical microparticles production by supercritical antisolvent precipitation: Interpretation of results. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 70–84, 2008.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I.; DELLA PORTA, G. Tailoring of nano- and micro-particles of some superconductor precursors by supercritical antisolvent precipitation. **Journal Supercritical Fluids**, v. 23, p. 81, 2002.

REVERCHON, E.; TORINO, E.; DOWY, S.; BRAUER, A.; LEIPERTZ, A. Interactions of phase equilibria, jet fluid dynamics and mass transfer durins supercritical antisolvent micronization. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, p. 446–458, 2010.

RIBEIRO, H.S.; RICO, L.G.; BADOLATO, G.G.; SCHUBERT, H. Production of O/W emulsions containing astaxanthin by repeated premix membrane emulsification. **Journal of Food Science**, v. 70(2), p. 117–123, 2005.

RIOS, A.O.; ANTUNES, L.M.G.; BIACHI, M.L.P. 2009 (Bixin and lycopene modulation of free radical generation induced by cisplatin–DNA interaction. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1113–1118, 2009.

RIOS, A.O.; MERCADANTE, A.Z. Optimization of the conditions to obtain bixin crystals and for extraction and saponification to quantify bixin in extruded snacks by HPLC. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 203-213, 2004.

RIPPKA, R.; DERUELES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

ROCO, M.C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 337- 346, 2003.

RODRIGUES, M.; PEIRCO, N.; MATOS, H.; AZEVEDO, E.G.; LOBATO, M.R.; ALMEIDA, A.J. Microcomposites theophylline/hydrogenated palm oil from a PGSS process for controlled drug delivery systems. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 29, p. 175–184, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Critical review of provitamin A in plant foods. *Journal Micronutrition Anal.*, v. 5, p. 191-225, 1989.

RODRIGUEZ-SAIZ, M.R.; FUENTE, J.L.; BARREDO, J.L. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, p. 645–658, 2010.

SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 20–31, 2007.

SAHOO, S.K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discov Today**, v. 8, p. 1112- 1120, 2003.

SAITO, M.; YAMAUCHI, Y.; OKUYAMA, T. Fractionation by packedcolumn SFC and SFE. **VCH**, New York (1994).

SÁNCHEZ-CONTRERAS, A.; JIMÉNEZ, M.; SANCHES, S. Bioconversion of lutein to products with aroma. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 54, 528-534, 2000.

SANDLER, S. I. **Chemical and engineering thermodynamics**. 2a. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd., 1989. p. 622.

SATO, M.; RAMARATHNAM, N.; SUSUKI, Y.; OHKUBO, T.; TAKEUCHI, M.; OCHI, H. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 37–41, 1996.

SCHROEDER, W.A.; JOHNSTON, E.A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodoxyma*. **The Journal of Biological Chemistry**, 270, 18374-18379, 1995.

SHAO, A.; HATHCOCK, J.N. Risk assessment for the carotenoids lutein and lycopene. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45 (3), p. 289–298, 2006.

SHARMA, R.; RAY, A.R.J.S.M. **Reviews in Macromolecular Chemistry & Physics**, v. 35(2), p. 327-359, 1995.

SIVA, R.; MATHEW, G.J.; VENKAT, A.; DHAWAN, C. An alternative tracking dye for gel electrophoresis. **Current Science**, v. 94 (6), p. 765–767, 2008.

SNODDERLY, D.M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62(6), p. 1448-1461, 1995.

SOBRATTEE, M.A.; NEERGHEENA, V.S.; LUXIMON-RAMMAA, A.; ARUOMAB, O.I.; BAHORUNA, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 57(9), p. 200–213, 2005.

SU, X.; D'SOUZA, D.H. Grape seed extract for control of human enteric viruses. **Applied and Environment Microbiology**, v. 77, p. 3982–3987, 2011.

SUH, M.H.; YOO, S.H.; LEE, H.G. Antioxidative activity and structural stability of microencapsulated  $\gamma$ -oryzanol in heat-treated lards. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1065–1070, 2007.

SUO, Q.L.; HE, W.Z.; HUANG, Y., C.; LI, C.P.; HONG, H.L.; LI, Y.X.; ZHU, M. D. Micronization of the natural pigment-bixin by the SEDS process through prefilming atomization. **Powder Technology**, 154, 110-115, 2005.

T.; DUARTE, C.M.M. Antimicrobial activity of lavender essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 243– 250, 2013.

TABERNERO, A.; DEL VALLE, E.M.M.; GÁLAN, M.A. Precipitation of tretinoin and acetaminophen with solution enhanced dispersion by

supercritical fluids (SEDS). Role of phase equilibria to optimize particle diameter. **Powder Technology**, v. 217, p. 177–188, 2012.

TACHAPRUTINUN, A.; UDONSUP, T.; LUADTHONG, C.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. Preventing the thermal degradation of astaxanthin through nanoencapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 374, p. 119–124, 2009.

TAN, B. Appropriate spectrum vitamin E and new perspectives on desmethyl tocopherols and tocotrienols. **Journal American Nutraceutical Association**, v. 8, p. 35–42, 2005.

TAN, B.; FOLEY, J. Tocotrienols and geranylgeraniol from Bixaorellana byproducts. **Patent US6350453**, 2002.

TANAKA, T.; MAKITA, H.; OHNISHI, M.; MORI, H.; SATOH, K.; HARA, A. Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. **Cancer Research**, v. 55(18), p. 4059-4064, 1995.

TANAKA, T.; MORISHITA, Y.; SUZUI, M.; KOJIMA, T.; OKUMURA, A.; MORI, H. Chemoprevention of mouse urinary-bladder carcinogenesis by the naturally-occurring carotenoid astaxanthin. **Carcinogenesis**, v. 15(1), p. 15-19, 1994.

TAVANA, A.; RANDOLPH, A.D. Manipulating solids CSD in a supercritical fluid crystallizer – CO<sub>2</sub> – benzoic acid. **AIChE Journal**, v. 35 (10), p. 1625–1630, 1989.

TURK, M.; HILS, P.; HELFGEN, B.; SCHABER, K.; MARTIN, H.J.; WAHL, M.A. Micronization of pharmaceutical substances by the Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS): a promising method to improve bioavailability of poorly soluble pharmaceutical agents. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, p. 75–84, 2002.

VARONA, S.; KARETH, S.; COCERO, M. J. Encapsulation of essentials oils using biopolymers for their use in ecological agriculture. **In: proceedings of 9th International Symposium on Supercritical Fluids**, Arcachon (France), 2009.

VARONA, S.; KARETH, S.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J. J. Formulation of lavandin essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 369-377, 2010.

VARONA, S.; ROJO, S.R.; MARTIN, A.; COCERO, M.J.; SERRA, A.T.; CRESPO, T.; DUARTE, C.M.M. Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 243– 250, 2013.

VATAI, T.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 246–254, 2009.

VERNHET, A.; PELLERIN, P.; PRIEUR, C.; OSMIANSK, J.; MOUTOUNET, M. Charge properties of some grape and wine polysaccharide and polyphenolic fractions. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 47, p. 25–30, 1996.

WANG, Y.; WANG, Y.; YANG, J.; PFEFFER, R.; DAVE, R.; MICHNIAK, B. The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery. **Powder Technology**, v. 164, p. 94–102, 2006.

WEIDNER, E. Review - High pressure micronization for food applications. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 556–565, 2009.

WILLIAMS, D. Nanotechnology: a new look. **Medical Device Technology**, v. 15, p. 9 – 10, 2004.

YALCIN, E.; ORUC, E.; CAVUSOGLU, K.; YAPAR, K. Protective role of grape seed extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity and genotoxicity in albino mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 917–925, 2010.

YAMAKOSHI, J.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KIKUCHI, M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 599–607, 2002.

YANG, J.; MARTINSON, T.E.; LIU, R.H. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, v. 116(1), p. 332–339, 2009.

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

YILMAZ, E. E.; ÖZVURAL, E. B.; VURAL, H. Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis Vinifera*) using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 924–928, 2011.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R.T. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.255–260, 2004.

YLMAZ, E.E.; ÖZVURAL, E.B.; VURAL, H. Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis Vinifera*) using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 924–928, 2011.

YUAN, C.; DU, L.; JIN, Z.; XU, X. Storage stability and antioxidant activity of complex of astaxanthin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 385– 389, 2013.

YUAN, C.;JIN, Z.; XU, X.; ZHUANG, H.; SHEN, W. Preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin whit hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 109, p. 264–268, 2008.

YUAN, J.P.; CHEN, F. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalgae *Haematococcus pluvialis*. **Food Chemistry**, v. 68, p. 443–448, 2000.

ZEB, A.; MEHMOOD, S. Carotenoids contents from various sources and their potential health applications. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 3(3), p. 199–204, 2004.

ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Encapsulation of bixin in sodium caseinate to deliver the colorant in transparent Dispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 1-9, 2013.



ZHANG, Y.Z.; LIAO, M.X.; YIN, G.F.; YUAN, P.; HUANG, Z.B.; GU, J.W.; YAO, Y.D.; CHEN, X.C. Preparation of water soluble drugs-loaded microparticles using modified solution enhanced dispersion by supercritical CO<sub>2</sub>. **Powder Technology**, v. 221, p. 343–350, 2012.

ZHAO, L.; CHEN, F.; ZHAO, G.; WANG, Z.; LIAO, X.; HU, X. Isomerization of *trans*-Astaxanthin Induces by Copper(II) Ion in Ethanol. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 9620–9623, 2005.

## APÊNDICE A – DIAGRAMAS ESQUEMÁTICOS EM 3D DA UNIDADE PROPOSTA PARA AMPLIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICRO E NANOPARTÍCULAS.

Figura 32 – Diagrama exploratório em 3D da unidade para ampliação da produção de micro/nanopartículas mostrando a linha de  $\text{CO}_2$ .

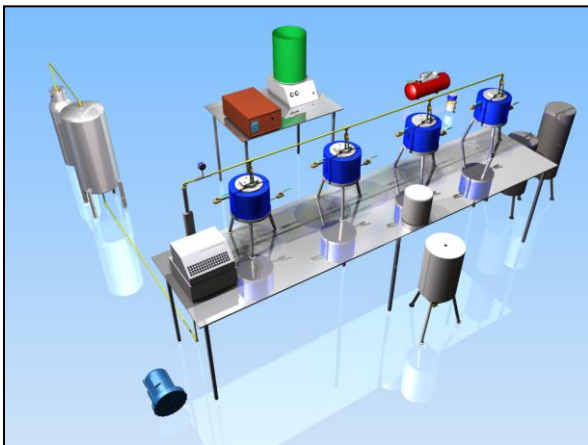


Figura 33 – Diagrama exploratório em 3D da unidade para ampliação da produção de micro/nanopartículas mostrando a linha para o princípio ativo.

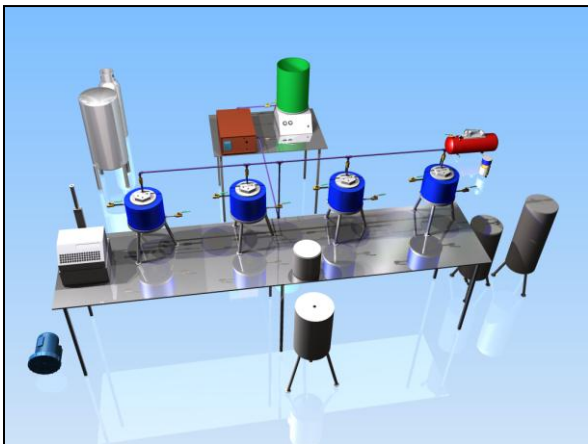


Figura 34 – Diagrama exploratório em 3D da unidade para ampliação da produção de micro/nanopartículas mostrando a linha de coleta de amostra.

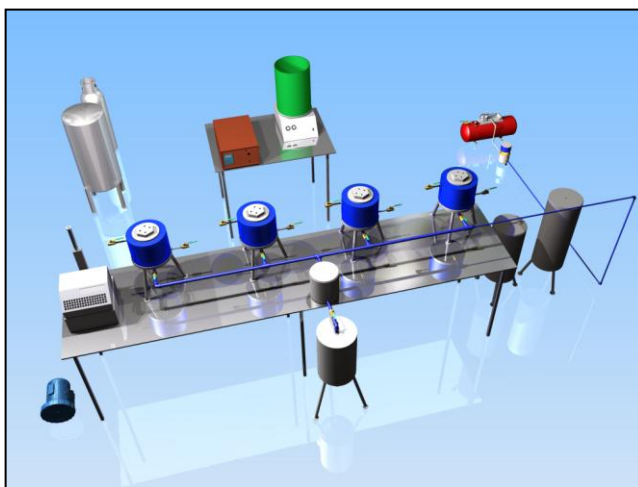


Figura 35 – Diagrama exploratório em 3D da unidade para ampliação da produção de micro/nanopartículas mostrando a linha de recirculação de CO<sub>2</sub>.

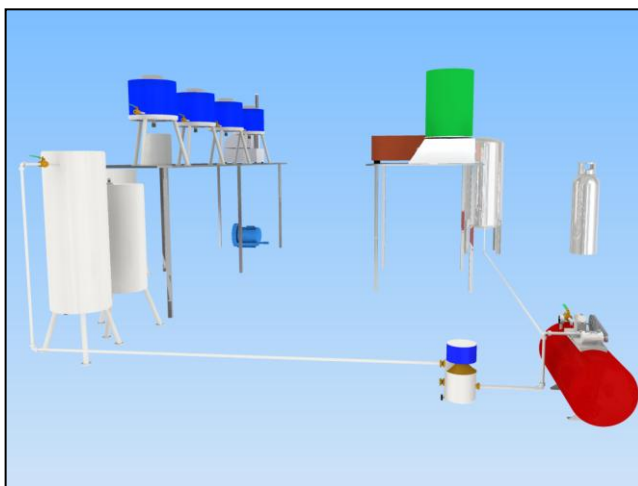


Figura 36 – Diagrama exploratório em 3D da unidade para ampliação da produção de micro/nanopartículas mostrando a linha de coleta de solvente.

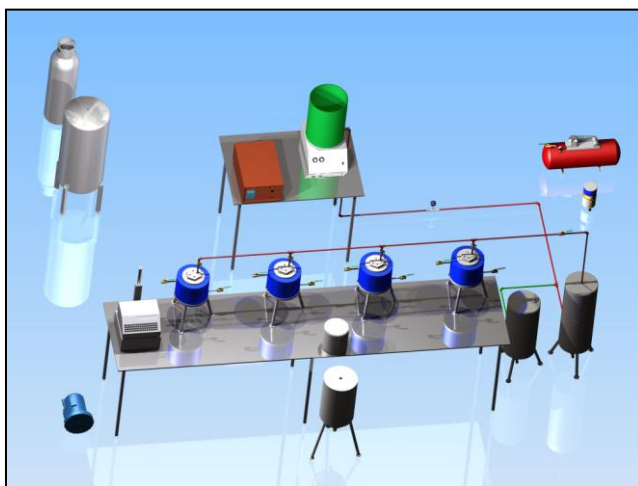


Figura 37 – Diagrama exploratório em 3D da unidade para ampliação da produção de micro/nanopartículas mostrando a linha de ar quente para término da secagem das amostras.

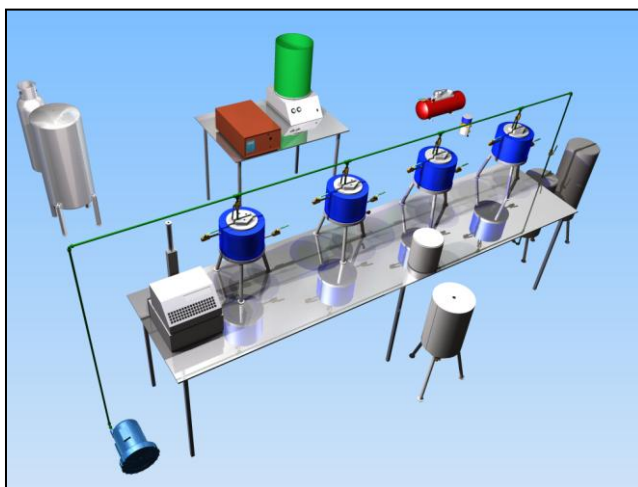


Figura 38 – Diagrama exploratório em 3D da unidade completa para ampliação da produção de micro/nanopartículas.

