

Camila Dal Magro

**COPRECIPITAÇÃO DE TRANS-RESVERATROL EM PHBV
UTILIZANDO A TÉCNICA DE DISPERSÃO DE SOLUÇÃO
AUMENTADA POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lanza

Coorientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Florianópolis
2017

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

Dal Magro, Camila
Coprecipitação de trans-resveratrol em PHEV
utilizando a técnica de Dispersão de Solução
Aumentada por Fluidos Supercríticos / Camila Dal
Magro ; orientador, Marcelo Lanza; coorientador,
José Vladimir Oliveira - SC, 2017.
101 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.


1. Engenharia de Alimentos. 2. Trans
resveratrol. 3. Partículas submicrométricas. 4.
SEDS. 5. Dióxido de carbono supercrítico. I. Lanza,
Marcelo. II. Oliveira, José Vladimir. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

“COPRECIPITAÇÃO DE TRANS-RESVERATROL EM PHBV UTILIZANDO A TÉCNICA DE DISPERSÃO DE SOLUÇÃO AUMENTADA POR FLUÍDOS SUPERCRÍTICOS”


Por

Camila Dal Magro

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




Prof. Marcelo Lanza
Orientador




Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira
Coorientador

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi
Coordenador

Banca Examinadora:




Prof. Dr. Marcelo Lanza



Prof. Dr. Wagner Luiz Priamo



Prof. Dr. Angelo Luis Stapassoli
Piatto



Dr. Josamaique Gilson Venerai

Florianópolis, 10 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meu caminho, dando-me força e saúde para alcançar minhas metas.

A meus orientadores, professor Marcelo e professor Vladimir, pelos ensinamentos, orientações, apoio e motivação, tão importantes ao longo deste trabalho.

A meus pais Rui e Terezinha, por todos os princípios, amor e apoio, por nunca medirem esforços para que eu alcançasse meus objetivos. À Letícia, pela amizade e compreensão que só os irmãos são capazes de ter.

Ao Zeno, pelo companheirismo e motivação, por sua enorme paciência e amor incondicional. Obrigada por sempre me incentivar a seguir meus sonhos e estar ao meu lado para alcançá-los.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pelo carinho e acolhimento, por compartilharem seus conhecimentos e vivências. De modo especial à Aline, Heloísa, Rafaela, Talyta e Santiago.

Ao Evertan, pela parceria no estudo de comportamento de fases.

Ao Gean, por toda a dedicação, auxílio, cobranças, compreensão e motivação na execução deste trabalho. Sou extremamente grata por tudo que tem feito.

Ao Josamaique, pela grande parceria no desenvolvimento deste trabalho, por todo o auxílio, apoio e por todos os conhecimentos compartilhados.

Ao Felipe, pelo auxílio na utilização do Solidworks.

Ao Gabriel e aos alunos de iniciação científica, Lorenzo, Roberto e Lucas, pelo auxílio na execução dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL) da UFSC, pela oportunidade e apoio para a realização deste trabalho. Aos professores, pelos ensinamentos repassados.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos e Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, pelas análises realizadas.

À banca examinadora, pela atenção e valorosas contribuições.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.

(Isaac Newton)

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

Coprecipitação de trans-resveratrol em PHBV utilizando a técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos

Por quê?

- Compostos bioativos como o trans-resveratrol apresentam baixa solubilidade e biodisponibilidade, elevado metabolismo e instabilidade;
- A coprecipitação em uma matriz polimérica é uma alternativa para proteger o composto ativo dos agentes externos, além de possibilitar sua liberação controlada;
- A utilização de tecnologias supercríticas no processo de coprecipitação permite a obtenção de partículas com menor tamanho e distribuição de tamanho de partícula, favorecendo o aumento da solubilidade do composto ativo.

Quem já fez?

- Consta na literatura trabalhos envolvendo diferentes técnicas de encapsulamento de trans-resveratrol, empregando diversos tipos de agentes encapsulantes, inclusive poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV);
- Entretanto, não há trabalhos que façam uso de tecnologia supercrítica para coprecipitação de trans-resveratrol em PHBV;
- O estudo de liberação *in vitro* das partículas produzidas muitas vezes não é avaliado. Também há escassez de trabalhos que avaliam o efeito de proteção das partículas frente à ação da luz ultravioleta.

Hipótese?

- É possível coprecipitar trans-resveratrol em PHBV por meio da técnica SEDS obtendo bons valores de percentual real e eficiência de encapsulamento?
- As partículas coprecipitadas apresentam melhores propriedades *in vitro* que o trans-resveratrol não processado?
- A utilização do polímero é eficiente para proteção do composto ativo contra agentes externos?
- O perfil de liberação apresentado demonstra a possibilidade de aplicação industrial do produto?

Como fazer?

- Estudar o processo de coprecipitação de trans-resveratrol em PHBV a fim de obter os melhores percentuais de encapsulamento e eficiência de encapsulamento;
- Caracterizar as partículas coprecipitadas em relação ao tamanho e distribuição de tamanho de partícula, morfologia, grau de cristalinidade, presença de solvente residual e atividade antioxidante;
- Avaliar a capacidade de proteção do polímero frente à ação da radiação ultravioleta sobre o trans-resveratrol;
- Estudar o perfil de liberação *in vitro* das partículas coprecipitadas em diferentes meios de liberação.

RESUMO

O trans-resveratrol é um composto polifenólico naturalmente presente em diferentes espécies vegetais, produzido pelas plantas em situações adversas. Diversos estudos *in vitro* tem provado propriedades benéficas à saúde relacionadas a sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e cardioprotetora, entre outras. O presente trabalho teve como objetivo coprecipitar trans-resveratrol em poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato) (PHBV) por meio da técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (*Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids*, na sigla em inglês SEDS) utilizando um Delineamento Composto Central (DCC) ²² com 3 pontos centrais, a fim de avaliar a influência da pressão de processo (80, 115 e 150 bar) e da concentração de trans-resveratrol (4, 12 e 20 mg·mL⁻¹) sobre o percentual de encapsulamento (PE%), eficiência de encapsulamento (EE%) e tamanho médio de partícula (\bar{X}) produzidos. Eficiências de encapsulamento de até 99,54% foram obtidas na condição de 20 mg·mL⁻¹ de trans-resveratrol e 80 bar, para as quais a pressão do sistema apresentou um efeito significativo negativo (ao nível de confiança de 95%). As partículas coprecipitadas apresentaram predominantemente morfologia esférica e seus tamanhos variaram entre 390 e 570 nm, caracterizando-as como partículas submicrométricas. Análises das partículas formadas mostraram que o processo de coprecipitação não afetou a estrutura química do trans-resveratrol, mas reduziu sua cristalinidade, aumentou sua atividade antioxidante e fotoestabilidade. Demonstrou-se que as partículas coprecipitadas encontram-se livres de solvente orgânico e, portanto, em concordância com os padrões estipulados pelos órgãos reguladores. O comportamento de liberação foi caracterizado por um *burst* inicial e uma segunda fase estacionária, o que possibilita o uso das partículas para liberação de trans-resveratrol a longo prazo.

Palavras-chave: Trans-resveratrol. Partículas submicrométricas. SEDS. Dióxido de carbono supercrítico.

ABSTRACT

Resveratrol is a polyphenolic compound naturally found in diverse vegetable species, produced by plants in adverse situations. Several studies *in vitro* have proved health beneficial properties related to its antioxidant activity, anti-inflammatory and cardioprotective activities, among others. The purpose of this work was to co-precipitate resveratrol in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) by the Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids (SEDS) technique using a 2² Central Composite Design (CCD) with 3 central points, in order to evaluate the influence of pressure (80, 115 and 150 bar) and resveratrol concentration (4, 12 and 20 mg·mL⁻¹) on the percentage of encapsulation (PE%), encapsulation efficiency (EE%) and particle size (\bar{X}) produced. Encapsulation efficiencies as high as 99.54% was obtained at 20 mg·mL⁻¹ resveratrol concentration and 80 bar, for which system pressure showed a negative effect (95% confidence level). The co-precipitated particles were mostly spherical and the sizes ranged from 390 to 570 nm, which characterizes sub-micrometric particles. Analyses of the formed particles proved that the co-precipitation process did not affect the chemical structure of resveratrol but reduced its crystallinity, improved its antioxidant activity and photostability. It was shown that co-precipitated particles are free of organic solvents, and therefore in accordance with the standards set by the regulatory agencies. The release behavior was characterized by an initial burst and a second stationary phase, which enables the use of particles for long-term resveratrol delivery.

Keywords: Trans-resveratrol. Sub-micrometric particles. SEDS. Supercritical carbon dioxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química dos isômeros trans-resveratrol e cis-resveratrol.....	27
Figura 2 – Diferentes configurações de partículas	30
Figura 3 – Bocais coaxiais utilizados para introdução simultânea do (a) fluido supercrítico e (b) solução orgânica contendo o composto ativo e agente encapsulante no processo SEDS	32
Figura 4 – Estrutura química do (a) PHB e (b) copolímero PHBV.....	35
Figura 5 – Fluxograma apresentando as etapas utilizadas para realização deste trabalho	38
Figura 6 – Diagrama esquemático do aparato experimental de coprecipitação utilizado.....	39
Figura 7 – Vista geral da unidade experimental de coprecipitação.....	40
Figura 8 – Curva padrão de absorvância de trans-resveratrol em 325 nm em função de suas concentrações em dimetilsulfóxido.....	44
Figura 9 – Esquema da caixa de irradiação utilizada para análise de fotoestabilidade das partículas. (1) Tampa superior; (2), (3), (4) e (5) lâmpadas UVA (8 W de potência nominal); (6) lâmpada UVA/UVB (26 W de potência nominal); (7) suporte para colocação da amostra; (8) acionamento da lâmpada	49
Figura 10 – Diagrama de Pareto apresentando os efeitos do processo de coprecipitação sobre a eficiência de encapsulamento	55
Figura 11 – Diagrama de Pareto apresentando os efeitos do processo de coprecipitação sobre o percentual real de encapsulamento	56
Figura 12 – Curva de contorno para o percentual real de encapsulamento em função da pressão e concentração de trans-resveratrol.....	58
Figura 13 – Gráfico de valores observados vs. valores preditos	58
Figura 14 – Micrografias das partículas de trans-resveratrol em PHBV nas condições experimentais 1 a 7 e do trans-resveratrol puro (RvL). Condições experimentais: 1: 80 bar, 4 mg·mL ⁻¹ ; 2: 150 bar, 4 mg·mL ⁻¹ ; 3: 80 bar, 20 mg·mL ⁻¹ ; 4: 150 bar, 20 mg·mL ⁻¹ ; 5, 6 e 7 (pontos centrais): 115 bar, 12 mg·mL ⁻¹	60
Figura 15 – Microscopia confocal de fluorescência das partículas obtidas no experimento 3 previamente lavadas (1), não lavadas (2), trans-resveratrol puro (3) e PHBV puro micronizado (4)	63
Figura 16 – Cinética de degradação do trans-resveratrol frente a exposição à luz UVA/UVB. Resveratrol: refere-se ao composto puro, E3: partículas coprecipitadas na condição experimental 3 e E6: partículas obtidas na condição 6. Dados são expressos como média ± desvio padrão	66

Figura 17 – Espectros no infravermelho com transformada de Fourier do trans-resveratrol e PHBV puros, das partículas coprecipitadas obtidas nos experimentos 2 (E2), 3 (E3), 5 (E5) e no experimento 5 após 60 min de exposição à luz UVA/UVB (E5 fotodegradadas). 1: alongamento da dupla C–C aromático; 2: alongamento da ligação C–C olefínica; 3: alongamento C–O; 4: banda olefínica trans; 5: alongamento C=O; 6: intervalo de vibração do alongamento –C–O–C– antissimétrico e 7: –C–O–C– simétrico; 8: dissipação da banda trans típica.....	68
Figura 18 – Difração de raio X de pó do trans-resveratrol puro (Resveratrol), PHBV puro (PHBV) e das partículas obtidas na condição experimental 3 (Partículas)	69
Figura 19 – Termogramas do trans-resveratrol puro, PHBV puro e das partículas obtidas nos experimentos de coprecipitação 1, 2 e 3 (E1, E2 e E3 respectivamente).....	71
Figura 20 – Perfis de liberação <i>in vitro</i> das partículas obtidas nas condições de coprecipitação 3 e 4 (E3 e E4) nos meios de liberação PBS pH 6,8 e HCl 0,1 M. Os dados são expressos como média ± desvio padrão.....	72
Figura 21 – Isotermas de equilíbrio líquido-vapor do sistema ternário CO ₂ + diclorometano + acetona. w ₁ : fração mássica de CO ₂ ; ELV-PB: equilíbrio líquido-vapor observado por meio do ponto de bolha	89
Figura 22 – Esquema com dimensões da caixa de irradiação para análise de fotoestabilidade das partículas de trans-resveratrol coprecipitadas em PHBV	91
Figura 23 – Curva de calibração para quantificação de ppm residual de diclorometano	95
Figura 24 – Curva de calibração para quantificação de ppm residual de acetona	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições experimentais de coprecipitação de trans-resveratrol em PHBV com as variáveis de processo utilizadas.....	43
Tabela 2 – Resultados do percentual real de encapsulamento e eficiência de encapsulamento do trans-resveratrol encapsulado em PHBV	53
Tabela 3 – Análise de variância para o percentual real de encapsulamento de trans-resveratrol em PHBV	57
Tabela 4 – Medidas de tamanho mínimo (X_{\min}), tamanho máximo (X_{\max}), tamanho médio (\bar{X}), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) das partículas de trans-resveratrol coprecipitadas em PHBV.....	61
Tabela 5 – Valores de EC_{50} obtidos para o trans-resveratrol puro e para as partículas coprecipitadas	65
Tabela 6 – Doses de irradiação aplicadas às amostras de trans-resveratrol puro e partículas de trans-resveratrol coprecipitadas em PHBV	93
Tabela 7 – Resultados dos cálculos de quantificação de acetona e diclorometano residual a partir das curvas de calibração	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Atividade antioxidante
Abs_{amostra} – Absorbância da amostra
Abs_{branco} – Absorbância do branco
Abs_{controle} – Absorbância do controle
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA – Análise de variância
ASES – Sistema de Extração de Solvente em Aerossol
C – Concentração de trans-resveratrol na solução orgânica
CG-FID – Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama
CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CV – Coeficiente de variação
CO₂ – Dióxido de carbono
DCC – Delineamento composto central
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DRX – Difração de raio X de pó
DSC – Calorimetria diferencial de varredura
DTP – Distribuição de tamanho de partícula
EC₅₀ – Mínima concentração efetiva necessária para decrescer em 50% a concentração inicial do radical DPPH
EE – Eficiência de encapsulamento
F – Teste de Fisher
FTIR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GAS – Gás Antissolvente
GL – Graus de liberdade
HCl – Ácido clorídrico
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
HB – Hidroxibutirato
HV – Hidroxivalerato
ICH – Conferência Internacional em Harmonização
LATESC – Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica
LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
M – massa molar
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MQ – Média quadrática
P – Pressão
PBS – Solução tampão fosfato
P_c – Pressão crítica

PGSS – Partículas a partir de Solução Saturada com Gás
PHAs – Polihidroxialcanoatos
PHB – Poli(3-hidroxi butirato)
PHBV – Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato)
ppm – Partes por milhão
PRE – Percentual real de encapsulamento
PTE – Percentual teórico de encapsulamento
RESS – Expansão Rápida da Solução Supercrítica
ROS – Espécies reativas de oxigênio
rpm – Rotações por minuto
RvL – Trans-resveratrol
SAS – Antissolvente Supercrítico
SEDS – Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos
SQ – Soma quadrática
 T_c – Temperatura crítica
TP – Tamanho de partícula
UV – Ultravioleta
UVA – Ultravioleta A
UVB – Ultravioleta B
UV-Vis – Ultravioleta visível
 X_{\min} – Tamanho mínimo de partícula
 X_{\max} – Tamanho máximo de partícula
 \bar{X} – Tamanho médio de partícula
 σ – Desvio padrão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	OBJETIVOS.....	25
1.1.1	Objetivo Geral	25
1.1.2	Objetivos Específicos	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1	TRANS-RESVERATROL	27
2.2	COPRECIPITAÇÃO E FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS	28
2.3	EMPREGO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	30
2.4	TÉCNICA DE DISPERSÃO DE SOLUÇÃO AUMENTADA POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	32
2.5	PHBV	33
2.6	CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE.....	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS E DO PROCESSAMENTO	37
3.2	UNIDADE EXPERIMENTAL DE COPRECIPITAÇÃO	38
3.3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL PARA COPRECIPITAÇÃO DE TRANS-RESVERATROL EM PHBV	41
3.4	SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS UTILIZADAS	42
3.5	DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL REAL DE ENCAPSULAMENTO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO..	44
3.6	MORFOLOGIA E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA	46
3.7	AVALIAÇÃO DAS PARTÍCULAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA	46
3.8	ANÁLISE DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SOLVENTE RESIDUAL	47
3.9	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH)	47
3.10	AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO CONTRA AÇÃO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA	48
3.11	ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	50
3.12	ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIO X DE PÓ (DRX).....	50
3.13	ANÁLISE DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).....	50
3.14	ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO TRANS-RESVERATROL.....	51
3.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	51

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	PERCENTUAL REAL DE ENCAPSULAMENTO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO	53
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS COPRECIPITADAS.....	59
4.3	MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA	62
4.4	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SOLVENTE RESIDUAL.....	64
4.5	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH.....	64
4.6	PROTEÇÃO CONTRA AÇÃO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.....	65
4.7	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	67
4.8	DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE PÓ (DRX).....	69
4.9	CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).....	70
4.10	COMPORTAMENTO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO TRANS-RESVERATROL.....	72
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	75
5.1	CONCLUSÕES.....	75
5.2	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	76
6	PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DECORRENTE DA EXECUÇÃO DESTE TRABALHO.....	77
6.1	TRABALHOS SUBMETIDOS EM PERIÓDICOS	77
6.2	TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	79
	APÊNDICE A – Comportamento de fases do sistema ternário CO₂ + diclorometano + acetona.....	89
	APÊNDICE B – Esquema da caixa de irradiação para análise de fotoestabilidade	91
	APÊNDICE C – Doses de irradiação aplicadas às amostras na análise de fotoestabilidade.....	93
	APÊNDICE D – Curvas de calibração construídas por CG-FID... ..	95
	APÊNDICE E – Resultados de quantificação de ppm residual de solventes	97
	ANEXO A – Certificado de análise do trans-resveratrol emitido pelo fabricante Jiaherb Phytochem – Xi’an, China.....	99
	ANEXO B – Certificado de análise do trans-resveratrol emitido pelo fornecedor SM Empreendimentos – São Paulo, Brasil.....	101

1 INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produtos do metabolismo celular, continuamente removidas por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, por meio de um balanço pró-oxidante/antioxidante. Entretanto, em condições de estresse oxidativo, em que a produção de radicais livres supera a capacidade antioxidante celular, macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA podem ser danificadas, causando alterações na estrutura celular, em seu metabolismo, diferenciação e proliferação. Espécies reativas de oxigênio, entre as quais se encontram ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete, são apontadas como fatores importantes no desenvolvimento de condições patológicas como imunossupressão, inflamações e carcinogênese, além do próprio envelhecimento (CADDEO et al., 2008; GOKCE et al., 2012).

O uso de antioxidantes provenientes de fontes vegetais, especialmente compostos polifenólicos, no combate aos radicais livres tem atraído o interesse das indústrias farmacêutica, química e de alimentos, frente aos muitos benefícios apresentados à saúde humana. Entre este grupo de compostos, o trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxitilbeno) é uma fitoalexina encontrada em plantas como amoras, amendoim, cacau e uvas, além de fontes não comestíveis como eucalipto (FRÉMONT, 2000). O trans-resveratrol tem apresentado propriedades cardioprotetoras, quimiopreventivas, efeito anti-inflamatório e elevado potencial no combate a processos neurodegenerativos, infecções virais e cânceres (AGGARWAL et al., 2004; SUN et al., 2011).

Entretanto, o uso comercial do trans-resveratrol apresenta algumas limitações devido a sua baixa solubilidade e biodisponibilidade, elevado metabolismo e alta instabilidade frente a fatores como luz, ar e enzimas oxidativas (MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011). Assim, torna-se necessário adotar medidas que garantam a proteção do composto e mantenham sua integridade estrutural até o momento de seu consumo ou administração.

O desenvolvimento de partículas submicrométricas permite superar estas limitações, pois o aumento da área superficial efetiva das partículas resultante da redução de tamanho permite uma maior solubilidade, rápida dissolução e adesão aos tecidos biológicos, aumentando assim a biodisponibilidade do composto. A proteção do composto ativo contra agentes externos pode ser alcançada por meio da coprecipitação em polímeros, que propicia ainda o controle da liberação

do princípio ativo, garantindo o alcance da concentração efetiva necessária no local de ação, sem acarretar em efeitos tóxicos.

O poli(3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV) é um poliéster biodegradável atóxico, biocompatível, produzido por micro-organismos em condições de crescimento desfavoráveis (COSTA et al., 2007; RIEKES et al., 2011). Sua utilização encontra vasta aplicação nas indústrias de alimentos e biomédica, no encapsulamento de compostos bioativos, por exemplo, por permitir um sistema de liberação controlada, sendo degradado gradualmente no corpo humano (CHEN; WU, 2005; PRIAMO et al., 2011).

A coprecipitação e encapsulamento de compostos ativos podem ser realizados por meio de diversas técnicas, muitas delas bem consolidadas. Entretanto, as técnicas convencionais apresentam algumas desvantagens como uso excessivo de solventes prejudiciais ao organismo humano e ao meio ambiente, possibilidade de degradação térmica e química do composto ativo, difícil controle do tamanho e distribuição de tamanho de partícula (COCERO et al., 2009).

Tais dificuldades podem ser superadas por meio das tecnologias supercríticas, as quais permitem a obtenção de produtos livres de solvente, com fácil controle de tamanho e distribuição de tamanho de partícula e, usualmente, trabalham em condições de temperatura amenas, evitando a degradação dos compostos bioativos. Fundamentadas nas propriedades únicas dos fluidos supercríticos, intermediárias entre líquidos e gases, as diferentes técnicas de coprecipitação em meio supercrítico podem empregá-los na forma de soluto, solvente ou antissolvente (YEO; KIRAN, 2005).

A técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (*Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids*, na sigla em inglês SEDS) encaixa-se nesta última classificação e baseia-se na redução da solubilidade do princípio ativo em um solvente orgânico por meio de sua saturação com o fluido supercrítico, causando a extração do solvente e precipitação do substrato. Nesta técnica, o fluido supercrítico atua ainda na dispersão da solução, aumentando a transferência de massa e possibilitando a obtenção de menores tamanhos de partícula (JUNG; PERRUT, 2001).

Neste contexto, a proposta deste trabalho mostra-se relevante frente à possibilidade de melhorar a solubilidade e proteção de um composto com promissoras propriedades à saúde, sendo os objetivos do trabalho apresentados a seguir.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral coprecipitar partículas de PHBV com trans-resveratrol por meio da técnica SEDS, utilizando o dióxido de carbono como fluido supercrítico.

1.1.2 Objetivos Específicos

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

- Coprecipitar trans-resveratrol em PHBV utilizando acetona e diclorometano como solventes e dióxido de carbono pressurizado como antissolvente, por meio da técnica SEDS;
- Avaliar a influência das variáveis de processo pressão e concentração de trans-resveratrol nas características do coprecipitado;
- Analisar a morfologia das partículas de trans-resveratrol coprecipitadas em PHBV por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Determinar o tamanho e distribuição de tamanho das partículas;
- Determinar o Percentual Real de Encapsulamento (PRE) e a Eficiência de Encapsulamento (EE) do trans-resveratrol encapsulado em PHBV;
- Verificar possíveis degradações do composto por meio da análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier – FTIR;
- Identificar e quantificar possíveis resíduos de solventes nas partículas;
- Avaliar o grau de cristalinidade do trans-resveratrol coprecipitado por meio de difração de raio X (DRX);
- Analisar o perfil térmico do coprecipitado por meio de calorimetria diferencial de varredura (DSC);
- Analisar a estabilidade do trans-resveratrol coprecipitado frente à ação da luz ultravioleta;
- Realizar estudo de liberação *in vitro* do trans-resveratrol coprecipitado em PHBV.

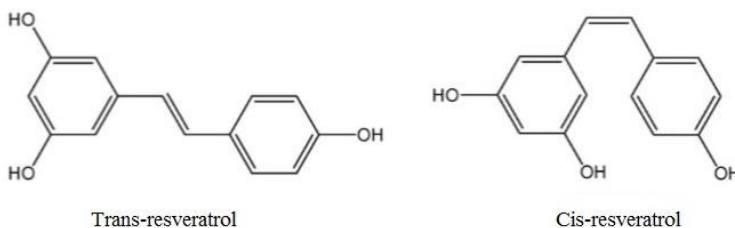
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TRANS-RESVERATROL

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxistilbeno) é um composto polifenólico pertencente ao grupo dos estilbenos, produzido por diversas espécies vegetais em situações de estresse, injúrias, radiação ultravioleta (UV) e ataque de patógenos. O composto foi inicialmente identificado em 1940 nas raízes de *Veratrum grandiflorum* O. Loes e em 1963 nas raízes de *Polygonum cuspidatum*, uma planta não comestível tradicionalmente utilizada em países asiáticos no tratamento de inflamações, alergias e hiperlipidemia, que continua sendo uma das maiores fontes de obtenção do composto. Desde então, foi identificado em diversas fontes comestíveis como uvas, amoras, morango, amendoim, pistache e cacau (COUNET; CALLEMIEN; COLLIN, 2006; SHI et al., 2008).

Quando extraído e purificado, o resveratrol caracteriza-se como um pó quase branco, com ponto de fusão entre 253 e 255 °C e massa molar igual a 228,25 g·mol⁻¹. Sua estrutura química consiste em dois anéis aromáticos ligados por uma ligação dupla de estireno, conforme apresentado na Figura 1. A dupla ligação permite a existência das formas isoméricas trans e cis-resveratrol (AGGARWAL et al., 2004).

Figura 1 – Estrutura química dos isômeros trans-resveratrol e cis-resveratrol



Fonte: Shi et al. (2008).

Diversos estudos têm demonstrado propriedades do trans-resveratrol benéficas à saúde humana, como atividade antioxidante, propriedades anti-inflamatórias e cardioprotetoras. Apresenta atividade antiviral, contra HIV e herpes simplex, por exemplo, e antimicrobiana

contra diversas bactérias, fungos e leveduras, podendo-se relacionar estas atividades com a atuação do trans-resveratrol como pró-oxidante e induzindo a ruptura do DNA na presença de íons de cobre (DOCHERTY et al., 2004; HEREDIA; DAVIS; REDFIELD, 2000; HWANG; LIM, 2015; ZHENG et al., 2006).

A elevada capacidade do trans-resveratrol em inibir a produção de espécies reativas de oxigênio pode estar relacionada à sua atividade anti-inflamatória e anticancerígena. O composto tem demonstrado potenciais propriedades quimiopreventivas suprimindo o processo de proliferação nas etapas de iniciação, promoção e progressão de diversas linhas de células cancerígenas como linfócitos, mama, glia e próstata (AGGARWAL et al., 2004).

Estudos tem demonstrado seu potencial em suprimir, retardar e reverter os efeitos deletérios da radiação UV às células da pele, preservando sua funcionalidade e estendendo seu tempo de vida (AFAQ; ADHAMI; AHMAD, 2003; NDIAYE et al., 2011; SIGNORELLI; GHIDONI, 2005).

Embora muitos estudos tenham demonstrado resultados promissores no uso do trans-resveratrol, muitas vezes estes resultados não se repetem *in vivo*, devido à elevada hidrofobicidade da estrutura polifenólica, elevado metabolismo e eliminação do composto e baixa biodisponibilidade. Além disso, o trans-resveratrol apresenta instabilidade frente a agentes externos como ar, radiação UV e enzimas oxidativas, sendo facilmente convertido para a forma isomérica *cis*, a qual apresenta menor atividade biológica (MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011; SANNA et al., 2012).

Assim, tornam-se necessárias alternativas capazes de aumentar a solubilidade do trans-resveratrol e protegê-lo de fatores adversos, garantindo seu acesso íntegro ao local de ação desejado.

No que se refere à indústria de alimentos, técnicas que reduzam a cristalinidade e melhorem a solubilidade do composto, permitem sua aplicação em uma variedade de alimentos em razão de suas propriedades funcionais, bem como químicas, possivelmente podendo substituir antioxidantes sintéticos. Proporcionando proteção e maior estabilidade ao composto é possível reduzir custos industriais e agregar valor aos alimentos.

2.2 COPRECIPITAÇÃO E FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS

A biodisponibilidade de compostos bioativos como o trans-resveratrol depende de sua absorção pelo organismo, a qual é afetada

pela velocidade de dissolução do composto e penetração por meio das membranas. Para tanto, o tamanho de partícula é um dos fatores mais importantes relacionados à absorção de um composto, pois partículas menores têm maior facilidade de transporte no organismo e maior área superficial disponível para reações.

Para que a administração de um composto seja efetiva, é necessário que as partículas apresentem tamanho entre 1 e 5 μm no caso de administração por inalação, entre 0,1 e 0,3 μm por via intravenosa e de 0,1 a 100 μm por via oral (KALANI; YUNUS, 2011).

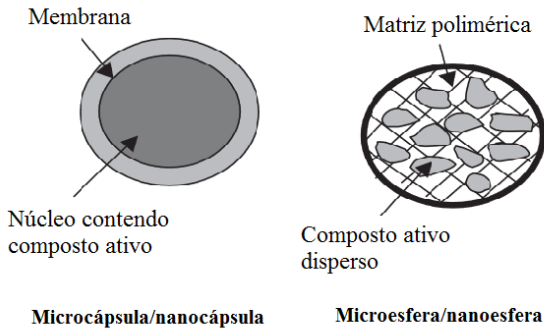
A liberação de fármacos em locais específicos, minimizando picos de concentração e efeitos colaterais, proteção do composto ativo e melhora de sua solubilidade podem ser conseguidos por meio da coprecipitação de sistemas particulados micro, submicro ou nanométricos, com possível encapsulamento ou dissolução do composto ativo em uma matriz polimérica (REVERCHON et al., 2009).

Além da importância na indústria farmacêutica, as nanopartículas e partículas submicrométricas encontram aplicação ao longo de toda a cadeia da indústria de alimentos, do controle de pestes na produção ao uso de sensores de patógenos e contaminantes em embalagens inteligentes. Podem ser utilizadas para aumentar a segurança dos alimentos por meio da liberação controlada de agentes antimicrobianos, melhorar a qualidade nutricional por meio do encapsulamento e liberação de compostos bioativos, desenvolver novas estruturas e texturas que permitem a redução de gorduras, açúcares e sódio (JOYE; MCCLEMENTS, 2013).

O processo de formação de partículas pode ser realizado por meio de diferentes técnicas, as quais se dividem em processos físicos, químicos ou físico-químicos. Entre os processos físicos, encontram-se técnicas convencionais como *spray-drying*, *spray-cooling*, *spray-chilling*, extrusão e liofilização, enquanto os processos de coacervação, co-cristalização, inclusão molecular, entre outros, constituem os processos químicos.

Em razão das diferentes técnicas de encapsulamento e dos materiais constituintes das microcápsulas, estas apresentam basicamente dois tipos de estruturas, mostradas na Figura 2. Partículas com geometria irregular, em que o composto ativo encontra-se na forma de agregados ou disperso aprisionado em uma matriz sólida, são denominadas micro ou nanoesferas. Por outro lado, partículas com geometria esférica, formadas por um núcleo bem delimitado envolvido pelo material de parede denominam-se micro ou nanocápsulas (JUNG; PERRUT, 2001).

Figura 2 – Diferentes configurações de partículas



Fonte: adaptado de Madene et al. (2006).

Existem divergências quanto à classificação de partículas com base em seu tamanho, entretanto, uma definição bem aceita caracteriza partículas menores que 100 nm como nanopartículas, partículas com diâmetro entre 100 e 1000 nm como submicrométricas e aquelas maiores que 1 μm como micropartículas (VYAS et al., 2017).

A liberação do composto ativo a partir da matriz é normalmente controlada pelos mecanismos de difusão e erosão do material de parede. A parede da cápsula atua como uma membrana semipermeável, enquanto ela mantém sua integridade, a difusão ocorre com a liberação de moléculas pequenas. Já a erosão refere-se à dissolução e degradação do agente encapsulante. Ambos os mecanismos dependem de parâmetros externos, como concentração do composto ativo no meio de liberação, pH e ação enzimática, e de propriedades das partículas, como tamanho, morfologia, capacidade de encapsulamento, interações químicas entre composto ativo e polímero (COCERO et al., 2009).

2.3 EMPREGO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

As tecnologias supercríticas têm demonstrado crescente potencial de aplicação nas indústrias farmacêutica, química e de alimentos, em razão da elevada qualidade dos produtos obtidos. Isto é possível devido à utilização dos fluidos supercríticos, substâncias que se encontram acima de suas condições de pressão e temperatura críticas, que apresentam propriedades únicas, inerentes a líquidos, como elevado

poder solvente e baixa tensão superficial, além de propriedades de transporte características de gases (BRUNNER, 1994).

Acima do ponto crítico, leves alterações na pressão resultam em grandes alterações na densidade do fluido e em outras propriedades relacionadas à densidade, como viscosidade e poder de solvatação (BERTUCCO; VETTER, 2001).

O fluido supercrítico mais empregado atualmente é o dióxido de carbono (CO_2), em razão de sua elevada pureza, baixo custo, pressão e temperatura críticas moderadas ($T_c = 31,4 \text{ }^\circ\text{C}$ e $P_c = 74 \text{ bar}$), que evitam a degradação de compostos termolábeis. Além disso, o CO_2 supercrítico é atóxico, não inflamável, inodoro, incolor e inerte, adequado para o processamento de substâncias facilmente oxidáveis (BRUNNER, 1994).

As tecnologias supercríticas permitem reduzir ou eliminar o uso de solventes orgânicos no processo, os quais são amplamente utilizados em diversos métodos convencionais. A alta solubilidade dos solventes orgânicos nos fluidos supercríticos permite sua completa remoção obtendo-se, assim, produtos livres de solvente, sem a necessidade de uma etapa de pós-processamento, comum nos métodos convencionais.

Os principais processos de formação de partículas utilizando fluidos supercríticos atuam empregando-os na forma de solvente, soluto ou antissolvente. O primeiro caso faz uso das variações do poder de solvatação do fluido supercrítico em razão de alterações na pressão do sistema. Um soluto inicialmente dissolvido no fluido supercrítico pode ser precipitado por meio da despressurização e consequente supersaturação da solução. Nesta categoria, a técnica de Rápida Expansão da Solução Supercrítica (RESS) é amplamente difundida e atrativa pela ausência do uso de solvente orgânico. Entretanto, seu emprego limita-se a compostos de baixa polaridade, que apresentam uma solubilidade razoável em CO_2 (JUNG; PERRUT, 2001).

O uso do fluido supercrítico como soluto baseia-se na dissolução do fluido supercrítico em um substrato líquido, uma solução ou suspensão do substrato em um solvente, seguido pela rápida despressurização da mistura por meio de um bocal, causando a precipitação de partículas sólidas ou gotículas líquidas, dependendo do sistema. A principal técnica utilizada empregando fluido supercrítico como soluto é denominada Partículas a partir de Solução Saturada com Gás (PGSS).

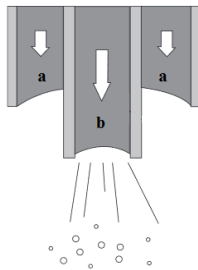
Já os métodos que fazem uso do fluido supercrítico como antissolvente fundamentam-se na redução do poder de solvatação de um solvente líquido em que o substrato esteja dissolvido, por meio de sua saturação com o fluido supercrítico, causando a precipitação do

substrato. Neste caso, é importante que o composto ativo não possua afinidade com o fluido supercrítico, ao passo que o solvente é atraído por ele, causando o efeito antissolvente. Os diferentes processos que se encaixam nesta categoria diferenciam-se basicamente por suas configurações, especialmente pela forma de contato entre a solução e o antissolvente, bem como pelo estado físico do mesmo. São eles Gás Antissolvente (GAS), Antissolvente Supercrítico (SAS), Sistema de Extração de Solvente em Aerossol (ASES) e Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS) (PRIAMO et al., 2013).

2.4 TÉCNICA DE DISPERSÃO DE SOLUÇÃO AUMENTADA POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

A técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS) é uma das técnicas supercríticas mais aprimoradas e que faz uso do fluido supercrítico como antissolvente. Nesta técnica, além da indução de separação de fases da solução orgânica, o fluido supercrítico tem a função de aumentar a dispersão da solução por meio da introdução do fluido e da solução orgânica na câmara de alta pressão por meio de bocais coaxiais, como esquematizado na Figura 3.

Figura 3 – Bocais coaxiais utilizados para introdução simultânea do (a) fluido supercrítico e (b) solução orgânica contendo o composto ativo e agente encapsulante no processo SEDS



Fonte: adaptado de Kalani e Yunus (2011).

A alta velocidade do fluido supercrítico permite a dispersão da solução em gotículas muito pequenas. O contato entre as gotículas de solução e o fluido supercrítico resulta em difusão mútua instantânea na superfície das gotículas, induzindo a separação de fases e supersaturação

do substrato, com consequente nucleação e precipitação das partículas (YEO; KIRAN, 2005).

Assim como nas demais técnicas de precipitação por antissolvente, o processo SEDS caracteriza-se por quatro diferentes estágios: geração da supersaturação, nucleação, crescimento dos cristais e coagulação.

Inicialmente, o contato entre solução orgânica e antissolvente diminui o poder de solvatação levando à supersaturação. Quando a concentração do soluto excede a concentração de equilíbrio, associada a cada mistura, o sistema torna-se supersaturado. Acima de uma determinada concentração crítica, a nucleação é induzida. Quando a adição do soluto é interrompida, sua concentração passa a decrescer, atingindo a concentração de supersaturação crítica e a barreira de energia crítica novamente. Nesta etapa, a nucleação é interrompida e os núcleos formados passam a crescer por meio de coagulação e condensação. Esta é definida como a adição de moléculas à superfície das partículas, enquanto a coagulação caracteriza-se como a adesão de duas ou mais partículas. O crescimento das partículas por meio da condensação cessa quando a concentração de soluto é reduzida abaixo da concentração de saturação de equilíbrio. A partir de então, a coagulação tende a ocorrer quando as interações atrativas entre as partículas superam as interações repulsivas (JOYE; MCCLEMENTS, 2013).

A configuração do processo, em que o fluido supercrítico atua tanto por suas propriedades químicas como por seu efeito mecânico, promovendo uma elevada dispersão da solução orgânica, permite a obtenção de partículas muito pequenas, com estreita distribuição de tamanho, tornando-se ideal para micronização e coprecipitação de compostos bioativos e polímeros.

2.5 PHBV

Entre os materiais utilizados como agentes encapsulantes na coprecipitação de compostos bioativos, os biopolímeros têm se destacado por serem biocompatíveis, atóxicos, biodegradáveis e permitirem maior controle de liberação do composto ativo. Os polihidroxicanoatos (PHAs) são exemplos desses materiais, poliésteres de ácidos hidroxialcanoicos produzidos por uma grande variedade de micro-organismos a partir de fontes de carbono renováveis (FIGUEIREDO et al., 2014).

Os PHAs são produzidos a partir de fontes renováveis por micro-organismos, especialmente bactérias do gênero alcaligenes, como reserva energética em condições de limitação de um nutriente essencial ao seu crescimento. Os materiais armazenados intracelularmente são obtidos em sua forma final após processo de *downstream* (extração, separação e purificação), sendo completamente degradados por micro-organismos à água e dióxido de carbono sob condições aeróbicas e a metano, sob condições anaeróbicas (REDDY et al., 2003).

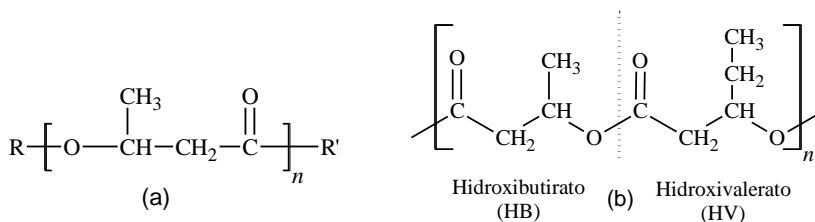
Com uma vasta possibilidade de aplicações, desde a substituição de polímeros sintéticos convencionais à engenharia de tecidos, o poli(3-hidroxiбутирато) (PHB) e seu copolímero poli(hidroxiбутирато-covalerato) (PHBV) fazem parte dos polímeros pertencentes aos PHAs com maior aplicação industrial. Tem despertado grande interesse por parte das indústrias biomédicas e de alimentos por apresentarem compatibilidade biológica, biodegradabilidade e termoprocessabilidade (SIMIONI et al., 2008).

O processo de produção do PHB consiste na fermentação, em que os micro-organismos são alimentados em reatores contendo ácido butírico ou frutose, metabolizando os açúcares disponíveis e acumulando o PHB no interior das células como reserva energética. Uma segunda etapa de extração é necessária para remoção do polímero intracelular e purificação com solventes adequados até a obtenção do produto final, sólido e seco (BRUNEL et al., 2014).

O PHB apresenta limitações quanto a sua aplicação industrial, por ser frágil e apresentar pouca resistência térmica. Entretanto, o desenvolvimento do copolímero PHBV por meio do uso de ácido propiônico juntamente com as fontes de glicose, possibilitou a obtenção de uma estrutura semicristalina de cadeia linear que apresenta a unidade hidroxibutirato (HB) em maior proporção e unidades de hidroxivalerato (HV) em menor proporção, conforme mostrado na Figura 4. Esta modificação permitiu aumentar a flexibilidade, ductibilidade, elasticidade e resistência do polímero, reduzindo seu grau de cristalinidade e possibilitando inúmeras novas aplicações (YAMADA et al., 2001).

Uma das grandes vantagens da utilização do PHB e PHBV consiste na taxa de degradação lenta, que lhes confere aplicação em sistemas de liberação controlada. A degradação do PHB e PHBV ocorre por erosão da superfície, podendo ainda ocorrer a liberação de princípios ativos com baixa massa molar por meio da penetração de água e formação de poros nas matrizes poliméricas (POUTON; AKHTAR, 1996).

Figura 4 – Estrutura química do (a) PHB e (b) copolímero PHBV



Fonte: Catoni (2011).

2.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

Espécies vegetais contendo compostos bioativos como o trans-resveratrol têm sido utilizadas há séculos na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades. Mais recentemente, tem se incentivado a pesquisa sobre estes compostos, visando melhor compreender suas propriedades e a possibilidade de utilizá-las comercialmente na prevenção e tratamento de doenças, no enriquecimento de alimentos e na substituição de compostos como antioxidantes sintéticos, por exemplo.

Apesar de conhecido desde os anos 1940, nas últimas décadas o composto polifenólico trans-resveratrol despertou o interesse da indústria farmacêutica e de alimentos quando observado que o consumo moderado de vinho tinto proporcionava uma baixa incidência de doenças cardíacas na população francesa, apesar de uma dieta rica em gorduras saturadas, fato então denominado de “paradoxo francês”. Além de presente nas uvas e seus derivados, o trans-resveratrol foi identificado em diversos outros alimentos como amoras, cranberry, amendoim e cacau (CATALGOL et al., 2012).

No entanto, o uso do trans-resveratrol em larga escala encontrou algumas limitações devido à baixa solubilidade do composto, elevado metabolismo e eliminação no organismo, bem como elevada instabilidade frente à luz UV, ar, temperaturas elevadas e enzimas oxidativas.

Buscando protegê-lo da degradação e melhorar sua solubilidade, diversos estudos tem promovido o microencapsulamento do trans-resveratrol por meio de diferentes técnicas, empregando diferentes agentes encapsulantes (DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2015; MANTEGNA et al., 2012; SESSA et al., 2014; SHI et al., 2008).

Apresentando vantagens sobre as técnicas convencionais como uso reduzido de solventes orgânicos, processamento a temperaturas moderadas com baixa degradação e elevada qualidade do produto final, a tecnologia supercrítica tem sido empregada para extração de trans-resveratrol a partir de diferentes fontes, especialmente de resíduos da indústria vinícola. Recentemente, o CO₂ supercrítico foi empregado para obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas de modo a aumentar a atividade antioxidante e de radioproteção do composto (AHMAD et al., 2016).

No entanto, não consta na literatura o emprego de tecnologia supercrítica para coprecipitação de trans-resveratrol em biopolímeros, o que se mostra promissor visto que estes agentes são atóxicos, biocompatíveis, biodegradáveis e capazes de promover a liberação controlada de compostos ativos.

Embora tenha já sido empregado para encapsulamento de trans-resveratrol por meio da técnica de simples emulsão/evaporação de solvente, o PHBV tem demonstrado boa aplicabilidade na coprecipitação de compostos bioativos por meio da técnica SEDS, como no encapsulamento de β-caroteno, astaxantina e acetato de eugenila (FRANCESCHI et al., 2008; LOSS et al., 2016; MACHADO JR et al., 2014), proporcionando a formação de partículas submicrométricas predominantemente esféricas, com estreita distribuição de tamanho, o que pode ser desejável do ponto de vista industrial

A coprecipitação de trans-resveratrol em PHBV por meio desta técnica não foi, até o momento, reportada na literatura, o que torna interessante a avaliação do processo e caracterização das partículas obtidas. Do mesmo modo, são poucos os trabalhos existentes que avaliam a fotoestabilidade das partículas produzidas por diferentes métodos e quando o fazem, não há uma descrição compreensível ou justificativa das condições experimentais utilizadas, o que impede a reprodutibilidade das análises, e corrobora a relevância deste trabalho.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção são especificados os materiais e a metodologia utilizada para a realização dos experimentos de coprecipitação de trans-resveratrol em PHBV, empregando dióxido de carbono pressurizado como antissolvente e acetona e diclorometano como solventes orgânicos. Da mesma forma, os métodos de caracterização das partículas obtidas, análises de fotoestabilidade e estudo de liberação *in vitro* são apresentados.

3.1 ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS E DO PROCESSAMENTO

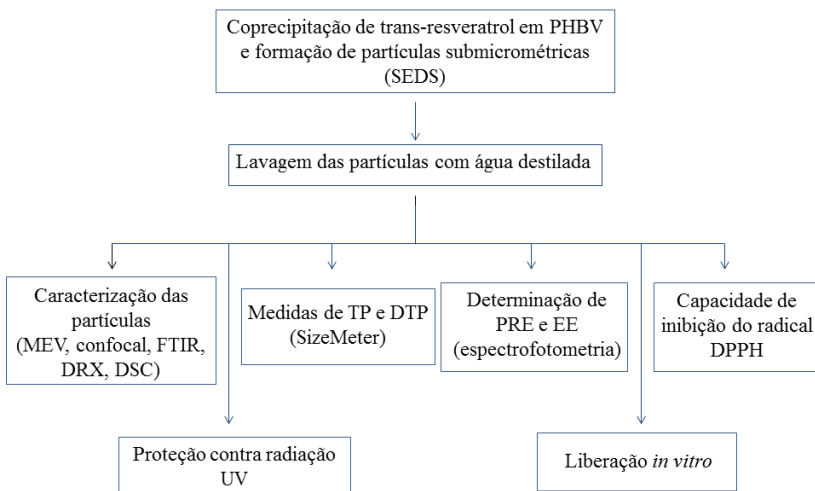
Para os experimentos de coprecipitação foram utilizados os seguintes reagentes:

- Dióxido de carbono (CO₂) (White Martins S.A., pureza de 99,9% em fase líquida);
- Diclorometano (Vetec, pureza de 99,5%);
- Acetona (Vetec, pureza de 99,5%);
- Trans-resveratrol comercial em pó, Jiaherb Phytochem, Batch: Chz20150504, China, com pureza de 99,0%, adquirido de SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA., Brasil.
- Copolímero, poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) com massa molar (M) de 196.000 e índice de poli dispersão de 1,85, gentilmente cedido pela empresa PHB Industrial S.A.

O copolímero foi previamente submetido a uma purificação, por meio de 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 (BOSCHETTO et al., 2014).

As etapas experimentais utilizadas para realização deste trabalho são apresentadas no fluxograma da Figura 5 e serão descritas na sequência.

Figura 5 – Fluxograma apresentando as etapas utilizadas para realização deste trabalho

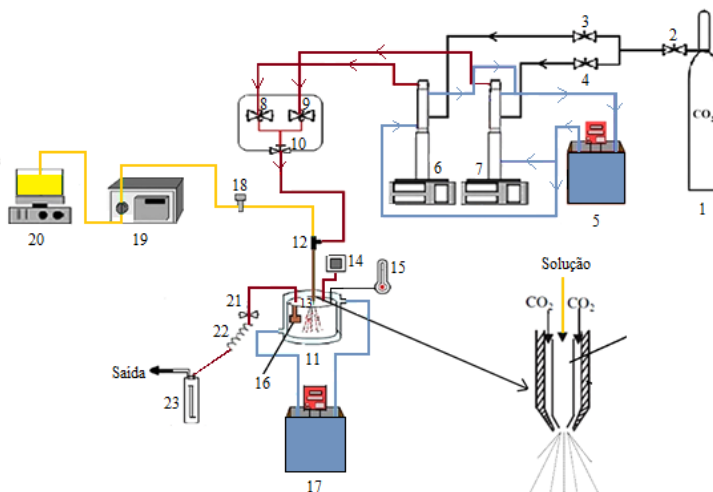


Fonte: desenvolvido pelo autor.

3.2 UNIDADE EXPERIMENTAL DE COPRECIPITAÇÃO

O aparato e procedimento experimentais para a coprecipitação de trans-resveratrol em PHBV foram baseados nos trabalhos de Franceschi et al. (2008) e Priamo et al. (2010) que estudaram o processo de precipitação e encapsulamento de β -caroteno em PHBV, Boschetto et al. (2014), Loss et al. (2016) e Machado Jr et al. (2014) que estudaram o encapsulamento em PHBV de bixina, acetato de eugenila e astaxantina, respectivamente, e Aguiar et al. (2016) que estudou o processo de micronização de trans-resveratrol empregando o método SEDS. A Figura 6 apresenta o diagrama esquemático do aparato experimental utilizado.

Figura 6 – Diagrama esquemático do aparato experimental de coprecipitação utilizado



Fonte: adaptado de Franceschi et al. (2009).

Conforme a Figura 6, o aparato experimental para ensaios de coprecipitação é constituído dos seguintes elementos:

- (1) Reservatório de dióxido de carbono (CO₂) (White Martins);
- (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 (marca Swagelok, modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);
- (5) Banho ultratermostático de recirculação (marca Nova Ética, modelo 521/2D);
- (6) e (7) Bombas de alta pressão (marca ISCO, modelo 500D, pressão de trabalho até 258 bar e vazão máxima de 170 mL·min⁻¹);
- (8) e (9) Válvulas de esfera (marca Swagelok, modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);
- (10) Válvula métrica tipo agulha (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 12 cm);

- (12) Entrada central coaxial – conexão tipo T (marca Swagelok);
- (13) Tubo capilar de sílica fundida (100 μm de diâmetro interno);
- (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 a 250 bar, marca SMAR, modelo LD 301);
- (15) Entrada periférica onde fica um sensor de temperatura (termopar) ligado a um indicador de temperatura (Universal, marca NOVUS, modelo N 1500);
- (16) Suporte constituído por dois filtros de politetrafluoretileno;
- (17) Banho ultratermostático de recirculação (marca Nova Ética, modelo 512/2D);
- (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);
- (19) Bomba de HPLC digital Série III (marca Acuflow);
- (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);
- (22) Fita de aquecimento (marca FISATON, modelo 5, 200 W de potência) que envolve a válvula (21);
- (23) Trap de segurança, recheado com algodão.

Uma vista geral da unidade experimental de coprecipitação é apresentada na Figura 7.

Figura 7 – Vista geral da unidade experimental de coprecipitação



Fonte: próprio autor.

3.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL PARA COPRECIPITAÇÃO DE TRANS-RESVERATROL EM PHBV

Como mencionado previamente, a metodologia experimental empregada para coprecipitação de trans-resveratrol em PHBV foi baseada nos trabalhos de Boschetto et al. (2013), Franceschi et al. (2008) e Priamo et al. (2010). O procedimento inicia-se com a solubilização de trans-resveratrol em acetona e do polímero (PHBV) em diclorometano, com a posterior mistura de ambos para obtenção da solução orgânica composta por 40% de acetona e 60% diclorometano (em volume), conforme metodologia de Aguiar et al. (2016).

Na sequência, procedeu-se o carregamento das bombas (6 e 7) com dióxido de carbono que estava armazenado. Duas bombas de alta pressão foram usadas para que o CO₂ permanecesse em fluxo contínuo. As válvulas de 2 a 4 foram mantidas abertas para que ocorresse o deslocamento do fluido do cilindro para a câmara de cada bomba e a temperatura da camisa foi ajustada a 5 °C com auxílio do banho de recirculação (5), para liquefazer o CO₂.

Na montagem da câmara de precipitação foram inseridos filtros de retenção para evitar o arraste do material precipitado. O filtro de politetrafluoretileno utilizado tem maior porosidade, servindo de suporte para o filtro de membrana. Em seguida, a tampa foi fechada e a vazão e pressão da solução na bomba de HPLC foram ajustadas para então fazer as conexões. Nesta etapa e na limpeza após o processo de coprecipitação utilizou-se diclorometano puro. A pressão foi ajustada por meio da back pressure (18), até 200 bar, para assim evitar que o antissolvente entrasse pela linha de solução.

Por fim, as conexões da linha de entrada de CO₂, da solução e do sensor de temperatura da linha de saída foram conectadas, sendo em seguida conectadas ao banho termostático. A válvula (10) foi então aberta para que houvesse o enchimento da câmara com CO₂.

Estando a câmara preenchida com CO₂, a válvula foi fechada e a recirculação (17) acionada. As válvulas de (2) a (4) foram fechadas, de modo a pressurizar as bombas (6) e (7) até a válvula 10 em 200 bar para, assim, manter um gradiente de pressão e evitar refluxos da câmara para as linhas, causando precipitação do composto ou polímero.

Atingindo a pressão desejada, a válvula (21) foi aberta, com a (10) ainda aberta, para ajustar o fluxo de antissolvente na câmara de precipitação. Dependendo da condição experimental, a válvula (21) poderia congelar. Para evitar esse problema, uma fita aquecedora foi envolta na mesma e a temperatura foi mantida a 200 °C.

Com a pressão e temperatura constantes, o CO₂ foi deixado fluir de modo a alcançar o estado estacionário, iniciando posteriormente a injeção da solução para dentro da câmara de precipitação. O volume de solução adicionado nos experimentos foi de 25 mL.

Após injetar o volume da solução, a bomba de HPLC foi desligada. Para a secagem das partículas precipitadas e a retirada do solvente, o fluxo de CO₂ foi mantido por 50 min. aproximadamente, a uma vazão de 20 mL/min.

Em seguida, foi iniciada a despressurização da câmara de precipitação até a pressão atmosférica, abrindo-se a válvula (21), cujo procedimento leva em torno de 40 min.

Por fim, a temperatura do experimento foi reduzida pelo banho (17) e as conexões foram desconectadas, abrindo-se a câmara cuidadosamente para a retirada do material precipitado. O material precipitado foi armazenado em frascos âmbar e posteriormente armazenado a 5 °C.

3.4 SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS UTILIZADAS

O sucesso do processo de encapsulamento de compostos ativos depende fundamentalmente de que as partículas precipitadas do material a ser encapsulado sejam menores do que as do material encapsulante (FRANCESCHI et al., 2008; PRIAMO et al., 2010). Frente a isto, a seleção das variáveis utilizadas para o processo de coprecipitação de trans-resveratrol em PHBV levou em consideração trabalhos prévios do grupo de pesquisa, especialmente o trabalho de Aguiar et al. (2016) que estudou a influência das variáveis concentração, pressão e temperatura no processo de micronização do trans-resveratrol por meio da técnica SEDS.

As variáveis de processo utilizadas foram pressão de processo (80, 115 e 150 bar) e concentração de trans-resveratrol na solução orgânica (4, 12 e 20 mg·mL⁻¹). A Tabela 1 apresenta o delineamento composto central (DCC) 2² com 3 pontos centrais utilizado para a coprecipitação do trans-resveratrol em PHBV.

Tabela 1 – Condições experimentais de coprecipitação de trans-resveratrol em PHBV com as variáveis de processo utilizadas

Ensaio	Pressão (bar)	Concentração ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	80 (-1)	4 (-1)
2	150 (1)	4 (-1)
3	80 (-1)	20 (1)
4	150 (1)	20 (1)
5	115 (0)	12 (0)
6	115 (0)	12 (0)
7	115 (0)	12 (0)

Fonte: desenvolvido pelo autor.

Os seguintes parâmetros foram mantidos fixos:

- Temperatura ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$);
- Concentração de PHBV na solução orgânica ($20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$);
- Vazão da solução orgânica ($1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$);
- Vazão de alimentação do antissolvente para a câmara de precipitação ($20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$);
 - Vazão de secagem com antissolvente ($20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$);
 - Volume de antissolvente (CO_2) para secagem (1 L);
 - Pressão de alimentação do antissolvente (200 bar);
 - Volume de solução orgânica (diclorometano + PHBV + acetona + trans-resveratrol) na câmara de precipitação (25 mL).

Optou-se por manter a temperatura fixa em $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, pois o aumento de temperatura, além de favorecer a degradação do composto ativo, levou ao aumento do tamanho médio de partícula no processo de micronização do trans-resveratrol pela técnica SEDS (AGUIAR et al., 2016), o que provavelmente diminuiria a eficiência de encapsulamento no processo de coprecipitação em polímero. Do mesmo modo, a concentração de PHBV na solução orgânica foi selecionada com base no trabalho de Boschetto et al. (2014) que observaram melhores resultados de tamanho de partícula nestas condições.

Um estudo prévio do comportamento de fases do sistema ternário CO_2 + diclorometano + acetona, apresentado no Apêndice A, indicou que a região trabalhada, acima de 80 bar de pressão e fração molar de CO_2 maior que 0,95 (para a isoterma correspondente a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$), encontra-se na região de uma única fase. Como demonstrado por Franceschi et al. (2008), a influência da presença de um sólido (composto ativo ou PHBV) em baixas concentrações no comportamento de fases do sistema

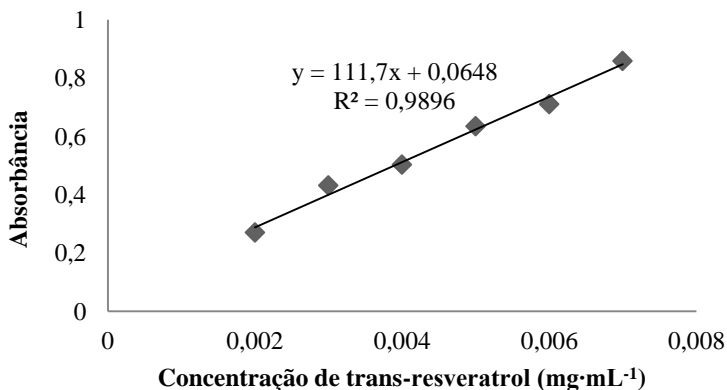
pode ser desprezível, neste caso, não sendo necessário incluí-los no estudo do comportamento de fases.

3.5 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL REAL DE ENCAPSULAMENTO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

A determinação do teor de trans-resveratrol encapsulado foi realizada por espectrofotometria na região ultravioleta visível (UV-Vis), seguindo metodologia empregada por Davidov-Pardo e McClements (2015) e Franceschi et al. (2008). O método baseia-se na suspensão de determinada massa do coprecipitado (princípio ativo e polímero) em um solvente capaz de dissolvê-los, e posterior quantificação do princípio ativo por meio de leitura no espectrofotômetro UV-Vis.

Inicialmente, construiu-se uma curva padrão (calibração) de trans-resveratrol utilizando dimetilsulfóxido como solvente. Previamente uma varredura do princípio ativo foi realizada, obtendo-se o comprimento de onda onde ocorre a maior absorção no UV-Vis. Após estipulado o valor de comprimento de onda, a curva de calibração apresentada na Figura 8 foi obtida utilizando soluções com diferentes concentrações de trans-resveratrol em dimetilsulfóxido. A curva serviu como base para os cálculos de determinação do percentual real (PRE) e da eficiência de encapsulamento (EE).

Figura 8 – Curva padrão de absorbância de trans-resveratrol em 325 nm em função de suas concentrações em dimetilsulfóxido



Fonte: desenvolvido pelo autor.

Para adequada determinação do percentual de encapsulamento foi previamente realizada a lavagem das partículas evitando que algum material não encapsulado (substância ativa livre) aderido na superfície das partículas fosse contabilizado na eficiência de encapsulamento, interferindo no resultado real. O procedimento de lavagem foi realizado com água destilada em excesso onde determinada massa de amostra ($\pm 0,1$ g) foi submetida à lavagem com aproximadamente 10 mL de água destilada em agitação manual por 30 segundos. Este solvente foi escolhido devido ao fato do trans-resveratrol apresentar uma solubilidade menor na água ($0,021$ a $0,030$ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2014) com relação a outros solventes. Assim, o uso da água promove uma retirada mais lenta de trans-resveratrol não encapsulado presente na superfície das partículas de polímero ou livre, evitando ou retardando a retirada do material encapsulado (PRIAMO et al., 2010). Após a lavagem, a solução foi 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 $0,22$ μm . O sólido retido no filtro foi seco por 24 h em temperatura ambiente e pesado para posterior análise.

Para as análises em espectrofotômetro, determinada massa de amostra de cada condição experimental, lavada e seca, foi medida ($\pm 0,01$ g) em balança analítica (AY220 Shimadzu) e adicionado 1 mL de dimetilsulfóxido, solvente utilizado devido à capacidade de solubilizar tanto o polímero como o trans-resveratrol. A solução resultante foi analisada em um espectrofotômetro de UV-Vis 800XI FEMTO na faixa de comprimento de onda de 325 nm. As análises foram realizadas no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) da Universidade Federal de Santa Catarina.

A partir dos resultados de absorvância obtidos para cada condição experimental, as concentrações destes componentes em dimetilsulfóxido foram determinadas a partir da curva de calibração. A partir dos valores de concentração determinados, sabendo-se o volume de dimetilsulfóxido utilizado no preparo de cada solução, foi possível obter a real massa de trans-resveratrol presente em cada amostra. Conhecidos estes valores e com os valores da massa de cada composto utilizada nos ensaios de coprecipitação, determinou-se o percentual real de encapsulamento (PRE) e a eficiência de encapsulamento (EE) para cada condição experimental, por meio das seguintes equações (XIE et al., 2015):

$$\text{PTE} [\%] = \frac{W_1}{W_1+W_2} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{PRE} [\%] = \frac{W_3}{W_4} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{EE} [\%] = \frac{\text{PRE}}{\text{PTE}} \times 100 \quad (3)$$

onde W1 é a massa de trans-resveratrol utilizada no experimento de coprecipitação, W2 é a massa de PHBV utilizada no experimento de coprecipitação, W3 é a massa de trans-resveratrol efetivamente encapsulado, W4 é a massa de amostra de partículas após filtração e PTE é o percentual teórico de encapsulamento, que corresponde ao percentual máximo de encapsulamento de trans-resveratrol em PHBV.

3.6 MORFOLOGIA E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA

A morfologia das partículas de trans-resveratrol coprecipitadas em PHBV foi avaliada por observação visual das micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para todas as condições experimentais de formação de partículas realizadas. As análises necessárias para a obtenção das micrografias das partículas foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM6390LV (MEV), Estados Unidos. As amostras precipitadas foram manualmente dispersas sobre fitas adesivas de carbono dupla face e dispostas em suporte metálico, recobertas com uma fina camada de ouro sob vácuo e então analisadas. A visualização foi realizada em aumentos de 1000 a 13000 vezes, com uma tensão de 10 kV.

A partir das micrografias de MEV, procedeu-se à determinação do tamanho das partículas 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) de aproximadamente 600 a 700 partículas para cada condição experimental avaliada. Além das medidas de tamanho característico, seus respectivos desvios padrão e coeficiente de variação foram calculados.

3.7 AVALIAÇÃO DAS PARTÍCULAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA

A microscopia confocal de fluorescência foi realizada de modo a detectar a presença e a forma como o trans-resveratrol foi encapsulado.

Para tanto, selecionou-se as partículas obtidas na condição experimental que resultou na melhor eficiência de encapsulamento, sendo analisada uma amostra de partículas lavadas e outra amostra das partículas sem passar pelo processo de lavagem.

As lâminas foram preparadas com uma pequena quantidade da amostra e em seguida observadas em microscópio de fluorescência LEICA DMI 6000 B com filtro UV na faixa de 405 a 660 nm, sob aumento de 20x, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC. O espectro de emissão utilizado foi de 415 a 571 nm, buscando-se o melhor ajuste para a visualização das imagens. O registro fotográfico foi obtido a partir do Scanner CONFOCAL TCS SP5 acoplado ao microscópio utilizando-se o software CONFOCAL LEICA LAS AF lite.

3.8 ANÁLISE DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SOLVENTE RESIDUAL

A identificação de solvente residual nas partículas coprecipitadas foi realizada por meio de cromatografia gasosa de acordo com Aguiar et al. (2016). As análises cromatográficas foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, utilizando cromatógrafo GC Agilent Technologies 5975C Inert MSD, acoplado a espectrometria de massas (GC-MS) em frasco *headspace*, em coluna DB624 - 30 m x 0,45 mm x 2,55 μm .

A quantificação do solvente residual foi então investigada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) utilizando as mesmas condições operacionais empregadas na GC-MS.

3.9 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH)

As partículas coprecipitadas foram avaliadas em relação à capacidade de inibição do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) de acordo com metodologia de Khan et al. (2016), com o objetivo de verificar o efeito do processo de coprecipitação sobre a capacidade antioxidante do trans-resveratrol, sendo o composto puro também analisado.

Desse modo, as reações foram conduzidas a 37 °C em etanol, solvente no qual o trans-resveratrol apresenta boa solubilidade (87,98 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (ROBINSON; MOCK; LIANG, 2015). Várias concentrações de antioxidante (princípio ativo) foram empregadas (5, 10, 15, 20, 30 e

50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) enquanto a concentração de DPPH foi fixada em 34,29 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após 30 min de reação a absorbância da solução foi medida a 517 nm. Simultaneamente, uma solução controle de DPPH foi utilizada para estimar a decomposição do radical no tempo analisado. Em função da sensibilidade dos compostos analisados à exposição luminosa, as análises foram realizadas em ambiente escuro.

O percentual de inibição do radical DPPH de cada amostra foi calculado na forma de percentual de atividade antioxidante (AA) de acordo com a equação a seguir.

$$\text{AA} [\%] = 100 - \left[\frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right] \quad (4)$$

A partir dos dados calculados, plotou-se um gráfico da atividade antioxidante em função da concentração de trans-resveratrol, cuja equação da reta foi utilizada para determinação do EC_{50} , valor definido como a mínima concentração efetiva necessária para decrescer em 50% a concentração inicial do radical DPPH.

3.10 AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO CONTRA AÇÃO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Diversos estudos tem relacionado a exposição crônica à radiação UVA e UVB com a iniciação de tumores, devido à indução excessiva da produção de espécies reativas de oxigênio (CADDEO et al., 2008). Paralelamente, a radiação UV promove a degradação do composto trans-resveratrol levando à perda de suas atividades biológicas (TRELA; WATERHOUSE, 1996).

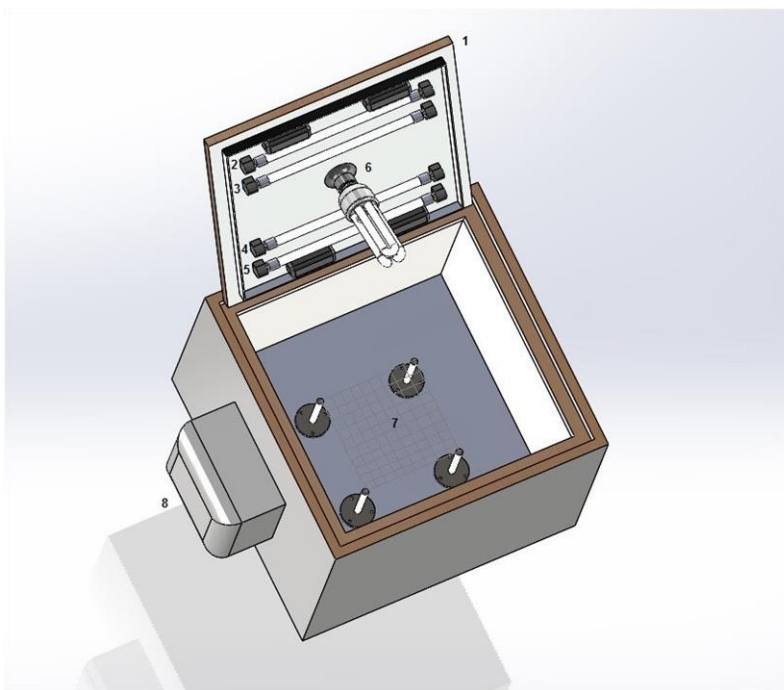
Diante disto, buscou-se avaliar o efeito protetor do polímero nas partículas de trans-resveratrol coprecipitadas em PHBV contra ação da luz ultravioleta, construindo-se um aparato experimental de modo a simular condições de radiação solar a que as partículas coprecipitadas estariam expostas.

A caixa de irradiação utilizada consta de quatro lâmpadas UVA de 8 W de potência nominal, com pico de emissão em 365 nm, e uma lâmpada com espectro de emissão em UVA e UVB com 26 W de potência nominal, com picos de emissão em 306 e 365 nm, conforme diagrama esquemático apresentado na Figura 9, de modo que cerca de 10% do espectro total é composto por radiação UVB. As dimensões do aparato são apresentadas no Apêndice B deste trabalho. As doses totais de irradiação fornecidas pelas cinco lâmpadas foram medidas por meio

de radiômetro UV-INT@EGRATOR UV-int150+, localizado a 5 cm de distância da lâmpada (6), no local de disposição da amostra, e são apresentadas no Apêndice C.

A partir dos valores de dose de radiação obtidos, calculou-se a irradiação UV a que as amostras foram submetidas, correspondendo a $11,8 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$, portanto, próxima a condições de irradiação solar natural reportadas na literatura (BAUTITZ; NOGUEIRA, 2007; VILELA et al., 2012).

Figura 9 – Esquema da caixa de irradiação utilizada para análise de fotoestabilidade das partículas. (1) Tampa superior; (2), (3), (4) e (5) lâmpadas UVA (8 W de potência nominal); (6) lâmpada UVA/UVB (26 W de potência nominal); (7) suporte para colocação da amostra; (8) acionamento da lâmpada.



Fonte: desenvolvido pelo autor.

Para as análises de fotoestabilidade, aproximadamente 20 mg de amostra previamente lavada e seca foram medidas e cuidadosamente espalhadas em uma placa de Petri, a qual foi devidamente disposta no

suporte do aparato experimental e então exposta à luz UV. Em intervalos de tempo predeterminados, uma alíquota de 2,5 mg de amostra foi retirada, solubilizada em 1 mL de dimetilsulfóxido e a concentração de trans-resveratrol remanescente na amostra determinada por espectrofotometria.

3.11 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

As medidas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier foram realizadas em AGILENT TECHNOLOGIES - Cary 600 Series FTIR Spectrometer, com o objetivo de verificar modificações na estrutura do resveratrol causadas pelo processo de coprecipitação empregando tecnologia supercrítica.

Da mesma maneira, analisou-se por esta mesma técnica uma amostra de partículas submetidas ao teste de fotoestabilidade, de modo a verificar a presença de cis-resveratrol na amostra submetida a 60 min de exposição à luz UV. A análise, realizada na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, consistiu na trituração de aproximadamente 1 mg de amostra e sua prensagem a fim de formar uma pastilha para caracterização por FTIR ao longo da faixa de comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

3.12 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE PÓ (DRX)

A difração de raios X de pó foi realizada visando avaliar a cristalinidade das partículas coprecipitadas. Os dados de difração de raios X foram obtidos em difratômetro BRUKER θ - θ D2 Phaser, equipado com fonte $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$) operado a 30 kV e 10 mA e detector de cintilação LYNXEYE. Os dados de difração foram coletados entre 5 e 50 2 θ graus com passo de 0,5 s. A análise foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC.

3.13 ANÁLISE DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

A análise do perfil calorimétrico das partículas coprecipitadas foi realizada em calorímetro diferencial de varredura PERKIN ELMER – Jade-DSC equipado com um Sistema Intracooler 2P. As amostras foram analisadas sob atmosfera de nitrogênio em uma faixa de temperatura de 30 a 300 °C, com velocidade de aquecimento de 30 °C·min⁻¹.

Esta análise busca estimar modificações na composição da amostra, em seu grau de cristalinidade e temperatura de fusão, que eventualmente possam ter sido causados pelo processo de coprecipitação.

3.14 ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO TRANS-RESVERATROL

Os ensaios de liberação *in vitro* de trans-resveratrol coprecipitado em PHBV foram baseados nos trabalhos de Loss et al. (2016), Mendes et al. (2012) e Priamo et al. (2011). As partículas selecionadas para este experimento foram aquelas que apresentaram a maior e a menor eficiência de encapsulamento, sendo individualmente avaliadas em dois meios de liberação diferentes.

O primeiro meio de liberação consistiu em solução tampão fosfato (PBS) pH 6,8, escolhido pela proximidade do pH fisiológico. O segundo meio utilizado foi uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M, em referência às condições do sistema gástrico (DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010).

As amostras previamente lavadas e secas ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram colocadas em contato com o meio de liberação (PBS e HCl 0,1 M separadamente) em erlenmeyers de 125 mL, os quais tiveram sua abertura protegida com filme plástico para minimizar as perdas por evaporação do meio, contendo pequenas perfurações para evitar o aumento da pressão interna no recipiente. Foram então incubados em *shaker* com agitação orbital MARCONI MA410 CFT a $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e agitação de 100 rpm. Em tempos específicos foram retiradas alíquotas de 1 mL e a mesma quantidade de meio puro imediatamente reposta ao sistema de maneira a manter o volume constante. As amostras foram filtradas em filtro membrana de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (VertiClean™ PTFE) e em seguida analisadas em espectrofotômetro para leitura da absorbância a 325 nm para determinação da concentração de trans-resveratrol no meio de liberação em função do tempo.

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os efeitos das variáveis do processo de coprecipitação sobre a eficiência e percentual real de encapsulamento, bem como sobre o tamanho médio de partícula, foram avaliados estatisticamente por meio do software Statistica para Windows 7.0 (Statsoft Inc, EUA).

Com o objetivo de determinar diferenças significativas entre os diferentes experimentos na determinação da capacidade de inibição do radical DPPH, os resultados de EC_{50} foram avaliados por análise unidirecional de variância ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos referentes à caracterização das partículas de trans-resveratrol coprecipitadas em PHBV, análise de sua atividade antioxidante, estudo do efeito protetor do polímero contra ação da luz UV e comportamento de liberação *in vitro* são apresentados e discutidos a seguir.

4.1 PERCENTUAL REAL DE ENCAPSULAMENTO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

Os dados obtidos experimentalmente de percentual real de encapsulamento e eficiência de encapsulamento para as diferentes concentrações de trans-resveratrol e pressão avaliadas são apresentados na Tabela 2. Em todas as condições experimentais, a temperatura foi mantida em 35 °C, a concentração de PHBV na solução orgânica foi de 20 mg·mL⁻¹, vazão de solução orgânica de 1 mL·min⁻¹ e vazão de antissolvente de 20 mL·min⁻¹ (a 200 bar e 5 °C), definidos de acordo com a seção 3.4.

Tabela 2 - Resultados do percentual real de encapsulamento e eficiência de encapsulamento do trans-resveratrol encapsulado em PHBV

Experimento	Concentração (mg·mL ⁻¹)	Pressão (bar)	PRE (%)	EE (%)
1	4 (-1)	80 (-1)	13,25±0,33	78,77±1,96
2	4 (-1)	150 (1)	14,32±0,16	83,13±0,90
3	20 (1)	80 (-1)	49,71±0,50	99,54±0,99
4	20 (1)	150 (1)	28,35±0,17	56,81±0,35
5	12 (0)	115 (0)	24,54±0,10	65,49±0,26
6	12 (0)	115 (0)	21,65±0,00	58,29±0,00
7	12 (0)	115 (0)	24,01±0,04	64,62±0,10

Fonte: desenvolvido pelo autor.

Por meio da Tabela 2, percebe-se que o experimento 3 resultou no maior percentual real de encapsulamento (49,71%) e eficiência de encapsulamento (99,54%), para o qual adotou-se a menor pressão (80 bar) e a maior concentração de trans-resveratrol (20 mg·mL⁻¹). Já o menor percentual real de encapsulamento foi obtido no experimento 1 (13,25%), onde empregou-se a mesma pressão que o ensaio 3 e a menor concentração de trans-resveratrol, embora esta condição experimental

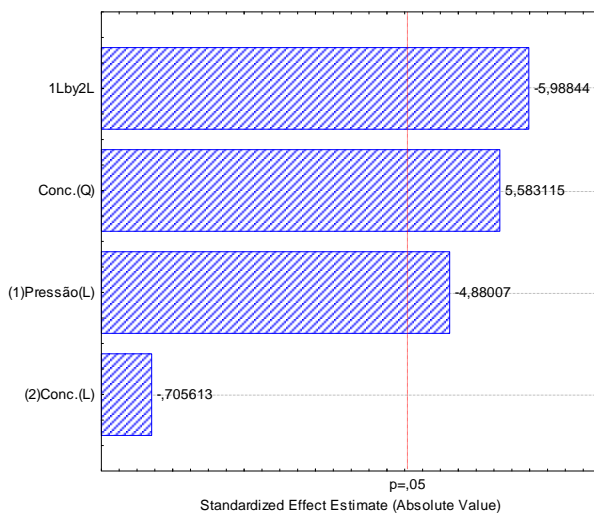
tenha resultado em uma eficiência elevada (78,77%); a menor eficiência foi resultante do experimento 4 (56,81%) em que tanto pressão quanto concentração de trans-resveratrol empregadas foram máximas.

As maiores eficiências obtidas, resultantes dos experimentos 1, 2 e 3, encontram-se próximas daquelas encontradas por Mendes et al. (2012) para microencapsulamento de resveratrol em PHBV por simples emulsão/evaporação de solvente, que obteve eficiências superiores a 80%. Embora o referido método tenha resultado em eficiências superiores, as partículas obtidas apresentaram diâmetro médio entre 25,23 e 55,73 μm e estrutura altamente porosa, característica do polímero, que resulta em uma liberação rápida do composto ativo. As eficiências de encapsulamento obtidas neste trabalho mostraram-se superiores às obtidas por Priamo et al. (2010) que alcançou o valor de 55,54% no encapsulamento de β -caroteno em PHBV pela técnica SEDS, que também observou a maior eficiência de encapsulamento quando da utilização da maior concentração de composto ativo na solução orgânica.

A análise estatística dos resultados mostrou que a pressão apresentou um efeito significativo negativo sobre a eficiência de encapsulamento, a um nível de confiança de 95%, como pode ser observado no diagrama de Pareto apresentado na Figura 10.

Desse modo, uma diminuição na pressão resulta no aumento da eficiência de encapsulamento, o que pode ser verificado comparando-se os experimentos 3 (80 bar e $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 4 (150 bar e $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), em que a eficiência diminuiu de 99,54 para 56,81%. O mesmo efeito é observado analisando-se a interação entre as duas variáveis. Com o aumento da pressão, a solubilidade do trans-resveratrol em CO_2 é aumentada, o que favorece o arraste do composto ativo para fora da câmara de precipitação e, conseqüentemente, reduz a eficiência de encapsulamento. Assim, quanto maior a pressão do sistema e a concentração de trans-resveratrol, maior será o arraste do soluto e menor a eficiência do processo.

Figura 10 - Diagrama de Pareto apresentando os efeitos do processo de coprecipitação sobre a eficiência de encapsulamento



Fonte: desenvolvido pelo autor.

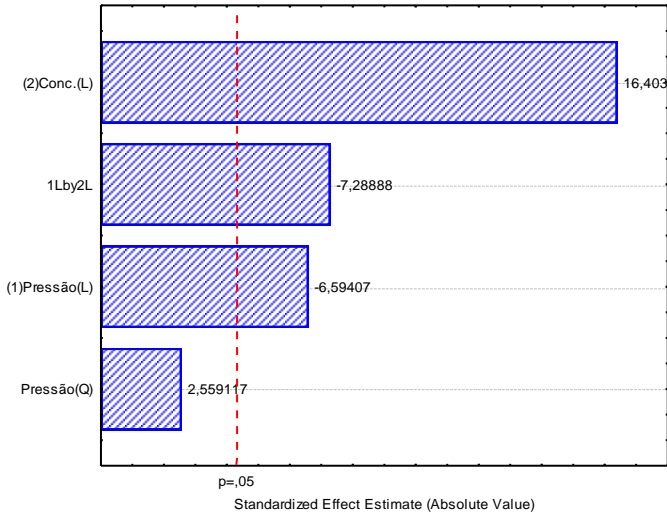
Da mesma forma que para a eficiência de encapsulamento, a pressão e a interação entre pressão e concentração de trans-resveratrol apresentaram efeito significativo negativo sobre o percentual real de encapsulamento, como pode ser verificado no diagrama de Pareto apresentado na Figura 11, em razão dos motivos previamente expostos.

Entretanto, o efeito da concentração se mostrou significativo, o que pode ser verificado comparando-se os percentuais reais de encapsulamento obtidos nos experimentos 3 e 4, que empregaram as maiores concentrações de trans-resveratrol na solução orgânica ($20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), com os pontos centrais ($12 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e estes com os experimentos 1 e 2, os quais empregaram as menores concentrações ($4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

O efeito positivo da concentração pode ser explicado devido à maior massa de trans-resveratrol disponível para ser encapsulada. Em maiores concentrações de princípio ativo na solução orgânica, a precipitação deste ocorre simultaneamente à do polímero, favorecendo o encapsulamento. De outro modo, quando a concentração do princípio ativo é menor, a cinética de precipitação é mais lenta, sendo obtidas mais partículas de polímero do que do composto ativo e resultando na

sua precipitação na superfície das partículas de PHBV (BOSCHETTO et al., 2014; FRANCESCHI et al., 2008).

Figura 11 – Diagrama de Pareto apresentando os efeitos do processo de coprecipitação sobre o percentual real de encapsulamento



Fonte: desenvolvido pelo autor.

A avaliação estatística do percentual real de encapsulamento resultou em um modelo empírico codificado para o processo de coprecipitação de trans-resveratrol em PHBV, construído a partir dos coeficientes de regressão das variáveis significativas. Para que uma regressão seja, além de significativa estatisticamente, preditiva, o valor de $F_{\text{calculado}}$ deve ser de 4 a 5 vezes superior ao valor de F_{tabelado} obtido na tabela de distribuição de Fisher (BOX; WETZ, 1973). O modelo foi validado pela análise de variância, apresentada na Tabela 3, com coeficiente de correlação de 0,99, e teste de Fisher, sendo o $F_{\text{calculado}}$ 4,8 vezes superior ao F_{tabelado} .

Tabela 3 – Análise de variância para o percentual real de encapsulamento de trans-resveratrol em PHBV

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F_{calculado}	F_{tabelado}
Regressão	881,6285	4	220,407125	93,05571974	19,25
Erro	4,7371	2	2,36855		r²=0,99466
Total	886,3656	6			

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

Fonte: desenvolvido pelo autor.

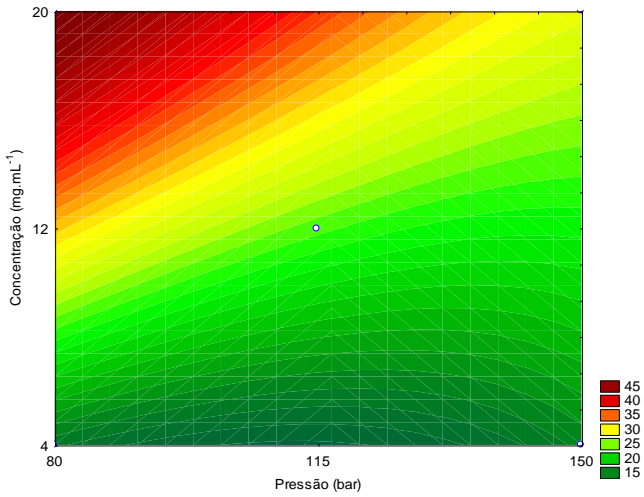
A Equação 4 apresenta o modelo que pode ser utilizado para predição dos valores de percentual real de encapsulamento em função das variáveis codificadas pressão (P) e concentração de trans-resveratrol na solução orgânica (C).

$$\text{PRE} = (12,62233 \times C) - (5,07416 \times P) - (5,60882 \times C \times P) + 23,3996 \quad (4)$$

A validação do modelo permitiu a construção da curva de contorno de pressão *vs.* concentração de trans-resveratrol apresentada na Figura 12, que permite uma melhor visualização das regiões de maior percentual real de encapsulamento. Verifica-se que os maiores percentuais reais de encapsulamento são obtidos no maior nível da variável concentração (20 mg·mL⁻¹) e no menor nível de pressão (80 bar).

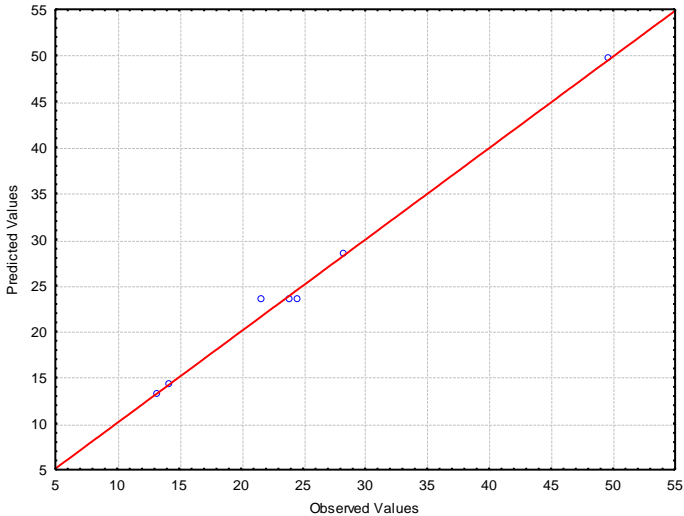
O ajuste do modelo pode também ser verificado por meio do gráfico de valores observados *vs.* valores preditos, apresentado na Figura 13, em que a distribuição dos pontos (valores observados) encontra-se, de forma geral, próxima à reta (valores preditos).

Figura 12 – Curva de contorno para o percentual real de encapsulamento em função da pressão e concentração de trans-resveratrol



Fonte: desenvolvido pelo autor.

Figura 13 – Gráfico de valores observados vs. valores preditos



Fonte: desenvolvido pelo autor.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS COPRECIPITADAS

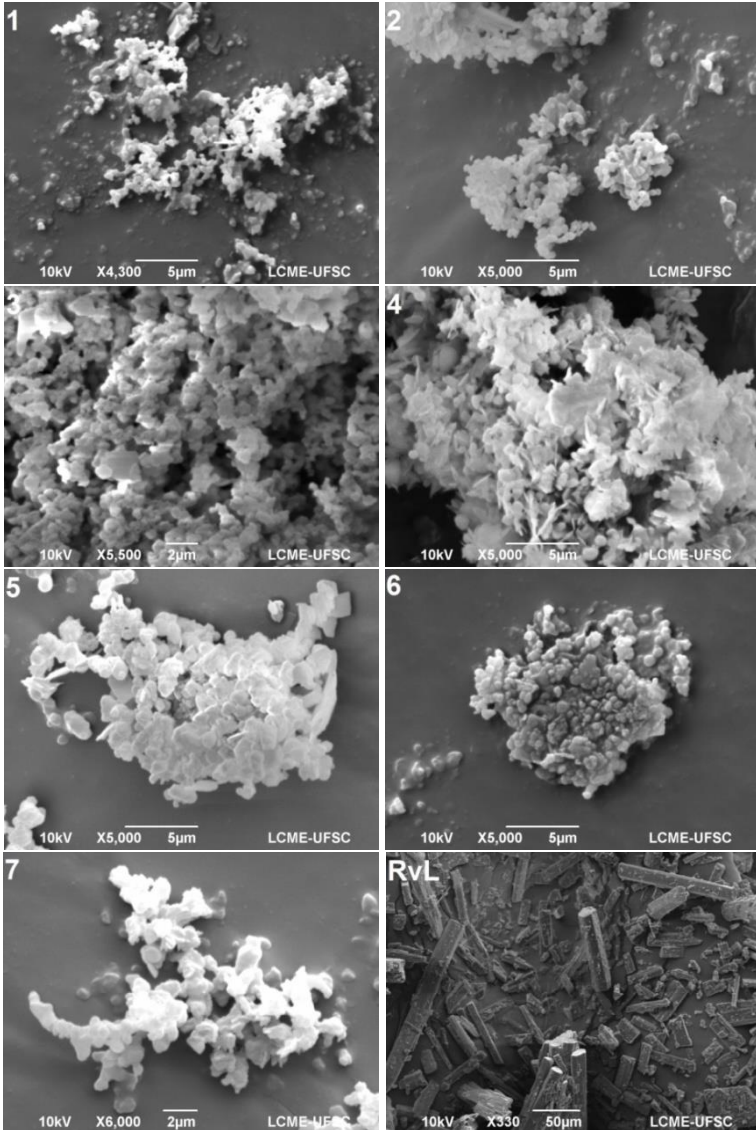
A análise morfológica das partículas de trans-resveratrol coprecipitadas em PHBV foi realizada por meio de MEV, conforme descrito no item 3.6. A Figura 14 apresenta a morfologia das partículas obtidas em todas as condições experimentais avaliadas, bem como do trans-resveratrol puro.

Por meio da Figura 14 pode-se perceber que todas as condições experimentais estudadas resultaram em partículas com morfologia predominantemente esférica, com pequenas conexões entre elas. Estruturas semelhantes foram observadas por Priamo et al. (2011) no encapsulamento de β -caroteno e Loss et al. (2016), encapsulando acetato de eugenila, ambos empregando o mesmo polímero e a mesma técnica utilizada neste trabalho.

De outro modo, o trans-resveratrol puro apresenta estrutura altamente irregular. A presença de algumas estruturas irregulares é também notada nas micrografias das partículas obtidas nos experimentos 4 e 6, que resultaram nas menores eficiências de encapsulamento e referem-se ao trans-resveratrol não encapsulado.

Após análise das micrografias foi realizada a medida do tamanho das partículas, o qual foi medido por meio do maior tamanho característico, ou seja, do comprimento ou espessura que se apresentaram como maior característica. Nesta etapa, foram contabilizadas aproximadamente 600 a 700 partículas em cada condição experimental estudada. As medidas são apresentadas na Tabela 4, dispostas como tamanho mínimo (X_{\min}), tamanho máximo (X_{\max}), tamanho médio (\bar{X}), seu respectivo desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV).

Figura 14 - Micrografias das partículas de trans-resveratrol em PHBV nos experimentos 1 a 7 e do trans-resveratrol puro (RvL). Condições experimentais: 1: 80 bar, 4 mg·mL⁻¹; 2: 150 bar, 4 mg·mL⁻¹; 3: 80 bar, 20 mg·mL⁻¹; 4: 150 bar, 20 mg·mL⁻¹; 5, 6 e 7 (pontos centrais): 115 bar, 12 mg·mL⁻¹ de trans-resveratrol.



Fonte: próprio autor.

Tabela 4 – Medidas de tamanho mínimo (X_{\min}), tamanho máximo (X_{\max}), tamanho médio (\bar{X}), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) das partículas de trans-resveratrol coprecipitadas em PHBV

Experimento	Pressão (bar)	Concentração ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	X_{\min} (μm)	X_{\max} (μm)	$\bar{X} \pm \sigma$ (μm)	CV
1	80 (-1)	4 (-1)	0,08	1,35	$0,47 \pm 0,16$	0,35
2	150 (1)	4 (-1)	0,11	0,77	$0,39 \pm 0,12$	0,30
3	80 (-1)	20 (1)	0,12	1,18	$0,44 \pm 0,16$	0,36
4	150 (1)	20 (1)	0,18	1,36	$0,54 \pm 0,17$	0,31
5	115 (0)	12 (0)	0,17	1,44	$0,56 \pm 0,20$	0,36
6	115 (0)	12 (0)	0,12	1,62	$0,51 \pm 0,17$	0,32
7	115 (0)	12 (0)	0,17	1,48	$0,57 \pm 0,20$	0,35
Padrão	-	-	0,41	193,29	$33,04 \pm 21$	0,63

Fonte: desenvolvido pelo autor.

As partículas coprecipitadas apresentaram tamanhos médios entre 390 e 570 nm, sendo, portanto, caracterizadas como submicrométricas (SANTOS et al., 2012). Partículas submicrométricas tendem a permear passivamente a vasculatura característica de tumores sólidos, uma vez que os vasos sanguíneos em tecidos tumorais apresentam aberturas no tamanho de 400 a 800 nm, e a se acumularem por meio da permeabilidade aumentada e do efeito de retenção. O fluxo do composto ativo para dentro da célula é promovido pelo gradiente de concentração próximo à membrana celular, bem como pelo processo de endocitose (HOBBS et al., 1998).

A análise estatística do tamanho médio de partícula mostrou que as variáveis de processo, pressão e concentração de trans-resveratrol, não apresentaram efeito significativo sobre o resultado. Por meio da Tabela 4 pode-se verificar que os menores tamanhos médios de partícula foram obtidos nas condições experimentais que apresentaram as maiores eficiências de encapsulamento, experimentos 1, 2 e 3.

A condição experimental 2, que resultou no menor tamanho médio de partícula, foi também a que apresentou uma distribuição de tamanho mais estreita, observada pelo valor do desvio padrão e do coeficiente de variação, o qual foi igual a 30% em torno do tamanho médio de partícula. Esta condição experimental empregou a maior pressão, o que pode ter levado ao aumento da dispersão da solução no antissolvente, aumentando a transferência de massa e, assim, resultando em menor tamanho de partícula (CHEN et al., 2007). Porém, este comportamento não se repete para os experimentos 3 e 4, em que o

aumento de 80 para 150 bar resultou no aumento do tamanho de partícula. O mesmo foi observado por Loss et al. (2016) no encapsulamento de acetato de eugenila em PHBV, afirmando que a solubilidade do soluto na mistura aumentada pela elevação da pressão, reduz a supersaturação e nucleação, resultando no crescimento das partículas.

O experimento 3 (80 bar e 20 mg·mL⁻¹), que resultou em eficiência de 99,54%, apresentou uma redução de aproximadamente 75 vezes em relação ao tamanho médio das partículas de trans-resveratrol puro. Embora o experimento 2 (150 bar e 4 mg·mL⁻¹) tenha resultado no menor tamanho médio, 390 nm, o emprego de pressões menores pode ser mais interessante por permitir menor degradação do produto e ainda implicar menores custos de investimento e operacionais (AGUIAR et al., 2016). Os valores de tamanho médio obtidos neste trabalho mostraram-se próximos aos obtidos por Franceschi et al. (2008) para o PHBV precipitado pela técnica SEDS, que variaram entre 278 e 570 nm, e por Sanna et al. (2012) para nanopartículas de resveratrol encapsuladas em quitosana catiônica e alginato aniônico cobertas com poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo e produzidas pelo método de emulsão/evaporação do solvente, com valores entre 420,82 e 552,56 nm.

Os ensaios de coprecipitação resultaram em coeficientes de variação entre 30 e 36% em torno do tamanho médio de partícula, indicando uma distribuição de partícula similar em todos os experimentos.

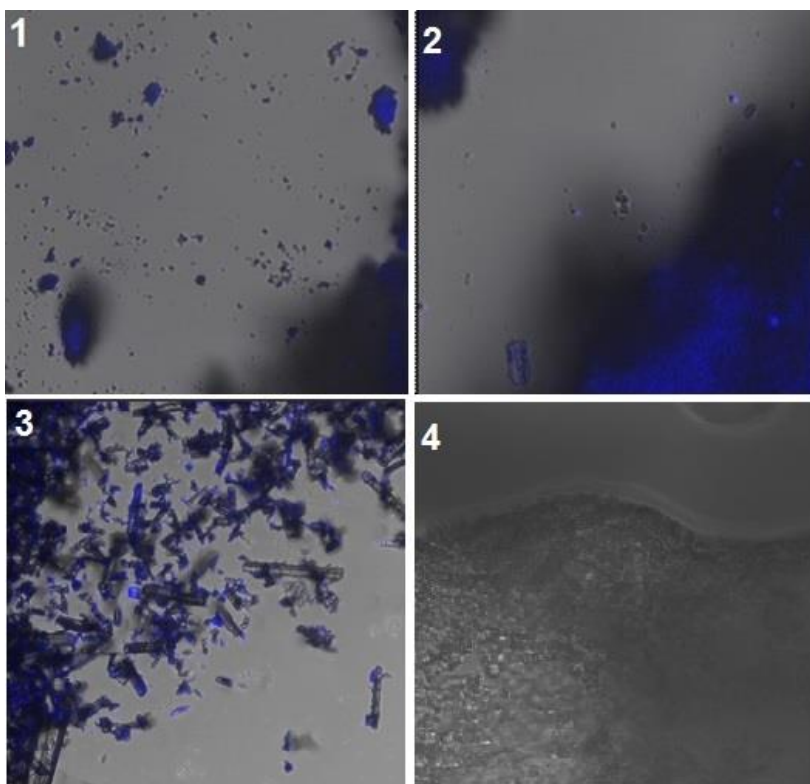
4.3 MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA

A microscopia confocal de fluorescência foi utilizada para detectar a presença de trans-resveratrol, bem como avaliar a forma como ele encontra-se nas partículas coprecipitadas. As imagens obtidas são apresentadas na Figura 15, com sobreposição dos campos claro e escuro, que mostram as partículas obtidas no experimento 3 (escolhido em razão da maior eficiência de encapsulamento) previamente lavadas e não lavadas, o trans-resveratrol e PHBV puros.

Uma vez que o PHBV não possui fluorescência, as regiões fluorescentes visíveis após a etapa de lavagem indicam a presença do composto ativo encapsulado e, ainda, adsorvido na superfície do polímero. Como a lavagem das partículas é realizada com água, solvente em que o trans-resveratrol apresenta baixa solubilidade (ROBINSON; MOCK; LIANG, 2015), esta etapa não é capaz de remover o composto adsorvido superficialmente. Entretanto, a utilização de um solvente em

que o composto apresente maior solubilidade (como etanol, por exemplo) pode acarretar na retirada e arraste do composto ativo efetivamente encapsulado, o que não é desejável. Ainda, a ausência de partículas altamente irregulares na Figura 15-1 comprova a eficiência da etapa de lavagem na retirada do composto ativo livre, o qual é facilmente visualizado na Figura 15-2, em que esta etapa não foi realizada.

Figura 15 – Microscopia confocal de fluorescência das partículas obtidas no experimento 3 previamente lavadas (1), não lavadas (2), trans-resveratrol puro (3) e PHBV puro micronizado (4)



Fonte: próprio autor.

4.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SOLVENTE RESIDUAL

A análise de solvente residual realizada por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e cromatografia gasosa com detector de ionização de chama mostrou que as partículas coprecipitadas encontram-se livres de solvente orgânico.

Deste modo, os resultados encontrados estão de acordo com as normas vigentes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, Farmacopeia da República Popular da China, Farmacopeia Europeia e Conferência Internacional em Harmonização (ICH), documento Q3C(R5) de 2011, que estabelecem a concentração máxima de diclorometano para consumo humano de 600 ppm, bem como da Farmacopeia dos Estados Unidos cujo limite é de 400 ppm. Da mesma forma, a ausência de acetona, classificada pela ICH como solvente classe 3 – baixa toxicidade e baixo risco à saúde humana, com concentração máxima aceitável igual a 5000 ppm (AGUIAR et al., 2016; ELVASSORE; BERTUCCO; CALICETI, 2001), indica que as partículas coprecipitadas são seguras para a saúde humana.

4.5 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH

A capacidade de inibição do radical DPPH foi analisada com o objetivo de verificar o efeito do processo de coprecipitação utilizando a técnica SEDS sobre a atividade antioxidante do trans-resveratrol. A análise foi realizada em triplicata ($n = 3$) e os valores de atividade antioxidante são expressos por meio do EC_{50} , que indica a concentração mínima necessária para decrescer 50% da concentração inicial do radical livre DPPH, assim, quanto menor este valor, maior a atividade antioxidante de uma amostra. A Tabela 5 apresenta os valores de EC_{50} encontrados para as partículas obtidas em todas as condições experimentais, assim como para o trans-resveratrol puro.

Com exceção do experimento 3, todas as condições experimentais avaliadas apresentaram atividades antioxidantes superiores à do trans-resveratrol puro. Este efeito pode ser atribuído à redução do tamanho e modificação da morfologia das partículas, o que aumentou a área superficial efetiva exposta ao meio reacional. Embora as partículas obtidas no experimento 3 tenham apresentado modificações similares, sua atividade antioxidante foi menor que das outras partículas e estatisticamente igual à do trans-resveratrol puro. Este resultado pode

ser atribuído à ocorrência de aglomeração das partículas e, conseqüentemente, redução da área superficial efetiva, ou ainda, a diferenças na estrutura cristalina das partículas obtidas em diferentes condições experimentais.

Tabela 5 – Valores de EC₅₀ obtidos para o trans-resveratrol puro e para as partículas coprecipitadas

Experimento	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)
1	22,27±0,28 ^b
2	10,72±0,60 ^d
3	29,96±0,43 ^a
4	14,64±1,43 ^c
5	14,16±1,38 ^c
6	14,99±0,20 ^c
7	15,42±0,61 ^c
Trans-resveratrol puro	27,57±1,06 ^a

*Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$), ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

Os resultados encontrados indicam que não houve perda da propriedade antioxidante durante o processo de coprecipitação. O mesmo comportamento foi observado por Santos et al. (2013) no encapsulamento de extrato de antocianina a partir de casca de jabuticaba em polietilenoglicol pela técnica de Expansão Rápida da Solução Supercrítica (RESS), afirmando que os processos de formação de partículas utilizando CO₂ supercrítico permitem a manutenção da atividade antioxidante do composto ou classe de compostos de interesse após o processamento.

A capacidade antioxidante do PHBV também foi avaliada, sendo que o polímero não se mostrou capaz de reduzir a absorção do DPPH (dado não mostrado). Assim, a atividade antioxidante das partículas coprecipitadas pode ser completamente atribuída ao trans-resveratrol presente nas mesmas.

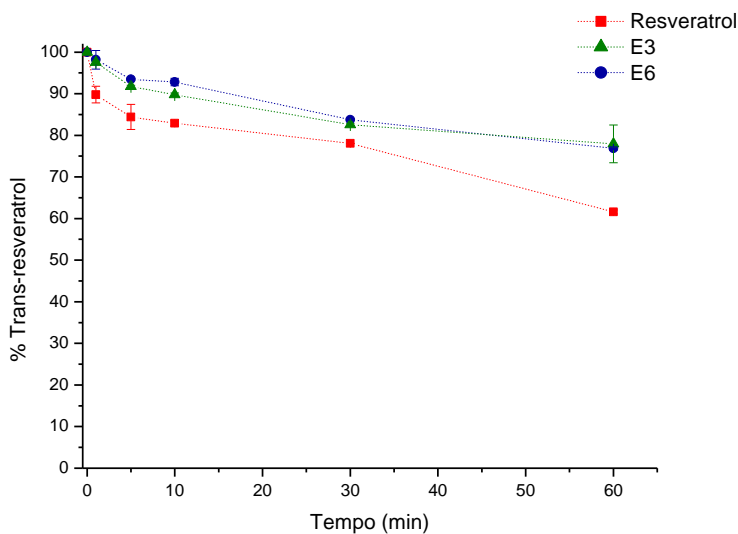
4.6 PROTEÇÃO CONTRA AÇÃO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Diversos estudos tem demonstrado a susceptibilidade do trans-resveratrol frente à exposição luminosa, embora diferentes graus de

degradação sejam obtidos de acordo com o espectro de luz específico atingindo a amostra (FIGUEIRAS; NEVES-PETERSEN; PETERSEN, 2011; TRELA; WATERHOUSE, 1996). Ao analisarem a degradação fotoquímica e fotocatalítica do trans-resveratrol, Silva et al. (2013) perceberam que o principal intermediário da degradação fotoquímica do trans-resveratrol é seu isômero geométrico cis-resveratrol, identificado por seu espectro de absorção no UV-Vis com uma absorção máxima em 286 nm.

A Figura 16 apresenta a curva cinética de degradação do trans-resveratrol puro e do composto coprecipitado em PHBV, diretamente expostos à irradiação UV igual a $11,8 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$. Durante as análises, a temperatura das amostras foi medida e não excedeu $38 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo assim insuficiente para promover a degradação do composto ativo e afetar os resultados.

Figura 16 – Cinética de degradação do trans-resveratrol frente a exposição à luz UVA/UVB. Resveratrol: refere-se ao composto puro, E3: partículas coprecipitadas na condição experimental 3 e E6: partículas obtidas na condição 6. Dados são expressos como média \pm desvio padrão.



Fonte: desenvolvido pelo autor.

Por meio da Figura 16 pode-se notar que tanto o trans-resveratrol puro como o coprecipitado apresentaram um perfil de degradação semelhante, embora seja claro o efeito protetor do polímero. Após 60 minutos de exposição, quase 40% do resveratrol puro havia sido convertido para a forma isomérica cis, enquanto aproximadamente 20% do composto presente nas partículas coprecipitadas havia sido degradado. As partículas obtidas na condição experimental 3, que apresentaram a maior eficiência de encapsulamento, bem como as da condição 6 (ponto central) apresentaram um grau de degradação muito próximo, embora estas últimas possuam uma concentração de polímero duas vezes maior que as primeiras, o que poderia fornecer diferentes graus de proteção.

A degradação do trans-resveratrol presente nas partículas coprecipitadas pode ser atribuída ao fato de o composto ativo não estar completamente envolvido pelo PHBV no núcleo das partículas, mas disperso na matriz polimérica e ainda adsorvido externamente nas partículas, como pode ser observado na microscopia confocal da Figura 15.1, o que leva a uma maior exposição do composto ativo. Ainda assim, em todos os intervalos de tempo analisados, as partículas coprecipitadas apresentaram maior estabilidade em relação ao resveratrol puro, indicando que o efeito da radiação UV sobre o resveratrol pode ser inibido, até certo ponto, pelo processo de coprecipitação em PHBV. Resultados similares foram observados por Shi et al. (2008) no encapsulamento de resveratrol em células de levedura.

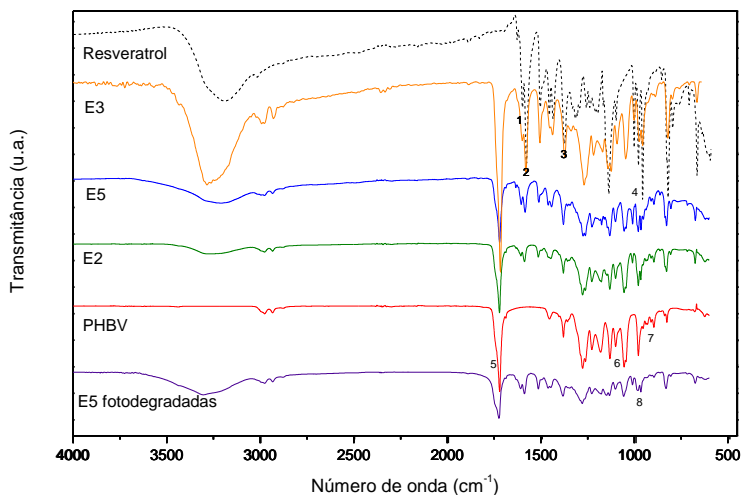
Os resultados apresentados sugerem a possibilidade de aplicação industrial das partículas formadas em produtos como loções faciais e corporais, bem como em protetores solares, por exemplo, em que o trans-resveratrol possa atuar estendendo sua atividade antioxidante por um maior período de tempo, prevenindo danos às células da pele causados pela radiação UV, que possam levar a câncer e envelhecimento precoce.

4.7 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

As partículas de trans-resveratrol coprecipitadas em PHBV foram avaliadas por FTIR para verificar possíveis alterações em sua estrutura causadas pelo processo supercrítico e comparadas com o trans-resveratrol e PHBV puros. Os resultados são apresentados na Figura 17, em que o espectro do trans-resveratrol puro apresentou três bandas

intensas em 1605, 1584 e 1381 cm^{-1} (números 1, 2 e 3 da Figura 17), as quais correspondem ao alongamento da dupla ligação C=C aromático, alongamento da ligação C=C olefínica e alongamento da ligação C=O, respectivamente. Em 964,5 cm^{-1} (número 4 da Figura 17) observou-se a banda típica característica do isômero trans-resveratrol (AGARWAL; KHARB; SAHARAN, 2014; BERTACCHE et al., 2006).

Figura 17 – Espectros no infravermelho com transformada de Fourier do trans-resveratrol e PHBV puros, das partículas coprecipitadas obtidas nos experimentos 2 (E2), 3 (E3), 5 (E5) e no experimento 5 após 60 min de exposição à luz UVA/UVB (E5 fotodegradadas). 1: alongamento da dupla C=C aromático; 2: alongamento da ligação C=C olefínica; 3: alongamento C=O; 4: banda olefínica trans; 5: alongamento C=O; 6: intervalo de vibração do alongamento -C-O-C- antissimétrico e 7: -C-O-C- simétrico; 8: dissipação da banda trans típica.



Fonte: desenvolvido pelo autor.

Para o PHBV observou-se uma banda intensa em 1720 cm^{-1} devido ao alongamento da ligação C=O, além de bandas típicas nos intervalos entre 1055 e 1131 cm^{-1} correspondentes à vibração do alongamento antissimétrico -C-O-C- e entre 826,5 e 979 cm^{-1} correspondentes ao -C-O-C- simétrico, representadas pelos número 5,

6 e 7 da Figura 17, respectivamente (FARAGO et al., 2008; YU et al., 2014).

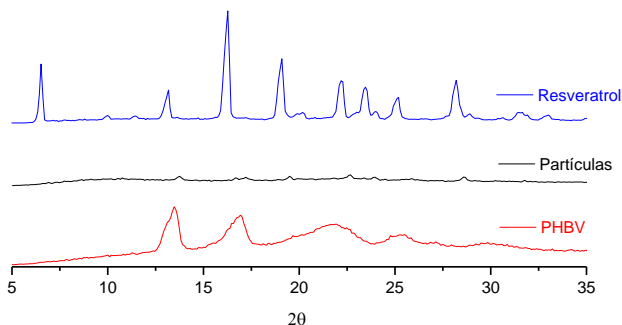
Os espectros das partículas coprecipitadas apresentaram bandas correspondentes aos mesmos números de onda apresentados nos espectros do PHBV e do trans-resveratrol, o que significa que não houve formação de ligação química entre o composto ativo e o polímero. Este resultado indica ainda que o composto trans-resveratrol não sofreu degradação durante o processo de coprecipitação.

Por outro lado, o espectro de FTIR das partículas coprecipitadas na condição experimental 5, após 60 minutos de exposição direta à luz UVA/UVB, apresentou a dissipação da banda em $964,5\text{ cm}^{-1}$ (número 8 da Figura 17), característica do isômero trans, o que caracteriza a geração do cis-resveratrol e confirma os resultados obtidos por espectrofotometria da análise de fotoestabilidade das partículas.

4.8 DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE PÓ (DRX)

As partículas coprecipitadas, o trans-resveratrol puro e PHBV puro foram caracterizados por meio da difração de raios X de pó (DRX) de modo a avaliar modificações na estrutura cristalina dos compostos, sendo os resultados apresentados na Figura 18.

Figura 18 – Difração de raios X de pó do trans-resveratrol puro (Resveratrol), PHBV puro (PHBV) e das partículas obtidas na condição experimental 3 (Partículas).



Fonte: desenvolvido pelo autor.

O trans-resveratrol puro apresentou picos característicos relacionados a uma estrutura cristalina em 2θ igual a 6,55; 16,29; 19,11; 22,21; 23,48 e 28,22. Já no padrão de DRX das partículas coprecipitadas estes picos praticamente desapareceram, o que sugere que o processo de coprecipitação proporcionou uma redução significativa dos picos de difração cristalinos do resveratrol, resultando em um composto mais amorfo. De acordo com Joye e McClements (2013) e Perrut, Jung e Leboeuf (2005) a cristalização do composto ativo em processos de encapsulamento empregando antissolvente é muitas vezes inibida pela matriz polimérica. De modo similar, Cocero et al. (2009) afirma que quando há uma grande afinidade entre composto ativo e polímero, pode-se incorporar o composto ativo na matriz polimérica em um estado amorfo.

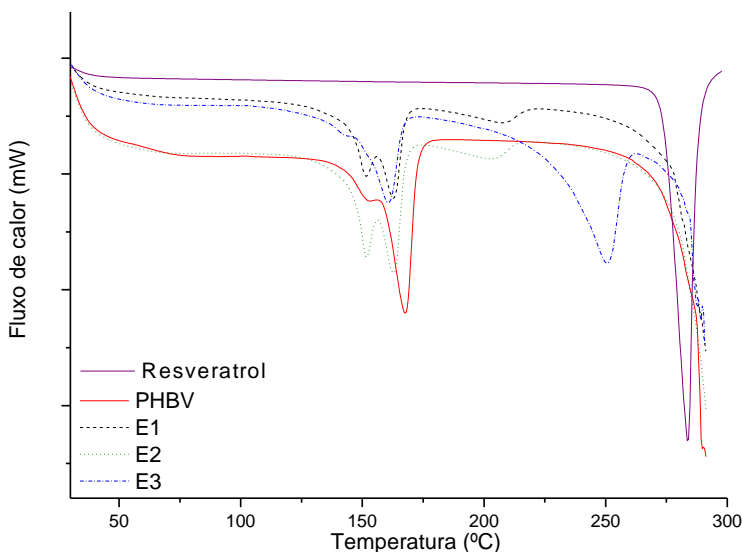
Em geral, sólidos amorfos apresentam maior solubilidade que suas formas cristalinas, devido à energia livre envolvida no processo de dissolução e maior mobilidade molecular. No estado amorfo, os sólidos apresentam moléculas aleatoriamente arrançadas, o que requer menos energia para separá-las e, como consequência, sua dissolução torna-se mais rápida que nas formas cristalinas (STULZER et al., 2009). No caso do composto trans-resveratrol, Shi et al. (2008) avaliaram sua solubilidade nas formas cristalina e amorfa, percebendo que esta última apresenta uma solubilidade 56% maior que a forma cristalina.

De acordo com Cocero et al. (2009), as análises de DRX e DSC permitem afirmar se o processo de coprecipitação foi efetivo na incorporação do composto ativo na matriz polimérica, ou se o produto é apenas uma mistura de partículas segregadas do composto ativo e agente encapsulante. Neste último caso, os gráficos de DRX e DSC constituem a sobreposição dos diagramas das substâncias puras, enquanto o efetivo encapsulamento caracteriza-se pela ausência dos picos cristalinos característicos dos compostos ativos.

4.9 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura foi realizada com o objetivo de estimar modificação na composição, grau de cristalinidade e temperatura de fusão que possam eventualmente ter sido causadas pelo processo de coprecipitação. Os termogramas do trans-resveratrol e do PHBV puros, bem como das partículas obtidas nos experimentos de coprecipitação 1, 2 e 3 (E1, E2 e E3, respectivamente), são apresentados na Figura 19.

Figura 19 – Termogramas do trans-resveratrol puro, PHBV puro e das partículas obtidas nos experimentos de coprecipitação 1, 2 e 3 (E1, E2 e E3 respectivamente).



Fonte: desenvolvido pelo autor.

O termograma do trans-resveratrol puro apresentou um pico endotérmico característico, correspondente ao ponto de fusão em 275,25 °C, enquanto que o PHBV exibiu seu ponto de fusão em 167,29 °C, dados que conferem com os reportados na literatura (CRÉTOIS et al., 2014; CUNHA et al., 2016). Já nos termogramas das partículas coprecipitadas obtidas nas condições experimentais 1 e 2, o pico de fusão característico do trans-resveratrol não se faz presente, indicando a ausência do composto no estado cristalino. Isto sugere que o trans-resveratrol aprisionado nestas partículas encontra-se na forma de um sólido amorfo, disperso na matriz polimérica (TZENG et al., 2011). A presença do pico de fusão característico do PHBV nos termogramas das partículas é devida ao excesso de polímero presente nas mesmas.

Diferentemente dos resultados das outras duas amostras de partículas coprecipitadas, a curva de DSC do experimento 3, que resultou em um percentual muito maior de trans-resveratrol que os

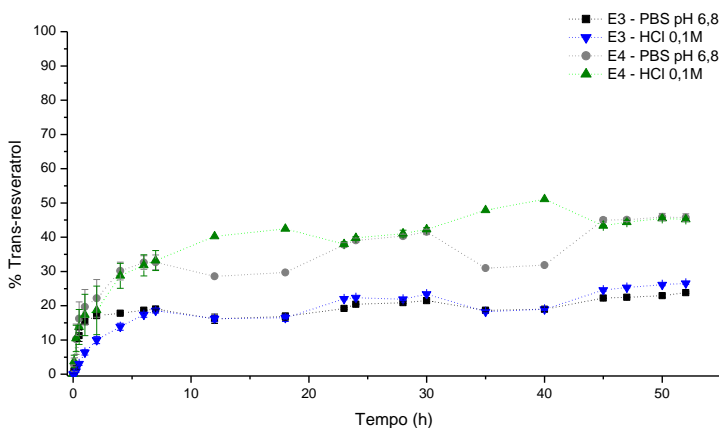
demais, apresentou um novo formato com o deslocamento do pico de fusão do trans-resveratrol. Este resultado indica a existência de uma nova fase sólida em que o trans-resveratrol encontra-se disperso com uma cristalinidade menor que o composto puro, corroborando os resultados de DRX.

As diferenças entre os termogramas das partículas coprecipitadas analisadas sugerem diferentes graus de cristalinidade nas partículas, todos inferiores ao composto puro, que podem ter influenciado a análise de determinação da capacidade de inibição do radical DPPH.

4.10 COMPORTAMENTO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO TRANS-RESVERATROL

O estudo do comportamento de liberação *in vitro* do trans-resveratrol foi realizado utilizando-se as partículas coprecipitadas nas condições experimentais 3 e 4, em função de apresentarem a maior e a menor eficiência de encapsulamento, respectivamente. A Figura 20 apresenta o percentual de trans-resveratrol liberado com o tempo nos meios PBS pH 6,8 e HCl 0,1 M, entre 0 e 52 h.

Figura 20 – Perfis de liberação *in vitro* das partículas obtidas nas condições de coprecipitação 3 e 4 (E3 e E4) nos meios de liberação PBS pH 6,8 e HCl 0,1 M. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão.



Fonte: desenvolvido pelo autor.

As diferentes condições experimentais caracterizaram-se por comportamentos de liberação similares, embora com taxas de liberação diferentes, dependendo das propriedades e do percentual de trans-resveratrol existente nas partículas. Os perfis de liberação das partículas do experimento 4 mostraram-se quase que sobrepostos nos diferentes meios de dissolução, com exceção dos intervalos entre 7 e 23 h e entre 30 e 40 h, em que o percentual de liberação aumentou no meio ácido enquanto diminuiu no PBS. Esta sobreposição dos perfis indica que o pH do meio não afetou significativamente a liberação do composto ativo. Um *burst* (alta quantidade do princípio ativo liberada rapidamente) de liberação foi observado nas primeiras 4 h, seguido por um aumento da liberação a uma taxa menor. O mesmo comportamento pode ser observado para o experimento 3 em PBS, com o *burst* inicial nas primeiras 2 h. Entretanto, o perfil de liberação no meio ácido apresentou uma liberação inicial menos acentuada, atingindo a segunda fase em torno de 6 h.

O *burst* de liberação permite o alcance da concentração efetiva de resveratrol rapidamente no plasma, enquanto que a liberação controlada permite a manutenção da concentração por um longo período de tempo. A baixa biodisponibilidade do trans-resveratrol devido a seu rápido metabolismo pode ser parcialmente evitado por este processo, estendendo seus efeitos biológicos *in vivo* por um tempo maior (MENDES et al., 2012; PENG et al., 2010).

Em geral, os perfis apresentaram um padrão de liberação bifásico. Inicialmente, o *burst* de liberação de trans-resveratrol observado pode estar associado à rápida dissolução do composto ativo adsorvido, incorporado ou fracamente ligado à superfície das partículas (mesmo após a etapa de lavagem), como sugerido pelos resultados da microscopia confocal e da análise de DSC (Figuras 15 e 19). Na fase seguinte, mais lenta, o trans-resveratrol foi progressivamente liberado sob influência da difusão por meio da matriz polimérica, bem como da degradação do polímero (SANNA et al., 2012). De acordo com Pouton e Akhtar (1996) a liberação de princípios ativos encapsulados em baixas concentrações, a partir do PHBV tende a ocorrer pela penetração de água e formação de poros nas matrizes poliméricas. Sua degradação ocorre por erosão da superfície, o que o torna um material atrativo para a aplicação na liberação controlada de compostos bioativos.

Após as 52 h de experimento, o percentual total de trans-resveratrol liberado pelas partículas coprecipitadas no experimento 3 foi de 26,57% e 51,07% para as partículas do experimento 4, o que é consistente se levarmos em conta que o percentual real de

encapsulamento alcançado no experimento 3 é aproximadamente o dobro que o percentual do experimento 4. Em relação a isto, não houve diferença significativa entre as concentrações finais de trans-resveratrol alcançadas em ambos os experimentos.

Ao avaliar o comportamento de liberação de micropartículas de trans-resveratrol encapsulado em PHBV pela técnica de simples emulsão/evaporação de solvente em meio PBS (pH 6,8), Mendes et al. (2012) observaram um percentual de 80% de liberação do composto ativo em tempos de 90 a 300 min. As partículas em questão apresentaram tamanhos médios entre 29,20 e 47 μm , aproximadamente 100 vezes maiores que as obtidas no presente trabalho. O perfil de liberação foi também caracterizado por um comportamento bifásico, com um *burst* inicial e uma segunda fase de liberação lenta. Percebe-se, assim, a similaridade entre os perfis de liberação das partículas obtidas com o mesmo princípio ativo e agente encapsulante, embora por meio de técnicas de encapsulamento distintas. Evidencia-se ainda, a influência do tamanho de partícula sobre a velocidade de liberação do composto ativo, sendo esta inversamente proporcional ao tamanho das partículas.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1 CONCLUSÕES

O processo de coprecipitação por meio da técnica SEDS permitiu a obtenção de partículas submicrométricas de trans-resveratrol em PHBV com percentual real e eficiência de encapsulamento de até 49,71 e 99,54%, respectivamente. A pressão do sistema apresentou um efeito significativo negativo sobre ambos os resultados, assim como a interação entre pressão e concentração de trans-resveratrol na solução orgânica, o que é interessante do ponto de vista industrial, pois o uso de menores pressões implica em menores custos de investimento e operacionais.

De modo geral, as partículas coprecipitadas apresentaram morfologia esférica, a qual favorece uma maior bioabsorção devido à maior área superficial apresentada. O tamanho de partícula obtido variou entre 390 e 570 nm, não tendo sido influenciado significativamente pelas variáveis de processo. A distribuição de tamanho de partícula mostrou-se estreita, como é característico da técnica SEDS.

Em função destes resultados, a atividade antioxidante *in vitro* do trans-resveratrol foi mantida após o processo de coprecipitação e ainda aumentada em algumas condições experimentais, sugerindo melhora na biodisponibilidade do composto ativo.

Análises das partículas coprecipitadas mostraram que o processo supercrítico não alterou a estrutura química do trans-resveratrol. Por outro lado, o composto tornou-se mais amorfo após o processo, o que pode favorecer sua dissolução e bioabsorção. Como as partículas apresentaram-se livres de solvente orgânico, seu consumo ou aplicação não apresentam riscos à saúde humana.

O comportamento de liberação *in vitro* observado apresentou um *burst* inicial em até 6 horas de experimento, seguido por uma liberação lenta e constante, o que possibilita a aplicação das partículas em sistema de liberação em longo prazo.

A coprecipitação em PHBV foi capaz de proteger o trans-resveratrol da radiação UV, diminuindo pela metade sua degradação após uma hora de exposição. Estes resultados mostram-se promissores, pois indicam o potencial de aplicação das partículas em produtos cosméticos, onde o composto possa exercer suas propriedades biológicas.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A seguir são apresentadas algumas sugestões e ideias para continuidade deste trabalho:

- Realizar a extração do trans-resveratrol a partir de matérias-primas regionais, com posterior etapa de coprecipitação;
- Avaliar a possibilidade de adição de um surfactante (Tween 80) na água na etapa de lavagem das partículas buscando aumentar a eficiência desta etapa e obter menor aglomeração das partículas depois de secas;
- Modelagem matemática dos perfis de liberação do princípio ativo que contemple as representações adequadas dos mecanismos envolvidos no processo;
- Realizar estudos de liberação *in vitro* em meios simuladores de digestão, com o uso de saliva, sucos gástrico, duodenal e bile, formulados a partir de sais, ácidos e enzimas, de modo a conhecer o comportamento das partículas nestes sistemas;
- Estudar a cinética de degradação do material encapsulado por um maior período de tempo;
- Avaliar a aplicação das partículas em formulações de cosméticos com proteção solar;
- Realizar estudos *in vivo* para verificar a reprodutibilidade dos resultados observados *in vitro*.

6 PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DECORRENTE DA EXECUÇÃO DESTE TRABALHO

6.1 TRABALHOS SUBMETIDOS EM PERIÓDICO

- DAL MAGRO, C.; AGUIAR, G.P.S.; VENERAL, J.G.; SANTOS, A.E.; CHAVES, L.M.P.C.; OLIVEIRA, J.V.; LANZA, M. Co-precipitation of trans-resveratrol in PHBV using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids technique. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 127, p. 182-190, set. 2017.
- AGUIAR, G.P.S.; ARCARI, B.D.; CHAVES, L.M.P.C.; DAL MAGRO, C.; BOSCHETTO, D.L.; PIATO, A.L.; LANZA, M.; OLIVEIRA, J.V. Micronization of trans-resveratrol by supercritical fluid: dissolution, solubility and in vitro antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, submetido, 2017.

6.2 TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO

- DAL MAGRO, C.; AGUIAR, G.P.S.; SANTOS, A.E.; CHAVES, L.M.P.C.; OLIVEIRA, J.V.; LANZA, M. Coprecipitação de trans-resveratrol em PHBV utilizando a técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluido Supercrítico (SEDS). **XXV CBCTA – Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos e X CIGR Section IV International Technical Symposium**, Gramado, 2016.
- DAL MAGRO, C.; AGUIAR, G.P.S.; SANTOS, A.E.; CHAVES, L.M.P.C.; CARVALHO, G.O.; OLIVEIRA, J.V.; LANZA, M. Coprecipitação de resveratrol em PHBV utilizando tecnologia supercrítica. **II CONIGTI - Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Informação e III CSBEA - Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, Erechim, 2016.

REFERÊNCIAS

- AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; AHMAD, N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 186, n. 1, p. 28–37, 1 jan. 2003.
- AGARWAL, A.; KHARB, V.; SAHARAN, V. A. Process optimisation, characterisation and evaluation of resveratrol-phospholipid complexes using Box-Behnken statistical design. **International Current Pharmaceutical Journal**, v. 3, n. 7, p. 301–308, 7 jun. 2014.
- AGGARWAL, B. B. et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**, v. 24, n. 5A, p. 2783–2840, out. 2004.
- AGUIAR, G. P. S. et al. Trans-resveratrol micronization by SEDS technique. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 350–355, Outubro 2016.
- AHMAD, I. et al. Supercritical Fluid Technology-Based Trans-Resveratrol SLN for Long Circulation and Improved Radioprotection. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 11, n. 4, p. 308–322, 1 dez. 2016.
- BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradation of tetracycline by photo-Fenton process—Solar irradiation and matrix effects. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 187, n. 1, p. 33–39, 5 mar. 2007.
- BERTACCHE, V. et al. Host–Guest Interaction Study of Resveratrol With Natural and Modified Cyclodextrins. **Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry**, v. 55, n. 3–4, p. 279–287, 1 ago. 2006.
- BERTUCCO, A.; VETTER, G. **High pressure process technology: Fundamentals and applications**. Amsterdam: Industrial Chemistry Library, Elsevier, 2001. v. 9.

BOSCHETTO, D. L. et al. Phase behavior and process parameters effect on grape seed extract encapsulation by SEDS technique. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 352–360, Outubro 2013.

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

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

BRUNEL, D. G. et al. Natural additives for poly (hydroxybutyrate - CO - hydroxyvalerate) - PHBV: effect on mechanical properties and biodegradation. **Materials Research**, v. 17, n. 5, p. 1145–1156, out. 2014.

BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes.** Springer Verlag, 1994.

CADDEO, C. et al. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1–2, p. 183–191, 3 nov. 2008.

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

CATALGOL, B. et al. Resveratrol: French Paradox Revisited. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, 17 jul. 2012.

CATONI, S. E. M. **Biossíntese e obtenção de PHB e PHBV plastificados com PEG visando aplicação em liberação controlada de fármacos.** 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville, Joinville, SC, Brasil, 2011.

CHEN, A.-Z. et al. Study of poly(l-lactide) microparticles based on supercritical CO₂. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 12, p. 2339–2345, 1 dez. 2007.

CHEN, G.-Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6565–6578, nov. 2005.

COCERO, M. J. et al. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, 20th Year Anniversary Issue of the Journal of Supercritical Fluids. v. 47, n. 3, p. 546–555, jan. 2009.

COSTA, M. S. et al. Supercritical antisolvent precipitation of PHBV microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 1, p. 72–77, 2 jan. 2007.

COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 649–657, 2006.

CRÉTOIS, R. et al. Microstructure and barrier properties of PHBV/organoclays bionanocomposites. **Journal of Membrane Science**, v. 467, p. 56–66, Outubro 2014.

CUNHA, M. et al. Film blowing of PHBV blends and PHBV-based multilayers for the production of biodegradable packages. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 2, p. n/a-n/a, 10 jan. 2016.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 2, p. 135–146, Dezembro 2010.

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

DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTS, D. J. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Food Chemistry**, v. 167, p. 205–212, 15 jan. 2015.

DOCHERTY, J. J. et al. Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice. **Antiviral Research**, v. 61, n. 1, p. 19–26, jan. 2004.

ELVASSORE, N.; BERTUCCO, A.; CALICETI, P. Production of Insulin-Loaded Poly(Ethylene Glycol)/Poly(l-Lactide) (PEG/PLA) Nanoparticles by Gas Antisolvent Techniques. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 10, p. 1628–1636, out. 2001.

FARAGO, P. V. et al. Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 7, p. 1298–1305, 2008.

FIGUEIRAS, T. S.; NEVES-PETERSEN, M. T.; PETERSEN, S. B. Activation Energy of Light Induced Isomerization of Resveratrol. **Journal of Fluorescence**, v. 21, n. 5, p. 1897–1906, set. 2011.

FIGUEIREDO, T. V. B. et al. Production and characterization of polyhydroxyalkanoates obtained by fermentation of crude glycerin from biodiesel. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1111–1117, 2014.

FRANCESCHI, E. et al. Precipitation of β -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 2, p. 259–269, dez. 2008.

FRANCESCHI, E. et al. Precipitation of β -carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO₂. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 4, p. 656–663, dez. 2009.

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

GOKCE, E. H. et al. Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 1841–1850, 2012.

HEREDIA, A.; DAVIS, C.; REDFIELD, R. Synergistic inhibition of HIV-1 in activated and resting peripheral blood mononuclear cells, monocyte-derived macrophages, and selected drug-resistant isolates

with nucleoside analogues combined with a natural product, resveratrol. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 25, n. 3, p. 246–255, 1 nov. 2000.

HOBBS, S. K. et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 8, p. 4607–4612, 14 abr. 1998.

HWANG, D.; LIM, Y.-H. Resveratrol antibacterial activity against *Escherichia coli* is mediated by Z-ring formation inhibition via suppression of FtsZ expression. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10029, 5 maio 2015.

JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 34, n. 2, p. 109–123, dez. 2013.

JUNG, J.; PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 20, n. 3, p. 179–219, ago. 2001.

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

KHAN, M. A. et al. Comparative investigation of the free radical scavenging potential and anticancer property of *Diospyros blancoi* (Ebenaceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 5, p. 410–417, Maio 2016.

LOSS, R. A. et al. Encapsulation of eugenyl acetate in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 10, p. 3859–3864, out. 2016.

MACHADO JR, F. R. S. et al. Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO₂. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 17–21, mar. 2014.

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

MANTEGNA, S. et al. A one-pot ultrasound-assisted water extraction/cyclodextrin encapsulation of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 746–750, fev. 2012.

MENDES, J. B. E. et al. PHBV/PCL Microparticles for Controlled Release of Resveratrol: Physicochemical Characterization, Antioxidant Potential, and Effect on Hemolysis of Human Erythrocytes. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–13, 2012.

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

NDIAYE, M. et al. The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, n. 2, p. 164–170, 15 abr. 2011.

PENG, H. et al. Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 23–28, 1 jul. 2010.

PERRUT, M.; JUNG, J.; LÉBOEUF, F. Enhancement of dissolution rate of poorly soluble active ingredients by supercritical fluid processes: Part II: Preparation of composite particles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, n. 1, p. 11–16, 6 jan. 2005.

POUTON, C. W.; AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Latest developments in modern drug delivery. v. 18, n. 2, p. 133–162, 15 jan. 1996.

PRIAMO, W. L. et al. Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 1, p. 103–109, jul. 2010.

PRIAMO, W. L. et al. In vitro release profiles of β -carotene encapsulated in PHBV by means of supercritical carbon dioxide

miconization technique. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 2, p. 137–143, mar. 2011.

PRIAMO, W. L. et al. Micronization processes by supercritical fluid technologies: a short review on process design (2008-2012) - doi: 10.4025/actascitechnol.v35i4.18819. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 35, n. 4, p. 695–709, 23 maio 2013.

REDDY, C. S. K. et al. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 137–146, abr. 2003.

REVERCHON, E. et al. Supercritical fluids processing of polymers for pharmaceutical and medical applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, 20th Year Anniversary Issue of the Journal of Supercritical Fluids. v. 47, n. 3, p. 484–492, jan. 2009.

RIEKES, M. K. et al. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 5, p. 962–968, 20 jul. 2011.

ROBINSON, K.; MOCK, C.; LIANG, D. Pre-formulation studies of resveratrol. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 9, p. 1464–1469, 2015.

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

SANTOS, D. T. et al. Production of stabilized sub-micrometric particles of carotenoids using supercritical fluid extraction of emulsions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 167–174, jan. 2012.

SANTOS, D. T. et al. Stabilization of anthocyanin extract from jaboticaba skins by encapsulation using supercritical CO₂ as solvent. **Food Research International**, Stability of phytochemicals during processing. v. 50, n. 2, p. 617–624, mar. 2013.

SESSA, M. et al. Bioavailability of encapsulated resveratrol into nanoemulsion-based delivery systems. **Food Chemistry**, v. 147, p. 42–50, 15 mar. 2014.

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

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

SILVA, C. G. et al. Photochemical and photocatalytic degradation of trans-resveratrol. **Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 12, n. 4, p. 638–644, abr. 2013.

SIMIONI, A. R. et al. PHBHV/PCL microspheres as biodegradable drug delivery systems (DDS) for photodynamic therapy (PDT). **Journal of Materials Science**, v. 43, n. 2, p. 580–584, 1 jan. 2008.

STULZER, H. K. et al. Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying. **Materials Science and Engineering: C**, Proceedings of the 2nd “French-Brazilian-Polymer” FBPOL2008 Conference. v. 29, n. 2, p. 387–392, 1 mar. 2009.

SUN, A. Y. et al. Botanical Phenolics and Neurodegeneration. In: BENZIE, I. F. F.; WACHTEL-GALOR, S. (Eds.). . **Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects**. 2nd. ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2011.

TRELA, B. C.; WATERHOUSE, A. L. Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1253–1257, 1 jan. 1996.

TZENG, C.-W. et al. Enhancement of dissolution and antioxidant activity of kaempferol using a nanoparticle engineering process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 5073–5080, 11 maio 2011.

VILELA, F. M. P. et al. Effect of ultraviolet filters on skin superoxide dismutase activity in hairless mice after a single dose of ultraviolet radiation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 2, p. 387–392, Fevereiro 2012.

VYAS, N. et al. Penetration of sub-micron particles into dentinal tubules using ultrasonic cavitation. **Journal of Dentistry**, v. 56, p. 112–120, jan. 2017.

XIE, M-B. et al. Solubility enhancement of curcumin via supercritical CO₂ based silk fibroin carrier. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 103, p. 1-9, ago. 2015.

YAMADA, S. et al. Crystalline Structural Change of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with Narrow Compositional Distribution. **Macromolecules**, v. 34, n. 13, p. 4659–4661, 1 jun. 2001.

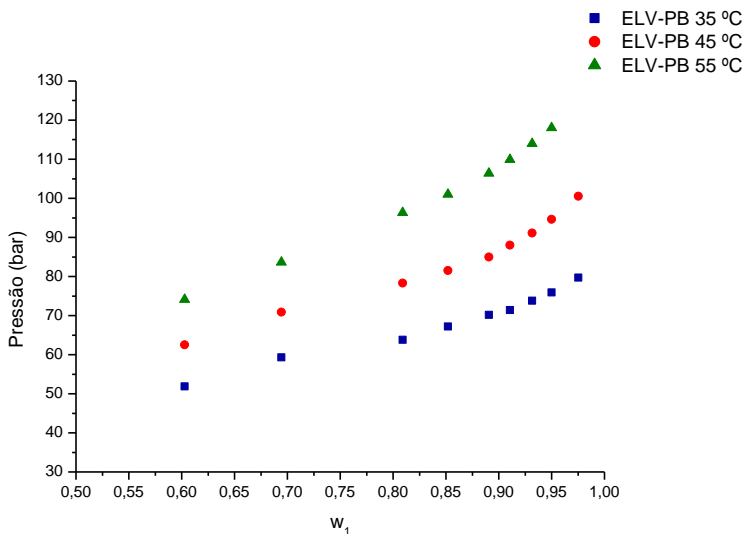
YEO, S.-D.; KIRAN, E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 3, p. 287–308, jul. 2005.

YU, H.-Y. et al. Reinforcement of transparent poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by incorporation of functionalized carbon nanotubes as a novel bionanocomposite for food packaging. **Composites Science and Technology**, v. 94, p. 96–104, Abril 2014.

ZHENG, L.-F. et al. DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu (II) ions: Mechanism and structure-activity relationship. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 12, p. 1807–1816, Dezembro 2006.

APÊNDICE A – Comportamento de fases do sistema ternário CO_2 + diclorometano + acetona

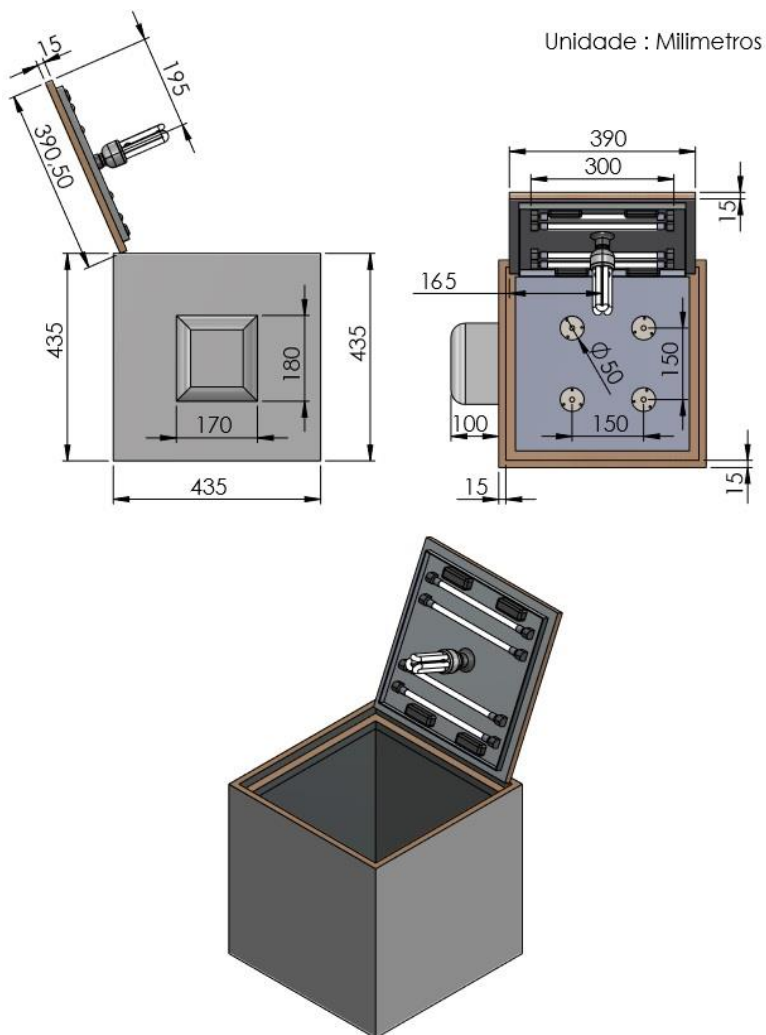
Figura 21 – Isotermas de equilíbrio líquido-vapor do sistema ternário CO_2 + diclorometano + acetona. w_1 : fração mássica de CO_2 ; ELV-PB: equilíbrio líquido-vapor observado por meio do ponto de bolha.



Fonte: desenvolvido pelo autor.

APÊNDICE B – Esquema da caixa de irradiação para análise de fotoestabilidade

Figura 22 – Esquema com dimensões da caixa de irradiação para análise de fotoestabilidade das partículas de trans-resveratrol coprecipitadas em PHBV.



Fonte: desenvolvido pelo autor.

APÊNDICE C – Doses de irradiação aplicadas às amostras na análise de fotoestabilidade

Tabela 6 – Doses de irradiação aplicadas às amostras de trans-resveratrol puro e partículas de trans-resveratrol coprecipitadas em PHBV

Tempo (s)	Dose de irradiação (mJ·cm⁻²)	Intensidade de irradiação (W·m⁻²)
60	60	10
300	404	13,46
600	739	12,31
1800	2161	12,00
3600	4043	11,23

Fonte: desenvolvido pelo autor.

APÊNDICE D – Curvas de calibração construídas por CG-FID

Figura 23 – Curva de calibração para quantificação de ppm residual de diclorometano

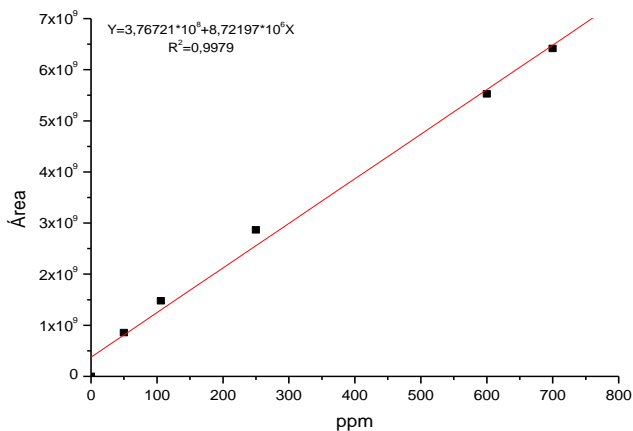
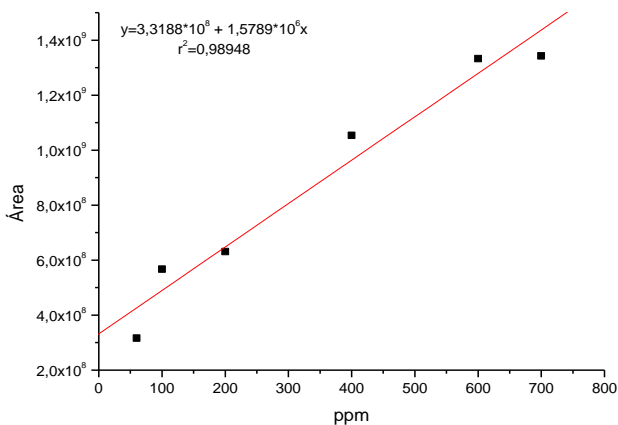


Figura 24 – Curva de calibração para quantificação de ppm residual de acetona.



APÊNDICE E – Resultados de quantificação de ppm residual de solventes

Tabela 7 – Resultados dos cálculos de quantificação de acetona e diclorometano residual a partir das curvas de calibração.

Amostra	Acetona		Diclorometano	
	Área	Concentração (ppm)	Área	Concentração (ppm)
1	3226948	0	49672	0
2	2137802	0	29096	0

Fonte: desenvolvido pelo autor.

ANEXO A – Certificado de análise do trans-resveratrol emitido pelo fabricante Jiaherb Phytochem – Xi'an, China



JIAHERB[®]
Phytochem

Shaanxi Jiabao Phytochem Co., Ltd. Tel:0086-29-88344365 Fax:0086-29-88325515

A-6th floor, No.66 Jinye 1st Road, Xi'an, China 710077

Http://www.jiaherb.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Resveratrol 99% Resveratrol(HPLC)

Batch No.: Chz20150504 Manufacture Date: 20150504 Expiry Date: 20180503

General Information			
Part Used	Root	Solvents Used	Water&Ethanol
Botanical Source	<i>Polygonum cuspidatum</i>	Country Of Origin	China
ITEMS	SPECIFICATION	METHOD	TEST RESULTS
Physical&Chemical Data			
Color	Creamy	Organoleptic	Conform
Odour	characteristic	Organoleptic	Conform
Appearance	Fine Powder	Organoleptic	Conform
Analytical Quality			
Identification	Identical to R.S. sample	HPTLC	Identical
Resveratrol	≥99.0%	HPLC(on anhydrous basis)	99.10%
Sieve analysis	100 % through 80 mesh	USP36<786>	Conform
Water(KF)	≤2.0 %	Eur.Ph.7.0 [2.5.12]	0.25%
Total Ash	≤1.0 %	Eur.Ph.7.0 [2.4.16]	0.07%
Contaminants			
Lead (Pb)	≤3.0 mg/kg	Eur.Ph.7.0-2.2.58>ICP-MS	0.0412 mg/kg
Arsenic (As)	≤2.0 mg/kg	Eur.Ph.7.0-2.2.58>ICP-MS	<0.01 mg/kg
Cadmium (Cd)	≤1.0 mg/kg	Eur.Ph.7.0-2.2.58>ICP-MS	<0.01 mg/kg
Mercury (Hg)	≤0.1 mg/kg	Eur.Ph.7.0-2.2.58>ICP-MS	0.0279 mg/kg
Solvents Residue	Meet Eur.Ph.7.0 <5.4>	Eur.Ph.7.0=2.4.24>	Conform
Ethanol	<5000ppm		Conform
Methanol	<3000ppm		Conform
Pesticides Residue	Meet USP Requirements	USP36 <561>	Conform
Microbiological			
Total Plate Count	≤1000 cfu/g	USP36 <61 >	Conform
Yeast &Mold	≤100 cfu/g	USP36 <61 >	Conform
E.Coli.	Negative	USP36 <62 >	Conform
Salmonella	Negative	USP36 <62 >	Conform
Packing&Storage	Packed in paper-drums and two plastic-bags inside. N.W:25kgs .I.D.35 *H51cm; Store in a well-closed container Away from moisture,light, oxygen.		
Shelf life	36 months under the conditions above and in its original packaging.		
Manufacturer	Shaanxi Jiabao Phytochem Co., Ltd. Xi'an, P.R. China.		

Quality Assurance Officer



No: STP-QCP-<2> (812)

Shaanxi Jiabao Phytochem Co., Ltd. Factory Location NO.45 Hongguang Road,Hongguang Industrial Park,Xi'an,China 710686

2015/5/4 10:26:30

ANEXO B – Certificado de análise do trans-resveratrol emitido pelo fornecedor SM Empreendimentos – São Paulo, Brasil





CERTIFICADO DE ANÁLISE

INSUMO: RESVERATROL		Pág 1		
ORIGEM/PROCEDÊNCIA:	CHINA/CHINA	DATA DE ANÁLISE:	04/08/2015	
LOTE INTERNO:	1509957	LOTE FABRICANTE:	CHZ20150504	
DATA DE FABRICAÇÃO:	Maior/2015	DATA DE VALIDADE:	Maior/2018	
CAS:	501-36-0			
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM: TEMPERATURA AMBIENTE				
OBS 1: Nome da planta: Polygonum cuspidatum Sieb				
OBS 2: Solventes utilizados: Água e Etanol				
OBS 3: Parte utilizada: Raiz				
DATA DE EMISSÃO: 00/00/0000	NF: 000.000	ORDEM FRACIONAMENTO: 150634309	DATA ENC: 04/08/2015	
TESTES		ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
Descrição*	Pó fino creme, com odor característico	Pó fino creme, com odor característico		Fabricante
Identificação	HPTLC	Conforme		Fabricante
Umidade*	≤ 2,0%	≤ 2,0%		Fabricante
Cinzas totais*	≤ 1,0%	0,24%		Fabricante
Chumbo	≤ 3,0 mg/Kg	0,0412 mg/Kg		Fabricante
Arsênico	≤ 2,0 mg/Kg	< 0,01 mg/Kg		Fabricante
Cádmio	≤ 1,0 mg/Kg	< 0,01 mg/Kg		Fabricante
Mercúrio	≤ 0,1 mg/Kg	0,0279 mg/Kg		Fabricante
Solvente residual*	Etanol < 5000 ppm Metanol < 3000 ppm	2034,92 ppm 345,07 ppm		Fabricante
Pesticida residual	Conforme	Conforme		Fabricante
Teor (base anidra) *	Resveratrol > 99,0%	100,38%		Fabricante
Granulometria	Passa 100% na malha 80	Conforme		Fabricante
TESTES MICROBIOLÓGICOS				
Contagem total de bactérias*	≤ 1000 UFC/g	< 10 UFC/g		Fabricante
Fungos e leveduras*	≤ 100 UFC/g	< 10 UFC/g		Fabricante
Escherichia coli*	Negativo	Negativo		Fabricante
Salmonella*	Negativo	Negativo		Fabricante
TESTES ADICIONAIS				
Densidade aparente*	Informativo (sem compactação)	0,40 g/mL		Mt. Geral FB V

* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÉUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.
 LEGENDA DAS REFERÊNCIAS: FB (Farmacopeia Brasileira) / USP (United States Pharmacopeia) / EP (European Pharmacopeia) / BP (British Pharmacopeia) / JP (Japanese Pharmacopeia) / MC (Método Geral farmacopéico) / Fabricante (especificação e metodologia conforme o fabricante do insumo) / Informativo (resultado fornecido como informativo pelo LCO SM EMPREENDIMENTOS FARMACÉUTICOS LTDA).

CONCLUSÃO: (X) Aprovado () Reprovado


 Responsável Técnico Substituto
 Olívia Neiva Mesquita Mendes - CRF-GO Nº 9227


 Responsável Técnico
 João Paulo Sartim Mendes - CRF-GO 7356


 Laísa Caroline de Oliveira Costa
 Farmacêutica
 CRF-74.121