

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

Wagner Luiz Priamo

**ENCAPSULAMENTO DE β -CAROTENO EM PHBV
COM DIÓXIDO DE CARBONO E AVALIAÇÃO DA
LIBERAÇÃO *IN VITRO***

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

Orientador: Prof.^ª Dr.^ª Sandra Regina Salvador Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

FLORIANÓPOLIS, SC - BRASIL

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

P945e Priamo, Wagner Luiz
Encapsulamento de *B*-caroteno em PHBV com dióxido de carbono e avaliação da liberação *in vitro* [tese] / Wagner Luiz Priamo ; orientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira. - Florianópolis, SC, 2011.
146 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Engenharia de alimentos. 2. Precipitação. 3. Encapsulamento. 4. Liberação *in vitro*. 5. Beta Caroteno. I. Ferreira, Sandra Regina Salvador. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

CDU 663

Wagner Luiz Priamo

**ENCAPSULAMENTO DE β -CAROTENO EM PHBV COM
DIÓXIDO DE CARBONO E AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO *IN*
*VITRO***

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Engenharia de Alimentos e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Local, 24 de Fevereiro de 2011.

Prof.^a. Dr.^a. Alcilene Monteiro Fritz
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira
Co-Orientador
URI-Campus de Erechim

Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza
Universidade Federal do Paraná

Prof.^a. Dr.^a Angela Machado de
Campos,
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof., Dr. Leandro Danielski,
Universidade Federal de Pernambuco

Prof., Dr. Bruno Carciofi
Universidade Federal de Santa
Catarina

Dedico este trabalho:

A meus pais, Sergio Luiz Priamo e Suzana Terezinha Priamo.

Queridos! Aqui está mais um importante passo que trilhamos juntos. Vocês, que são exemplos de fé, força e coragem, a fortaleza que me protege em todos os momentos da vida. Suas palavras positivas garantiram meu equilíbrio e deram-me energia para vencer. Muitíssimo obrigado por tudo que fazem por mim e por estarem sempre presentes ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus orientadores, Dr^a. Sandra Regina Salvador Ferreira e ao Dr. José Vladimir de Oliveira.

Agradeço-lhes por terem aceitado mais este desafio, pela amizade, incentivo, pensamentos positivos e confiança ao longo do tempo. Expresso aqui, meu respeito a estes maravilhosos profissionais e agradeço a oportunidade de termos dividido o mesmo grupo de pesquisa.

A Universidade Federal de Santa Catarina.

Pela oportunidade da realização de mais este projeto profissional.

A Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim.

Pela recepção e disponibilidade de utilização de suas instalações, as quais foram fundamentais para a realização desta tese.

Aos Professores.

Aqueles que me conduziram, orientaram, aconselharam e transmitiram seus conhecimentos e experiências.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Pela credibilidade e apoio financeiro concedidos.

Aos Colegas.

Embora tenhamos passado poucos momentos juntos, tenham certeza, vocês colaboraram muito para a completa realização de mais esta etapa.

Aos amigos do LATESC/UFSC e Laboratório de Termodinâmica Aplicada/URI.

Gostaria de agradecer a todas essas pessoas pelos ótimos momentos em que passamos juntos. Com certeza, suas presenças tornaram nosso ambiente de trabalho mais alegre e o tempo passou mais depressa, fazendo com que o trabalho fosse realizado com mais facilidade e tranquilidade. Nunca esquecerei vocês: Natália, Sibebe, Patrícia, Irede, Elton, Luciana, Sandy, Stéphanie, Alana e todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora.

Meus sinceros agradecimentos ao Dr. Leandro Danielski, ao Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza, ao Prof. Dr. Arioaldo Bolzan, à Prof^a. Dr^a. Angela Machado de Campos e ao Prof. Dr. Bruno Carciofi pelas correções e sugestões, as quais foram de fundamental importância no complemento desta tese.

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

ENCAPSULAMENTO DE β -CAROTENO EM PHBV COM DIÓXIDO DE CARBONO E AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Palavras-chave: precipitação, encapsulamento, liberação *in vitro*, β -caroteno, PHBV.

O objetivo geral desta tese foi estudar o processo de encapsulamento de β -caroteno em PHBV (poli 3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) utilizando dióxido de carbono pressurizado como anti-solvente avaliando, posteriormente, o comportamento de liberação *in vitro* das partículas. Para o alcance de tal objetivo, primeiramente, foi realizado um estudo do efeito das variáveis de processo nas características das partículas de β -caroteno e PHBV, puras e co-precipitadas. Na precipitação do PHBV puro, o efeito da pressão foi verificado, avaliando-o na faixa de 80 a 200 bar e constatou-se que o aumento da pressão de precipitação tende a formar menores partículas. A morfologia não foi influenciada pela ação desta variável, apenas obteve-se comportamento diferente do PHBV não processado, o qual inicialmente tinha formação fibrosa passando após a precipitação para estrutura do tipo esfera. Para o β -caroteno puro foi investigado o efeito da sua concentração na solução e também da pressão de precipitação, os quais foram de 4 e 8 mg.ml⁻¹ e 80 a 200 bar, respectivamente. Verificou-se que mantendo a concentração da solução fixa, ocorre um aumento do tamanho médio das partículas de β -caroteno com o aumento da pressão e que no intervalo de pressão de 80 a 160 bar as partículas apresentaram valores crescentes e na faixa de 160 a 200 bar o valor médio do tamanho das partículas decresceu. Na etapa de encapsulamento foram estudadas concentrações de β -caroteno na solução que variaram de 2 a 30 mg.ml⁻¹ sempre mantendo a concentração de PHBV fixa e igual a 30 mg.ml⁻¹. Os percentuais e eficiência de encapsulamento foram determinados submetendo as amostras do material co-precipitado à agitação manual por 20 segundos e agitação magnética por 300 segundos, a partir do qual obteve-se eficiência máxima de encapsulamento de 55,53 % e 45,06 % respectivamente, na concentração de 30 mg.ml⁻¹ de β -caroteno.

Observou-se na faixa de concentração de 8 a 16 mg.ml⁻¹ de β -caroteno um comportamento exponencial da eficiência de encapsulamento em função da sua concentração na solução. Os experimentos em que se obtiveram os maiores percentuais e eficiência de encapsulamento foram selecionados para o estudo dos ensaios de liberação em meios puros (acetato de etila, n-hexano, etanol anidro e solução tampão fosfato – pH 7,4) à 40 °C \pm 0,5 °C e 80 rpm. Constatou-se que em acetato de etila e n-hexano os comportamentos de liberação são semelhantes e caracterizados por um *burst* inicial (em aproximadamente 10 minutos), na qual grande parte do princípio ativo foi liberada. Em média, foram obtidos percentuais de liberação que variaram de 26,97 % a 71,15 %, e de 42,09 % a 55,96 %, para os meios puros contendo acetato de etila e n-hexano, respectivamente. Em etanol anidro o comportamento de liberação apresentou-se diferente, pois não foi verificado o *burst* inicial e a liberação ocorreu de forma gradual e lenta, atingindo percentuais e tempos de liberação de até 88,22 % e 16 dias, respectivamente. Os resultados encontrados para os ensaios de liberação em solução tampão fosfato (pH 7,4) indicaram que mesmo após 60 dias, o princípio ativo continuou a ser liberado. Enfim, para todos os ensaios de liberação constatou-se que a concentração do princípio ativo liberada foi proporcional à massa inicial de β -caroteno e que através dos meios usados pode-se optar por liberações rápidas ou prolongadas.

Abstract of Thesis presented to Food Engineering Program of the Federal University of Santa Catarina for the degree of Doctor in Food Engineering.



ENCAPSULATION OF β -CAROTENE IN PHBV WITH CARBON DIOXIDE AND EVALUATING OF IN VITRO RELEASE

Keywords: precipitation, encapsulation, in vitro release, β -carotene, PHBV.

The main objective of this work was to determine the *in vitro* release profiles of β -carotene microparticles encapsulated in PHBV through the use of supercritical fluid technology, using pressurized carbon dioxide as anti-solvent. For this purpose, at first, a study of the effect of process variables on the characteristics of the particles of β -carotene and PHBV, pure and co-precipitated was carried out. In the precipitation of pure PHBV, the effect of pressure was evaluated in the range from 80 to 200 bar, with a resulting negative effect on the particles average size. The morphology was not affected by this variable, leading to only a different behavior compared to raw PHBV, which initially had fibrous structure and after processing presented spherical type. For pure β -carotene, it was investigated the effect of concentration in the solution and also the precipitation pressure (4 and 8 mg.ml⁻¹ and 80 to 200 bar, respectively). The results indicated that keeping the concentration of the solution fixed, there was an increase in the average size of β -carotene particles with increasing pressure and that the system pressure, in the range from 80 to 160 bar, promoted an increase in particle size and in the range of 160 to 200 bar, the mean particle size decreases. In the co-precipitation, it was studied the effect of β -carotene concentrations in solution (ranging from 20 to 30 mg.ml⁻¹), keeping the concentration of PHBV fixed to 30 mg.ml⁻¹. The percentage and encapsulation efficiency were analyzed submitting samples of the material co-precipitated to manual agitation (20 seconds) and magnetic stirring (300 seconds), with the maximum efficiency of encapsulation of 55.53% and 45.06%, respectively, for the β -carotene concentration of 30 mg.ml⁻¹. An exponential behavior of the encapsulation efficiency depending on the β -carotene concentration (from 8 to 16 mg.ml⁻¹) was also verified. The experiments that presented the highest percentage and encapsulation

efficiency were selected for the study of the *in vitro* release, using pure solvent media (ethyl acetate, n-hexane, anhydrous ethanol and phosphate buffer - pH 7.4) at 313.15K and 80 rpm. It was observed that in ethyl acetate and n-hexane the release behaviors are similar and characterized by an initial burst (in about 10 minutes). In these solvents, the percentage of release ranged from 26.97 % to 71.15 %, and 42.09 % to 55.96 %, respectively. For anhydrous ethanol the release behavior was different because it was verified a gradual and slow release with percentage and release times of up to 88.22% and 16 days, respectively. The release results in phosphate buffer (pH 7.4) showed that even after 60 days the active principle continued to be released. For all tests, it was verified that the concentration of β -carotene released is proportional to the initial mass of this active principle and that the specific medium may be used to provide rapid or prolonged releases.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 – Fórmula estrutural plana do β -caroteno _____	10
Figura 2.2 - Esquema e princípio governante geral das técnicas (GAS, SAS, PCA, SEDS e ASES) que utilizam anti-solvente para a formação de partícula _____	18
Figura 2.3 - Aparato experimental utilizado na técnica GAS _____	20
Figura 2.4 - Aparato experimental utilizado na técnica SAS ou ASES _____	22
Figura 2.5 - Aparato experimental utilizado na técnica PCA e SEDS _____	24
Figura 2.6 - Bocal contendo três passagens coaxiais _____	25

CAPÍTULO 3

Figura 3.1 – Micrografias de MEV das partículas do β -caroteno não processado com ampliação de 2000 vezes _____	39
Figura 3.2 – Micrografia eletrônica de varredura do PHBV não processado com ampliação de 50 vezes _____	39
Figura 3.3 – Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para a realização dos experimentos de precipitação _____	41
Figura 3.4 – Dispersão do jato da solução no tubo capilar (diâmetro interno de 100 μ m) _____	45
Figura 3.5 – Tubos capilares conectados aos <i>PEEK Tubing</i> _____	46
Figura 3.6 – Fotografia mostrando as duas câmaras de precipitação conectadas a todas as linhas da unidade experimental _____	47
Figura 3.7 – Vista detalhada da unidade experimental de precipitação/encapsulamento _____	50
Figura 3.8 – Vista geral da unidade experimental de precipitação/encapsulamento _____	50

CAPÍTULO 4

Figura 4.1 - Tamanho médio das partículas de PHBV em função da pressão de precipitação _____	67
Figura 4.2 - Gráfico de pareto apresentando o efeito da pressão sobre o tamanho médio das partículas de PHBV precipitadas a partir do planejamento sequencial avaliando a faixa de pressão entre 80 e 200 bar _____	67
Figura 4.3 - Micrografias de MEV das partículas de PHBV precipitadas com base no planejamento sequencial. Condição experimental A: 80 bar (ampliação de 8000x); condição experimental B: 120 bar (ampliação de 8500x); condição experimental C: 160 bar (ampliação de 8000x) e, condição experimental D: 200 bar (ampliação de 9000x) _____	69
Figura 4.4 - Tamanho médio das partículas precipitadas em função da pressão e concentração de β -caroteno: ● 4 mg.ml ⁻¹ ; ▲ 8mg.ml ⁻¹ _____	73
Figura 4.5 - Gráfico de pareto apresentando o efeito da concentração de solução e pressão sobre o tamanho médio das partículas de β -caroteno precipitadas a partir do planejamento sequencial avaliando a faixa de pressão entre 80 e 120 bar _____	74
Figura 4.6 - Gráfico de pareto apresentando o efeito da concentração de solução e pressão sobre o tamanho médio das partículas de β -caroteno precipitadas a partir do planejamento sequencial avaliando a faixa de pressão entre 160 e 200 bar _____	75
Figura 4.7 - Micrografias de MEV das partículas de β -caroteno precipitadas com 4 mg.ml ⁻¹ . Condição experimental A: 80 bar (ampliação de 2500x); condição experimental B: 120 bar (ampliação de 100x); condição experimental C: 160 bar _____	

(ampliação de 75x) e, condição experimental D: 200 bar (ampliação de 110x)	76
Figura 4.8 - Micrografias de MEV das partículas de β -caroteno precipitadas com 8 mg.ml ⁻¹ . Condição experimental A: 80 bar (ampliação de 6500x); condição experimental B: 120 bar (ampliação de 85x); condição experimental C: 160 bar (ampliação de 90x) e, condição experimental D: 200 bar (ampliação de 130x)	77
Figura 4.9 - Micrografias de MEV das partículas de β -caroteno precipitadas com base no planejamento seqüencial em função da pressão e concentração da solução. Condição experimental A: 80 bar e 4 mg.ml ⁻¹ (ampliação de 2500x); condição experimental B: 80 bar e 8 mg.ml ⁻¹ (ampliação de 8500x); condição experimental C: 120 bar e 4 mg.ml ⁻¹ (ampliação de 100x) e, condição experimental D: 120 bar e 8 mg.ml ⁻¹ (ampliação de 85x)	79
Figura 4.10 - Micrografias de MEV das partículas de β -caroteno precipitadas com base no planejamento seqüencial em função da pressão e concentração da solução. Condição experimental A: 160 bar e 4 mg.ml ⁻¹ (ampliação de 75x); condição experimental B: 160 bar e 8 mg.ml ⁻¹ (ampliação de 90x); condição experimental C: 200 bar e 4 mg.ml ⁻¹ (ampliação de 110x) e, condição experimental D: 200 bar e 8 mg.ml ⁻¹ (ampliação de 130x)	80
Figura 4.11 - Micrografias de MEV comparativas das partículas de PHBV precipitadas. Condição experimental: Secagem padrão (q_a : 20 mL.min ⁻¹ ; volume de CO ₂ : 2000 mL) ampliação de 7000x; Secagem rápida (q_a : 30 mL.min ⁻¹ ; volume de CO ₂ : 1500 mL) ampliação de 1400x e Secagem lenta (q_a : 10 mL.min ⁻¹ ; volume de CO ₂ : 2500 mL) ampliação de 1200x	84
Figura 4.12 - Micrografias de MEV comparativas das partículas de β -caroteno precipitadas. Condição experimental: Secagem padrão (q_a : 20 mL.min ⁻¹ ; volume de CO ₂ : 2000 mL) ampliação de 7000x; Secagem rápida (q_a : 30 mL.min ⁻¹ ; volume de CO ₂ : 1500 mL) ampliação de 1400x e Secagem lenta (q_a : 10 mL.min ⁻¹ ; volume de CO ₂ : 2500 mL) ampliação de 1200x	85
Figura 4.13 - Percentual de encapsulamento em função do tempo de ultra-som	87
Figura 4.14 - Percentual de encapsulamento em função do tempo de ultra-som	88
Figura 4.15 - Curva padrão de absorbância de β -caroteno em 460 nm em função da sua concentração em diclorometano	92
Figura 4.16 - Gráfico comparativo da eficiência de encapsulamento em função da concentração de β -caroteno nas micropartículas co-precipitadas e submetidas à agitação magnética por 20 e 300 segundos	94
Figura 4.17 - Eficiência de encapsulamento em função da concentração de β -caroteno nas micropartículas co-precipitadas e submetidas a agitação manual por 20 segundos	95
Figura 4.18 - Gráfico comparativo da eficiência de encapsulamento em função da concentração de β -caroteno nas micropartículas co-precipitadas e submetidas a agitação magnética por 20 e 300 segundos	96
Figura 4.19 - Micrografias de MEV (ampliação de 2000x) das micropartículas co-precipitadas de acordo com as condições do experimento E8 e submetidas ao processo de lavagem (20 segundos) para remoção do material não-encapsulado	99
Figura 4.20 - Micrografias de MEV das micropartículas co-precipitadas de acordo com as condições do experimento E7 e submetidas ao processo de lavagem (20 segundos) para remoção do material não-encapsulado: a) ampliação de 1000x e b) ampliação de 2000x	100
Figura 4.21 - Micrografias de MEV (ampliação de 2000x) das micropartículas co-precipitadas de acordo com as condições do experimento E6 e submetidas ao processo de lavagem (20 segundos) para remoção do material não-encapsulado: a) ampliação de	

1700x e b) ampliação de 2000x	101
Figura 4.22 – Comportamentos de dissolução <i>in vitro</i> das partículas de β-caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em acetato de etila na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; ▲, E7; ■, E6; ◆, E5)	103
Figura 4.23 – Comportamentos de dissolução <i>in vitro</i> das partículas de β-caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em acetato de etila na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; ▲, E7; ■, E6; ◆, E5)	104
Figura 4.24 – Comportamentos de dissolução <i>in vitro</i> das partículas de β-caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em n-hexano na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; ▲, E7; ■, E6; ◆, E5)	105
Figura 4.25 – Comportamentos de dissolução <i>in vitro</i> das partículas de β-caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em n-hexano na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; ▲, E7; ■, E6; ◆, E5)	106
Figura 4.26 - Perfis de liberação <i>in vitro</i> das partículas de β-caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em etanol anidro na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; ▲, E7; ■, E6; ◆, E5)	107
Figura 4.27 - Perfis de liberação <i>in vitro</i> das partículas de β-caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em etanol anidro na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; ▲, E7; ■, E6; ◆, E5)	109
Figura 4.28 - Perfis de liberação <i>in vitro</i> das partículas de β-caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em etanol anidro na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; —, concentração máxima)	110
Figura 4.29 - Perfis de liberação <i>in vitro</i> das partículas de β-caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em solução tampão fosfato (pH 7,4) na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; ▲, E7; ◆, E5)	113
Figura 4.30 – Perfis de liberação <i>in vitro</i> das partículas de β-caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução na temperatura de 40 °C e 80 rpm para o experimento E8: em hexano: ■, concentrações iniciais (ver Tabela 4.12); ▲, réplicas; em acetato de etila: ●, concentrações iniciais (ver Tabela 4.10); ◆, réplica	115

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 - Materiais precipitados através das técnicas GAS, SAS, PCA, SEDS e ASES _____

26

Tabela 2.2 - Resumo das técnicas de formação de partículas usando fluidos pressurizados _____

27

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 - Solubilidade de β -caroteno em diversos solventes e desvio padrão das medidas experimentais _____

58

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1 - Condições experimentais do planejamento sequencial e tamanho das partículas de PHBV puro precipitadas _____

66

Tabela 4.2 - Condições experimentais do planejamento sequencial e tamanho das partículas de β -caroteno puro precipitadas _____

71

Tabela 4.3 - Planejamento sequencial de secagem das micropartículas de β -caroteno e PHBV _____

83

Tabela 4.4 - Condições experimentais de encapsulamento de β -caroteno em PHBV empregando diclorometano como solvente orgânico e CO₂ como anti-solvente _____

90

Tabela 4.5 - Valores de concentração de β -caroteno em diclorometano e absorbância média (obtida por triplicatas de medidas) em espectro de UV-VIS a 460 nm, utilizados para a construção da curva de calibração _____

91

Tabela 4.6 - Resultados do percentual real de encapsulamento (PRE) e eficiência de encapsulamento (EE) da co-precipitação de β -caroteno e PHBV utilizando diclorometano como solvente e CO₂ como anti-solvente: pressão de 80 bar, temperatura de 40 °C, vazão de anti-solvente de 40 mL.min⁻¹ e vazão de solução de 1 mL.min⁻¹, concentração de PHBV na solução de 30 mg.ml⁻¹ _____

93

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Gerais

ASES: Sistema de Extração de Solvente em Aerosol;
CS = Concentração da Solução (mg/ml);
CV = Coeficiente de Variação;
DTP: Distribuição de Tamanho de Partícula (μm);
EE: Eficiência de Encapsulamento;
GA: Goma Arábica;
GAS: Processo Gás Anti-Solvente;
HPLC/CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
IDMC: indometacina;
LCME: Laboratório Central de Microscopia Eletrônica;
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura;
MP: Morfologia da Partícula;
P = Pressão (bar);
PCL: poli ϵ -caprolactona;
PHBV: poli (3-hidroxi-butarato-co-hidroxi-valerato);
PLLA/PLGA: poli ácido-l-lático/poli ácido-lático-co-ácido glicólico;
PRE: Percentual Real de Encapsulamento (%);
PTE = Percentual Teórico de Encapsulamento;
PTFE: politetrafluoretileno;
 q_a = Vazão de adição de anti-solvente (CO_2) (ml/min);
 q_s = Vazão de adição da solução (ml/min);
R = Coeficiente de regressão;
SAS: Anti-Solvente Supercrítico;
SEDS: Dispersão de Solução Expandida pelo Fluido Supercrítico;
T = Temperatura ($^{\circ}\text{C}$);
TP: Tamanho da Partícula (μm);
UV = Ultravioleta;
X = Valor médio da resposta X;

Subscritos

c = Propriedade crítica;

Símbolos Gregos

σ = Desvio padrão;

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 – Carotenóides	9
2.2 – Precipitação e encapsulamento de partículas	12
2.2.1 – Formação de partículas empregando fluidos pressurizados como anti-solventes	17
2.2.1.1 - <i>Processo Gás Anti-Solvente (GAS)</i>	19
2.2.1.2 - <i>Sistema de Extração de Solvente em Aerosol (ASES) ou Anti-Solvente Supercrítico (SAS)</i>	21
2.2.1.3 - <i>Dispersão de solução expandida pelo fluido supercrítico (SEDS e PCA)</i>	23
2.3 – Sistemas de liberação	28
2.4 – Considerações a respeito do estado da arte	33
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 - Caracterização das partículas	37
3.2 – Materiais	38
3.3 - Metodologia Experimental	40
3.3.1 - Aparato Experimental	40
3.3.2 - Procedimento experimental	51
3.3.3 - Determinação do percentual de encapsulamento	56
3.3.3.1 - <i>Quantificação de β-caroteno encapsulado através de espectrometria na região de UV-VIS</i>	56

3.2.4 – Comportamentos de Liberação <i>in vitro</i> de β -caroteno encapsulado em PHBV_____	60
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO_____	63
4.1 - Seleção das Variáveis_____	63
4.2 - Precipitação do PHBV puro_____	65
4.3 - Precipitação de β -caroteno puro_____	70
4.4 – Influência das condições de secagem_____	81
4.5 – Encapsulamento de β -caroteno em PHBV_____	86
4.6 – Comportamentos de liberação <i>in vitro</i> das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV_____	102
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS_____	117
5.1 – Conclusões_____	117
5.2 - Sugestões para trabalhos futuros_____	120
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS_____	123

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O campo da nanotecnologia e de nanomateriais vem ganhando rápido desenvolvimento entre os diversos setores da economia mundial, impulsionado pela competição por produtos de alta qualidade oriunda das rígidas exigências dos consumidores. Neste sentido, destaca-se a produção de materiais sólidos com propriedades e características específicas em vários segmentos, como os de catalisadores, precursores de supercondutores, explosivos, corantes alimentícios e fármacos, entre outros (Martín *et al.*, 2007).

Em particular na indústria de alimentos, formulações na faixa micrométrica e/ou nanométrica vêm sendo utilizadas para aumentar a vida de prateleira de alimentos perecíveis bem como incorporar vitaminas e compostos nutracêuticos a fim de oferecer um produto diferenciado no mercado e que possibilite ações benéficas à saúde humana, como anti-hipertensiva, antimicrobiana, antioxidante ou antiinflamatória (Herrero *et al.*, 2006).

Um dos produtos com grande uso alimentício são os carotenóides, considerados compostos nutracêuticos e presentes em vários grupos na natureza. Segundo Rodriguez-Amaya (1985), existem mais de 600 tipos de carotenóides, entretanto, apenas 50 a 60 destes estão presentes nos alimentos. Além de atuarem como precursores de vitamina A e antioxidantes podem levar a uma diminuição do risco de câncer. Sua aplicação na reposição da cor perdida em alimentos durante o processamento e armazenamento é altamente desejável em diversos

produtos industrializados, bem como a presença de compostos químicos importantes que conferem aroma, fragrâncias e fotoproteção, a fim de manter e/ou realçar suas características particulares (Sánchez-Contreras *et al.*, 2000). Porém, especificamente no caso dos carotenóides, o uso de técnicas que possibilitem a formação de materiais micro ou nano particulados com grandes áreas superficiais, característica destes materiais, influencia diretamente na sua degradação, pois os mesmos são suscetíveis a influências externas como calor, luz, ácidos, oxidação enzimática e não-enzimática, presença de oxigênio e enzimas, metais e o emprego de altas temperaturas (Schroeder e Johnston, 1995).

Algumas técnicas tradicionais para a formação de partículas são comumente utilizadas, tais como, a moagem ultrafina, *spray drying*, liofilização e precipitação com anti-solventes líquidos. Estas técnicas convencionais de produção de materiais na faixa nanométrica e/ou micrométrica, além de não permitirem o controle de tamanho das partículas formadas, associam-se ao uso de solventes orgânicos que conduzem a índices residuais elevados necessitando de etapas de pós-processamento, além de serem suspeitas de conferir toxicidade ao produto final. Adicionalmente, resultam na perda significativa da atividade biológica devido às altas temperaturas empregadas, tornando-as pouco atrativas para a precipitação de compostos termossensíveis (He *et al.*, 2007). Estes fatos podem limitar seu uso uma vez que a funcionalidade e as propriedades de aplicação de um material micro ou nanoparticulado são altamente dependentes do tamanho da partícula (TP), da distribuição de tamanho de partícula (DTP) e da morfologia da partícula (MP) (Lin *et al.*, 2007).

Desta forma, torna-se necessário o aprimoramento de técnicas que proporcionem a máxima ação e proteção destes materiais. Uma das formas de promover maior estabilidade a compostos que possuem princípio ativo com relevante aplicação em diferentes segmentos industriais é através do seu encapsulamento, onde geralmente emprega-se um biopolímero como agente encapsulante. Basicamente, o encapsulamento ocorre quando o material a ser encapsulado é posto em suspensão em uma solução polimérica e então o polímero dissolvido é precipitado recobrando o material em suspensão (Kalogiannis *et al.*, 2006).

Dentre os materiais comumente usados como agentes encapsulantes (ácido poliláctico, policaprolactona, polietilenoglicol, poliidroxibutirato) pode-se destacar o PHBV (poli 3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato), um poliéster biocompatível e biodegradável produzido por bactérias durante a etapa de fermentação em processo biotecnológico (Lee *et al.*, 1999). O poli (hidroxibutirato) e seus copolímeros, como o (HBHV), têm sido usados para desenvolver sistemas de administração de substâncias ativas de interesse em diversos segmentos industriais, devido às suas propriedades físico-químicas e biocompatibilidade (Pouton e Akhtar, 1996).

Pelas técnicas clássicas para a precipitação de partículas e encapsulamento de compostos bioativos, além de não se obter um controle de tamanho e morfologia das partículas, constata-se baixa eficiência na etapa de encapsulamento. Em contrapartida, a necessidade de adotar processos de fabricação ambientalmente aceitáveis, os denominados processos “verdes” ou tecnologias “limpas”, tem sido objeto de estudo para o desenvolvimento de novos processos e materiais

nos últimos anos. Portanto, é importante que técnicas alternativas sejam desenvolvidas com o objetivo de suprir as limitações provenientes dos métodos convencionais, promovendo a precipitação e encapsulamento de materiais sólidos com características controladas (tamanho e distribuição de tamanho, morfologia e estrutura cristalina).

Diversas técnicas e metodologias alternativas são encontradas para a precipitação de materiais incluindo princípios ativos e biopolímeros, como o emprego de fluidos pressurizados como solvente, como soluto, ou como anti-solvente. Dependendo da configuração do processo algumas vantagens advindas do emprego de fluidos em estado sub ou supercrítico podem ser citadas, tais como: alta pureza dos produtos, controle do polimorfismo dos cristais, possibilidade de processar moléculas termossensíveis, processo em um único estágio e ambientalmente aceitável (Fages *et al.*, 2004). Em paralelo, desde a década de 50, o dióxido de carbono (CO₂) vem sendo estudado continuamente por apresentar-se como atóxico, não inflamável, ambientalmente aceitável, de baixo custo, além de não deixar resíduos tóxicos no produto final (Beckman, 2004). Outro ponto favorável para o emprego do CO₂ é que o mesmo apresenta temperatura e pressão críticas relativamente baixas ($T_c = 31,1 \text{ }^\circ\text{C}$; $P_c = 73 \text{ bar}$), fatores relevantes para reduzir custos operacionais e a degradação térmica de compostos bioativos.

Especificamente para o processo que emprega fluidos pressurizados como anti-solvente, podem-se obter partículas na escala nanométrica ou micrométrica com estreita distribuição de tamanho, além de altas porcentagens de encapsulamento (Kalogiannis *et al.*, 2006). A literatura científica reporta estudos que indicam a possibilidade

de utilização desta técnica para precipitação e encapsulamento de diversos materiais (Hanna, 1998; Reverchon, 1999; Cocero e Ferrero, 2002; Chen *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007; Franceschi, 2009).

Uma vez obtido o princípio ativo e posteriormente encapsulado, torna-se necessário o conhecimento do seu comportamento de dissolução, a fim de auxiliar na escolha do material encapsulante, bem como na otimização das variáveis envolvidas tanto no processo de precipitação dos componentes puros quanto na etapa de encapsulamento. Trabalhos recentes mostram que, além de obter partículas com características desejáveis (grau de cristalinidade, morfologia, pureza, teor residual de solvente) e altos índices de encapsulamento, a possibilidade de obter o máximo controle e informação sobre a liberação do princípio ativo e sua biodisponibilidade vem ganhando pronunciada atenção. Estes dois temas referem-se às informações acerca do comportamento de liberação do princípio ativo fazendo com que se evitem potenciais de super ou sub-dosagem, e a medida na qual este princípio ativo é absorvido e se torna disponível no local de ação, respectivamente (Wang *et al.*, 2006; Majerik *et al.*, 2007).

Frente ao exposto, constata-se que através do emprego da tecnologia supercrítica na precipitação de micropartículas e seu posterior encapsulamento em biopolímero (PHBV) obtém-se um maior controle das características como a porosidade, a morfologia e o tamanho médio das partículas, importantes no desenvolvimento de sistemas carreadores de substâncias ativas, constituindo uma perspectiva interessante no estudo de sistemas de liberação controlada.

Desta forma, esta tese teve como objetivo principal estudar o processo de encapsulamento de β -caroteno em PHBV utilizando dióxido

de carbono pressurizado como anti-solvente avaliando, posteriormente, o comportamento de liberação *in vitro* das partículas.

Os objetivos específicos do presente trabalho foram assim dispostos:

- 1) Estudo do efeito das variáveis de processo nas características das partículas de β -caroteno e PHBV, puras e co-precipitadas, empregando dióxido de carbono pressurizado como anti-solvente;
- 2) Otimização da etapa de secagem de ambos os materiais precipitados;
- 3) Caracterização das partículas de β -caroteno e PHBV através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para determinar a morfologia, área superficial e diâmetro médio de partículas, servindo como base para a etapa de encapsulamento;
- 4) A partir dos resultados obtidos no item 3, determinar as melhores condições experimentais para realizar a etapa de encapsulamento, enfatizando o estudo do efeito da relação em massa entre o β -caroteno e PHBV, avaliando o percentual real e eficiência de encapsulamento;
- 5) Determinação dos comportamentos de liberação *in vitro* de β -caroteno através das micropartículas encapsuladas em PHBV submetidas à diferentes meios de dissolução.

A seqüência deste trabalho está estruturada em Capítulos da seguinte forma:

- *Capítulo 2*: apresenta-se a revisão bibliográfica a respeito dos materiais empregados para o desenvolvimento desta tese (β -caroteno e PHBV). Na seqüência, são abordados os métodos que empregam CO_2 como anti-solvente na precipitação e

encapsulamento de diversos materiais, bem como outras técnicas atualmente propostas na literatura científica que utilizam a tecnologia supercrítica para a formação de partículas. Finalizando este Capítulo, destacam-se as metodologias utilizadas para determinação do percentual de encapsulamento e perfis de liberação.

- *Capítulo 3:* nesta seção é apresentado o desenvolvimento experimental proposto, incluindo a utilização dos materiais, equipamentos e os procedimentos adotados em todas as etapas do estudo para a obtenção dos resultados desta tese.
- *Capítulo 4:* são apresentados e discutidos os resultados tanto para a etapa de precipitação dos componentes puros e encapsulamento do β -caroteno em PHBV quanto para a etapa de liberação da substância ativa nos diferentes meios de dissolução propostos.
- *Capítulo 5:* apresentam-se as conclusões desta tese de doutorado com base nos resultados obtidos no Capítulo 4 e as sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – CAROTENÓIDES

Os carotenóides apresentam funções biológicas e relacionadas com a saúde que despertam interesse generalizado em diversos setores. Ressalta-se que a fortificação vitamínica de alguns alimentos para a adequação das quantidades ingeridas é de fundamental importância para o bom funcionamento do organismo humano. Tal fato associa-se, em termos nutricionais, ao papel biológico que as vitaminas apresentam. Em especial, destaca-se a vitamina A, que é um nutriente essencial para o organismo com ação na visão, no crescimento dos ossos, na diferenciação celular, na mobilização do ferro no organismo e na reprodução e integridade do sistema imunológico (Silva, 1994).

De acordo com a fonte de dieta, os alimentos podem ser classificados em: ricos em vitamina A ou retinol, também chamados de vitamina A pré-formada (leites e derivados, ovos, carnes vermelhas, aves, peixes e óleos) e alimentos fonte de provitamina A referente aos carotenóides, que são precursores biologicamente ativos (frutas, vegetais e folhas escuras) (Booth *et al.*, 1992). Dentre os carotenóides, o mais importante é o β -caroteno, cuja fórmula estrutural plana é apresentada na Figura 2.1. Entretanto, os carotenos são encontrados em várias outras formas como o α -caroteno e as α e β -criptoxantinas, as quais apresentam metade da atividade do β -caroteno (McCance e Widdowson, 1994). De

carotenóides são precursores de vitamina A, ou seja, dentre os mais de 400 carotenóides existentes, apenas 50 a 60 destes podem ser teoricamente convertidos em vitamina A (Rodriguez-Amaya, 1985). Ainda, cerca de 10 a 50 % do β -caroteno total consumido é absorvido no trato gastrointestinal e é parcialmente convertido em vitamina A dentro da parede intestinal (Martini, 2002). Em função disso, além dos alimentos, o β -caroteno pode ser encontrado em forma de medicamentos como suplemento vitamínico A, sendo comercializado tanto na forma livre quanto na forma de ésteres: acetato, palmitato ou propionato, a fim de completar a recomendação vitamínica diária necessária.

Em síntese, a biodisponibilidade dos carotenóides é influenciada por fatores como a espécie do caroteno, a ligação molecular, a quantidade ingerida e a matriz na qual o carotenóide é incorporado. Em termos farmacológicos, a biodisponibilidade de um princípio ativo pode ser conceituada como a taxa e o grau de absorção do composto proveniente de uma forma de dosagem. Em contrapartida, as propriedades de aplicação e a intensidade da coloração de sistemas pigmentados são fortemente dependentes das propriedades físicas do pigmento tais como tamanho, distribuição de tamanho e morfologia de partícula, bem como a maneira que os pigmentos são obtidos (Suo *et al.*, 2005; Reverchon *et al.*, 2008).

Franceschi (2009) cita os trabalhos de Qing *et al.* (2002) e Chang *et al.* (1991) nos quais os autores relatam que diferentemente dos carotenóides sintéticos, os obtidos de fontes naturais (microorganismos e natureza) são facilmente oxidados e seus produtos de oxidação possuem pouca ou quase nenhuma pigmentação, atividade provitamina

A e atividade de seqüestro de oxigênio singlete. Tal fato se dá devido à alta taxa de insaturação provocada por fatores como presença de oxigênio e de enzimas, metais, antioxidantes, alta temperatura, fazendo com que ocorra a isomerização dos carotenóides *trans*, que é a forma mais estável na natureza para a forma *cis*, promovendo ligeira perda de cor e atividade pró-vitamínica. (Schroeder e Johnston, 1995).

Neste contexto e frente às importantes aplicações dos carotenóides tanto na indústria de alimentos (como por exemplo, sua utilização como composto de proteção à oxidação de produtos industrializados) quanto no seu uso farmacêutico (como rico fortificante vitamínico A) surge à necessidade do estudo de técnicas que permitam um controle efetivo sobre as propriedades de aplicação a fim de obter o máximo aproveitamento de suas características em ambas as áreas.

2.2 – PRECIPITAÇÃO E ENCAPSULAMENTO DE PARTÍCULAS

Os diversos setores industriais buscam incessantemente melhorar a qualidade dos seus produtos, o que necessariamente passa pelo conhecimento, domínio e aprimoramento das técnicas de produção. Do ponto de vista tecnológico, são conhecidas e propostas algumas técnicas tradicionais para a precipitação de partículas na ordem nanométrica e/ou micrométrica, tais como o *spray drying*, recristalização por solvente orgânico e liofilização. Segundo Hong *et al.* (2000) e Lin *et al.* (2007), o tamanho de partícula (TP), a distribuição de tamanho de partícula (DTP), a morfologia da partícula (MP) e configuração da rede cristalina são as variáveis que influenciam diretamente na funcionalidade e nas propriedades de aplicação destes materiais micro ou nanoparticulados.

Ao utilizar as técnicas citadas acima, além da ausência de controle do tamanho e distribuição das partículas, bem como o uso excessivo de solventes orgânicos, que acarretam em grandes concentrações residuais no produto final, pode-se acrescentar como pontos desfavoráveis os altos custos de operação, a necessidade de etapas pós-processamento e a degradação térmica e química do soluto. De fato, além destas peculiaridades inerentes às técnicas, o uso em grandes quantidades de solvente na etapa de precipitação acarreta em etapas adicionais que podem inviabilizar o processo de produção de partículas (Reverchon, 2002).

Em se tratando de materiais precipitados na ordem micrométrica, devido à alta área superficial característica destas partículas, surge a necessidade de promover sua proteção frente a fatores externos que possam degradá-los, como por exemplo a temperatura, a presença de oxigênio e exposição a luz. Esta etapa de proteção pode dar-se através do encapsulamento do(s) princípio(s) ativo(s) utilizando biopolímeros como agentes encapsulantes, os quais além do papel de proteção definem a forma de liberação do princípio ativo, se através de difusão (pelos poros ou cadeias do polímero) ou por erosão (dada quando o polímero degrada dentro da matriz alimentícia, resultado de processos biológicos naturais) (Wang *et al.*, 2006). Nesta etapa, a formação de micro ou nanocápsulas, é realizada através de duas maneiras: ocorrendo a formação de uma fina camada de polímero recobrimdo o composto ou pela co-precipitação do polímero, onde várias partículas do composto encontram-se inseridas no interior da matriz polimérica.

Polímeros biodegradáveis têm sido avaliados visando aumentar o número de materiais biocompatíveis para aplicações específicas nas áreas farmacêutica, alimentícia e médica (Maia *et al.*, 2004). Entre eles, destacam-se os poliésteres termoplásticos de origem bacteriana como o poli (hidroxibutirato) (PHB) e poli (3-hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV). As estruturas químicas do PHB e do PHBV são muito similares aos polímeros sintéticos biodegradáveis mais usuais, porém são degradados em uma taxa geralmente mais lenta. O PHB é produzido como material de reserva energética por fermentação de uma variedade de cepas bacterianas, destacando-se a *Ralstonia eutropha* e a *Burkholderia saccharina*. É um poliéster isotático, semicristalino, com grande potencial como polímero biodegradável de alto consumo. A sua degradação ocorre por erosão da superfície, o que torna o PHB um material atrativo para a aplicação na liberação controlada de compostos bioativos. Além disso, a liberação de princípios ativos com baixa massa molar, a partir do PHB e PHBV, pode se processar pela penetração de água e pela formação de poros nas matrizes poliméricas (Pouton e Akhtar, 1996).

Na literatura científica são apresentadas diversas técnicas para a precipitação de diferentes materiais incluindo princípios ativos e biopolímeros, dentre as quais destaca-se o emprego de fluidos pressurizados como solvente, como soluto, ou como anti-solvente. Estes fluidos, em estado sub ou supercríticos, fornecem partículas na ordem nanométrica ou micrométrica com estreita distribuição de tamanho além de altas porcentagens de encapsulamento (Kalogiannis *et al.*, 2006).

O trabalho de Hannay e Hogarth em 1879 pode ser considerado uns dos primeiros estudos na área de nanotecnologia referente ao

emprego de fluidos pressurizados para a formação de partículas, uma vez que os autores relataram a formação de “neve” através da expansão de uma solução binária. Trabalhos mais recentes mostram a possibilidade da utilização da tecnologia supercrítica na obtenção de materiais sólidos micro ou nanoparticulados de interesse em indústrias de alimentos, químicas e farmacêuticas. Benedetti *et al.* (1997) apresentaram um estudo sobre duas técnicas para formação de micropartículas de um polissacarídeo natural utilizando fluidos supercríticos. Em ambos os métodos foram produzidas partículas menores do que 20 μm e os autores constataram que, de acordo com a metodologia empregada, diferentes propriedades de partículas puderam ser obtidas.

Em 2004, Reverchon e Spada ao avaliarem a possibilidade de produzir micropartículas de eritromicina através de atomização com fluidos supercríticos, estudaram a influência sobre a morfologia, o tamanho e distribuição de partícula, bem como o uso de diferentes solventes líquidos (metanol, etanol, acetona). Os autores não constataram degradação e encontraram poucos traços residuais destes solventes nas micropartículas de eritromicina formadas. He *et al.* (2006) ao estudarem a eficiência da etapa de atomização, pureza e influência das variáveis de operação no processo de formação de micropartículas de carotenóides naturais com CO_2 supercrítico, verificaram que pequenas e estreitas partículas de carotenóides podem ser obtidas de acordo com a metodologia empregada.

Em 2007, Bahrami e Ranjbarian apresentaram uma revisão sobre a produção de micro e nano-compostos utilizando dióxido de carbono

supercrítico. Franceschi *et al.* (2009a e 2009b) estudaram a precipitação e encapsulamento de β -caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica constatando a viabilidade técnica do processo para posterior aplicação em produtos alimentícios com o intuito de aumentar a vida de prateleira de diversos produtos e proteger compostos termosensíveis frente à degradação.

Embora poucos trabalhos apresentem estudos referentes a alimentos ou ingredientes alimentícios (dextrana, β -caroteno, lecitina, sacarose), Weidner (2009) concluiu que os processos que utilizam fluidos pressurizados como anti-solvente apresentam grande potencial industrial, não somente para polímeros, mas também para a área alimentícia. De fato, em 2007 foi colocada em operação na Alemanha uma planta industrial com capacidade de 200 kg de CO₂ por hora para produção de lecitina em pó através de um processo que utiliza anti-solvente modificado. A lecitina primária é obtida durante o processo de purificação do óleo de soja e contém cerca de 60 % de fosfolipídios e 40 % de óleo. Esta mistura inicialmente líquida e com o óleo tendo uma função de solvente no processo é pulverizada através de um bico de aspersão em um vaso de pressão com CO₂ supercrítico. Este anti-solvente dissolve o óleo e a lecitina precipita-se em forma de pó, sendo removida posteriormente por meio de um sistema acoplado, enquanto o CO₂ e o óleo dissolvido são retirados e expandidos em um separador onde o óleo é coletado na forma líquida e o CO₂ é reciclado (Weidner, 2009).

A seguir são apresentadas em detalhes as diferentes técnicas de precipitação e encapsulamento de diversos materiais empregando CO₂ como anti-solvente.

2.2.1 – Formação de Partículas Empregando Fluidos Pressurizados Como Anti-solventes

Neste processo, o fluido pressurizado ou supercrítico é usado como anti-solvente, causando a precipitação do substrato dissolvido inicialmente em um solvente líquido. Diferentes siglas são utilizadas para esta categoria, como GAS, SAS, SEDS e ASES, porém cada tipo de processo distingue-se pela maneira como ocorre o contato entre a solução orgânica e o anti-solvente comprimido.

O princípio básico das técnicas anti-solvente reside no fato de que o soluto seja completamente miscível no solvente orgânico e imiscível ou muito pouco miscível no anti-solvente e, ainda, que o solvente orgânico possua maior afinidade pelo anti-solvente do que pelo soluto. Assim, quando a solução contendo o soluto é posta em contato com o anti-solvente, a solubilidade do soluto no solvente orgânico é drasticamente reduzida, devido ao anti-solvente causar um decréscimo no poder de solvatação do solvente orgânico levando a precipitação do soluto na forma particulada (Yeo e Kiran, 2005; Jung e Perrut, 2001; (Tai e Cheng, 1998). Um esquema geral das técnicas que empregam anti-solvente na formação de partículas (GAS, SAS, PCA, SEDS e ASES) é apresentado na Figura 2.2.

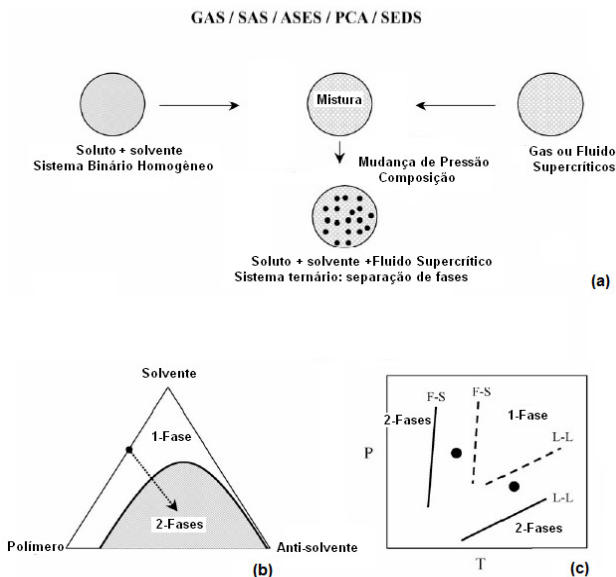


Figura 2.2 - Esquema e princípio governante geral das técnicas (GAS, SAS, PCA, SEDS e ASES) que utilizam anti-solvente para a formação de partícula. Fonte: Yeo e Kiran, 2005.

Nas técnicas que utilizam fluidos pressurizados como anti-solvente para a formação de partículas dispõe-se, inicialmente, de um sistema binário homogêneo formado pelo soluto e pelo solvente (Figura 2.2.a). Após a introdução do anti-solvente (gás ou fluido em estado supercrítico), ocorre a formação de uma mistura, bem como desvios das linhas de coexistência das fases fluido-sólida (F-S) e líquido-líquido (L-L) para altos valores de pressões e temperaturas, respectivamente (Figura 2.2 c). Como resultado desta mudança de pressão, temperatura e composição, o sistema que se situava inicialmente em região de única fase encontra-se sobre a região de duas fases onde a separação de fases é possível, permitindo assim a formação de partículas (Figura 2.2 b).

Uma discussão detalhada acerca da inter-relação entre o comportamento de fases e a formação de nano/micro partículas via tecnologia supercrítica pode ser encontrada nos trabalhos de Franceschi (2006, 2009), Franceschi *et al.* (2008), Yeo e Kiran (2005), Jung e Perrut (2001).

2.2.1.1 - Processo Gás Anti-Solvente (GAS)

A técnica de precipitação de materiais denominada Gás Anti-Solvente (GAS) foi primeiramente descrita por Gallagher *et al.* (1989). Um esquema do aparato experimental utilizado nesta técnica é apresentado na Figura 2.3 (Jung e Perrut, 2001). Este método caracteriza-se como um processo em batelada ou descontínuo e mostra-se adequado para o uso com polímeros, uma vez que os mesmos são pouco solúveis em fluidos supercríticos ou gases (Yeo e Kiran, 2005). Neste processo, a solução previamente preparada é introduzida em uma câmara de precipitação (normalmente de aço inox) com temperatura controlada. Em seguida, o anti-solvente é adicionado ou borbulhado pelo fundo desta câmara através de um filtro dispersor a uma taxa constante pré-estabelecida, na temperatura em que a operação deve ser realizada até que a pressão alcance o valor final acarretando na expansão da solução líquida. Para o processo de limpeza do solvente orgânico, uma válvula de saída é aberta e o anti-solvente puro é adicionado dentro da câmara de precipitação, mantendo a pressão e temperatura constantes. Por fim, ocorre a despressurização da câmara e a retirada do material formado (Jung e Perrut, 2001).

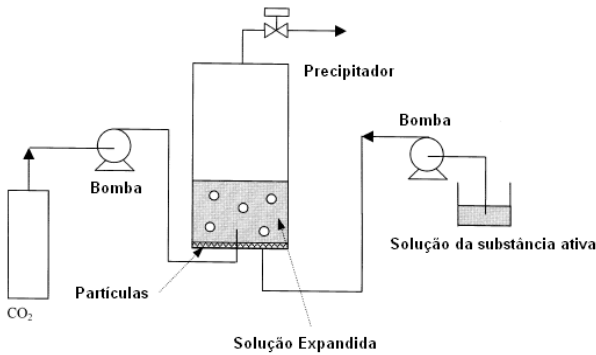


Figura 2.3 - Aparato experimental utilizado na técnica GAS. Fonte (Jung e Perrut, 2001).

Neste método o anti-solvente não necessita estar em condições supercríticas, porém sua adição leva a um decréscimo na densidade da mistura e no poder de solvência do solvente orgânico, acarretando na supersaturação da solução líquida, tendendo conseqüentemente a formar partículas com estreita distribuição de tamanho (Shariati e Peters, 2003). Um critério importante que deve ser levado em consideração no processo GAS é que o anti-solvente deve ser altamente solúvel no solvente orgânico a fim de promover a precipitação, ao passo que o soluto apresenta-se insolúvel ou muito pouco solúvel no anti-solvente (Tai e Cheng, 1998).

2.2.1.2 - Sistema de Extração de Solvente em Aerosol (ASES) ou Anti-Solvente Supercrítico (SAS)

As técnicas ASES e SAS apresentam mecanismo de contato entre anti-solvente e solução diferentes da técnica GAS, além de serem

consideradas o modo contínuo da mesma. Para melhor compreensão, considera-se técnica SAS quando o anti-solvente estiver em estado supercrítico e ASES quando o mesmo estiver em estado subcrítico. A Figura 2.4 apresenta um diagrama esquemático do aparato experimental utilizado nos processos SAS ou ASES.

Como mostrado na Figura 2.4, a solução e o anti-solvente são adicionados simultaneamente à câmara de precipitação em modo concorrente, através de bocais diferentes, ou em modo contracorrente, com a solução adicionada à câmara de precipitação já contendo o anti-solvente, resultando na supersaturação de gotículas líquidas e na precipitação instantânea do soluto como finas partículas dentro da câmara (Shariati e Peters, 2003). Para que ocorra a formação de tais partículas, a solução é injetada a uma pressão de 20 bar superior à pressão de operação da câmara. As partículas formadas são recolhidas em um filtro na parte inferior da câmara; o solvente e o anti-solvente são continuamente adicionados na câmara. Ainda, pode ser usado um segundo vaso, em seqüência do precipitador, operando a baixas pressões com o objetivo de recuperar o solvente utilizado. Ao se atingir uma quantidade pré-determinada de solução a ser precipitada, a adição é interrompida e o anti-solvente continua a fluir por mais algum tempo visando a secagem das partículas geradas, retirando todo o solvente orgânico presente no meio, impedindo a coalescência e a perda das características originais das partículas. Por fim, é realizada a despressurização da câmara de precipitação e a retirada do material precipitado (Jung e Perrut, 2001).

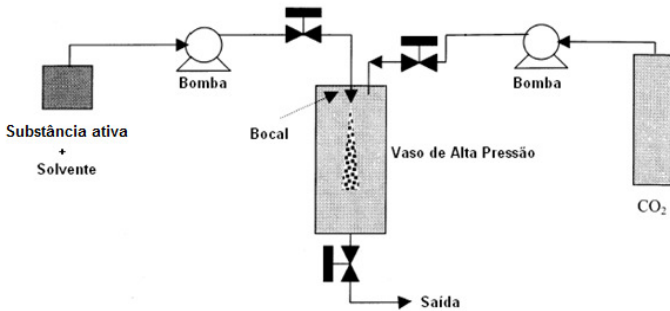


Figura 2.4 - Aparato experimental utilizado na técnica SAS ou ASES. Fonte (Jung e Perrut, 2001).

Uma vantagem especial destas técnicas é a sua adaptabilidade para operação contínua, importante para produção em larga escala de partículas. Nos últimos anos, foram introduzidas algumas alterações ao processo SAS a fim de melhorar o seu desempenho na produção de nanopartículas ou adaptar este processo para materiais solúveis em água. A este respeito, em 2001, Chattopadhyay e Gupta alteraram o procedimento de atomização do processo SAS, adicionando uma superfície vibratória que trabalhava em frequências de ultra-sons atomizando um jato de solução, a fim de produzir nanopartículas. O comportamento ultra-sônico aumentou a turbulência e mistura dentro das gotículas de solução e do anti-solvente, resultando em alta transferência de massa entre as fases líquidas e gás.

2.2.1.3 - Dispersão de Solução Expandida pelo Fluido Supercrítico (SEDS e PCA)

Este processo é uma versão modificada da técnica SAS e a diferença entre ambos os métodos é a forma de contato entre a mistura binária soluto-solvente e da solução anti-solvente é diferente. A Figura 2.5 apresenta um diagrama esquemático de um aparato experimental que emprega ambas as técnicas, PCA e SEDS. Na técnica PCA proposta em 1992 por Dixon (ver Figura 2.5), a câmara de precipitação é carregada com o anti-solvente comprimido e a solução contendo o material a ser precipitado é aspergida para o interior da câmara contendo o anti-solvente. Quando todo o material tiver sido aspergido no anti-solvente, a aspersão desta é interrompida e inicia-se a passagem de anti-solvente pela câmara de precipitação realizando a secagem das partículas.

Na técnica SEDS, a solução contendo a substância a ser precipitada e o anti-solvente comprimido são aspergidos através de um único bocal para a câmara de precipitação já contendo o anti-solvente pressurizado. Uma câmara de pré-mistura da solução a ser precipitada e do anti-solvente é posicionada antes do dispositivo de aspersão na câmara de precipitação. Ainda, esta aspersão pode ser realizada simultaneamente através de bocais coaxiais que provocam rápida transferência de massa e proporcionam condições uniformes de cristalização. O contato espontâneo da corrente de alta velocidade da solução líquida e do fluido supercrítico gera a mistura finamente dispersa e uma precipitação rápida da partícula. Como na técnica GAS e SAS, o princípio básico aqui é induzir o solvente à separação de fases (Yeo e Kiran, 2005).

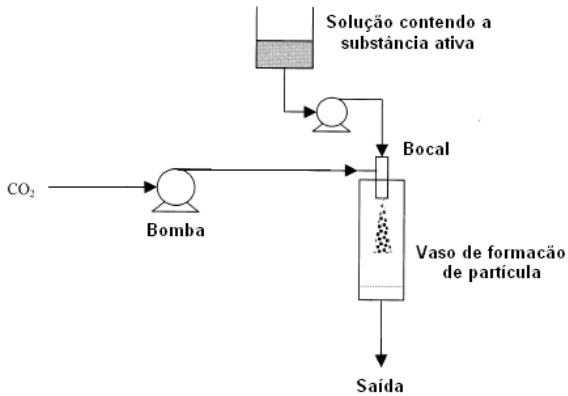


Figura 2.5 - Aparato experimental utilizado na técnica PCA e SEDS. Fonte (Jung e Perrut, 2001).

Diversos dispositivos e formas de aspersão têm sido propostos na literatura (Yeo e Kiran, 2005), pois estes afetam o tamanho das gotículas, a taxa de extração do solvente pelo anti-solvente, influenciando assim a morfologia das partículas formadas. Um exemplo é apresentado pela Figura 2.6 onde o esquema de aspersão da solução e do anti-solvente consiste na co-introdução através de um bocal com três passagens coaxiais dentro do vaso de formação de partículas, composto de: uma solução ou suspensão da substância ativa no solvente 1; um solvente 2 miscível com solvente 1 e solúvel no fluido supercrítico; e por fim um fluido supercrítico.

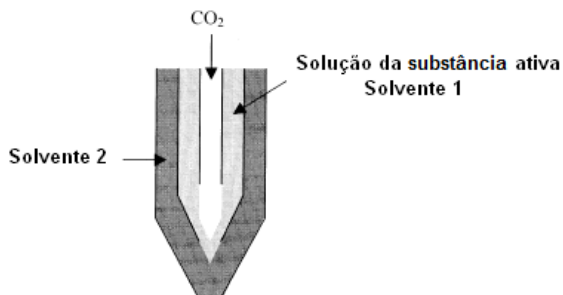


Figura 2.6 - Bocal contendo três passagens coaxiais. Fonte: Yeo e Kiran, 2005.

Na literatura podem ser encontrados vários trabalhos referentes ao emprego da técnica anti-solvente para a precipitação de materiais a condições ambiente com utilização em diversos segmentos. A Tabela 2.1 apresenta os resultados obtidos em tais pesquisas nas quais foram empregados os métodos PCA, GAS, SEDS, ASES e SAS utilizando o CO_2 como anti-solvente. Por fim, na Tabela 2.2, é apresentado um resumo das técnicas de formação de partículas empregando fluidos pressurizados.

Tabela 2.1 - Materiais precipitados através das técnicas GAS, SAS, PCA, SEDS e ASES.

Soluto (Solvente)	Técnica	Observações	Referência
Éster de ácido pectínico (DMSO)	GAS	Tamanho de partículas: 0,7µm	Pallado (1996)
PLGA (Acetona)	GAS	Tamanho de partículas: 50 nm	Dilloy <i>et al.</i> (1997)
β-caroteno (AcOET, DCM)	GAS	Tamanho de partícula: 2 a 5 µm ou maiores do que 5 µm dependendo da condição experimental	Cocero e Ferrero (2002)
		Partículas na forma de bastões com tamanho variando entre 5 e 50 µm. Modificação na estrutura cristalina interna comparado ao material não-processado	Chen <i>et al.</i> (2005)
Poliacrilonitrila (DMF)	ASES	Formação de microfibrilas	Johnston <i>et al.</i> (1994)
Brometo de Ipatropium (DMF, EtOH, ACE)	ASES	Partículas não aglomeradas, com formato elíptico e com tamanho médio variando entre 0,6 a 3,0 µm	Kim e Shing (2007)
Poliestireno (Tolueno)	ASES	Tamanho de partículas: 0,1 a 20 µm	Dixon (1993)
Amoxicilina (NMP)	ASES	Tamanho de partículas: 0,2 a 0,8 µm	Reverchon (1999)
Pigmento Bixina (DCM)	SEDS	Partículas com formato de agulhas e em alguns casos coalescidas no formato de rede com tamanho de 0,2 x 2 a 1,2 a 16 µm	Suo <i>et al.</i> (2005)
Caroteno Natural (DCM)	SEDS	Tamanho de partículas: 0,37 a 2,7 µm	He <i>et al.</i> (2006)
Poliestireno (Tolueno)	SEDS	Tamanho de partículas: 0,5µm	Hanna (1998)
Teofilina (EtOH-DCM)	SEDS	Partículas com tamanho médio de 1 µm	Franceschi <i>et al.</i> (2008)

β -caroteno (DCM)	SEDS	Partículas com tamanho médio de 3,2 μm	Franceschi <i>et al.</i> (2009a)
β -caroteno (DCM)	SEDS	Partículas com tamanho médio de 3,8 μm	Franceschi <i>et al.</i> (2009b)
Teofilina (DCM, EtOH)	SAS	Partículas em formato de placas com tamanho de 15 a 500 μm	Subra <i>et al.</i> (2005)
Licopeno (DCM)	SAS	Partículas em formato de agulhas com tamanho de 10 a 80 μm dependendo das condições experimentais	Miguel <i>et al.</i> (2006)
Ampicilina (NMP)	SAS	Partículas em formato de esferas com tamanho de 99 a 395 nm em diferentes graus de aglomeração	Reverchon <i>et al.</i> (2007)
PHBV	SAS	Partículas em formato de esferas com tamanho de 3 a 9 μm	Costa <i>et al.</i> (2007)
Cloroeto de N-trimetilquitosana (DMSO)	PCA	Partículas na forma de esferas com diâmetro variando de 1 a 10 μm	Pérez de Diego <i>et al.</i> (2006)
Ácido Salicílico (EtOH e ACE)	PCA	Partículas com tamanho de 100 nm	Lin <i>et al.</i> (2007)

Abreviaturas: DMSO: Dimetilsulfóxido; DCM: diclorometano; EtOH: etanol; ACE: Acetona; NMP: N-metilpirrolidona; DMF: Dimetilformamida.

Tabela 2.2 - Resumo das técnicas de formação de partículas usando fluidos pressurizados.

Processo	Função do Fluido Supercrítico	Função do Solvente Orgânico	Modo de Separação de Fases
RESS	Solvente	Co-solvente	Indução através de pressão e temperatura
GAS	Anti-solvente	Solvente	Indução através de solvente
SAS	Anti-solvente	Solvente	Indução através de solvente
SEDS	Anti-solvente/Agente dispersante	Solvente/não-solvente	Indução através de solvente
PGSS	Soluto		Indução através de pressão, temperatura e solvente

Fonte: adaptado de Yeo e Kiran (2005).

2.3 – SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

De acordo com Embleton e Tighe (2002), partículas na ordem micrométrica ou microcápsulas são atraentes veículos para fins de liberação de substâncias ativas de interesse por facilitar a liberação de macromoléculas aprisionadas via mecanismo de difusão aquosa sem depender da degradação do polímero. Nesse aspecto, microesferas biodegradáveis têm sido amplamente investigadas como sistemas de liberação de compostos bioativos, tais como agentes terapêuticos de baixa massa molar ou macromoleculares, antígenos e DNA. Indicadas para a administração pulmonar, oral ou nasal, as microesferas são capazes de promover uma liberação sustentada ou controlada de um composto bioativo, enquanto que o material não-liberado permanece protegido da degradação e da metabolização fisiológica (Freitas *et al.*, 2005).

Embleton e Tighe (2002) mencionam ainda que, em se tratando particularmente de microesferas de PHBV, é difícil o alcance de uma rápida liberação devido à estabilidade hidrolítica destes polímeros. Em contrapartida, processos que possibilitem um controle sobre a porosidade deste material seriam particularmente atraentes, permitindo liberar o princípio ativo encapsulado de acordo com o número, o tamanho, a profundidade e a tortuosidade dos poros do polímero. Outra vantagem dos polímeros PHBV em relação a outros polímeros biodegradáveis é a taxa de degradação mais lenta, o que ajudaria a evitar problemas como o acúmulo de produtos ácidos e diminuição do pH, característicos da rápida degradação.

Na literatura são encontrados alguns trabalhos que reportam comportamentos de liberação de princípios ativos de interesse em várias aplicações industriais. Em 2005, Soottitawat *et al.* investigaram o microencapsulamento de *l*-mentol em goma arábica (GA) e amido modificado (HI-CAP 100 e CAPSUL), bem como suas características de liberação (sabor) através do processo de atomização (*spray drying*). Os autores verificaram que a umidade relativa e a temperatura são os parâmetros do processo que exercem influência significativa, ou seja, a taxa de liberação é aumentada após a elevação da umidade relativa e da temperatura. Para elevados valores de atividade de água ocorreu uma maior absorção de água pelo polímero resultando em danos à sua estrutura e conseqüentemente maior dissolução e liberação do *l*-mentol a partir da matriz polimérica.

Com relação aos materiais estudados, verificaram que, em alta atividade de água o amido modificado CAPSUL apresentou uma menor taxa de liberação em comparação ao amido HI-CAP 100 e a goma arábica, devido ao fato deste absorver menor quantidade de água do que os outros citados. Para a análise da liberação, focada principalmente nas características de sabor do *l*-mentol, uma determinada amostra do pó obtido na atomização era pesada, espalhada em finas camadas e posteriormente colocada em frascos de vidro de 15 mL. Os recipientes eram então colocados em dessecador contendo solução saturada de sal a fim de manter a umidade relativa constante ($8\pm 5\%$, $33\pm 5\%$, $51\pm 5\%$, $75\pm 5\%$, e $83\pm 5\%$) e temperatura controlada de 30 °C. Utilizaram também um método para acelerar a liberação de *l*-mentol e, em intervalos de 6 h era realizada uma purga de ar contendo umidade igual

à umidade relativa do experimento. Em intervalos pré-determinados, os frascos foram retirados do dessecador e a quantidade residual de *l*-mentol no pó era medida pelo método de extração com solvente. A retenção de *l*-mentol no experimento de liberação foi expressa em relação ao conteúdo inicial.

Lionzo *et al.* (2007) estudaram a influência das concentrações de poli (ϵ -caprolactona - PCL) e poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) como agentes encapsulantes do acetato de dexametasona preparadas através do processo convencional por emulsão/evaporação de solvente. Os resultados demonstraram que o perfil de liberação do princípio ativo pode ser modulado pela variação entre as concentrações das micropartículas formadas a partir do PCL e PHBV. Em síntese, o aumento da concentração de PCL na mistura aumentou a taxa de liberação do princípio ativo e seu mecanismo de liberação foi dependente da presença do PCL nas micropartículas.

Para a determinação dos perfis de liberação, uma quantidade de material microencapsulado era adicionada em frascos protegidos da luz e sob agitação contendo uma solução tampão fosfato (pH 7,4) na temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. Em tempos pré-determinados, alíquotas eram retiradas, filtradas e analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 242 nm. Procedimento semelhante é descrito por Lin *et al.* (2000) no estudo do comportamento de dissolução *in vitro* de micropartículas de diclofenaco sódico encapsuladas em poliésteres com diferentes massas moleculares. Os perfis de dissolução foram determinados em *shaker* a 20 rpm, onde uma determinada quantidade das microesferas encapsuladas era suspensa em 50 mL de uma solução tampão fosfato (pH 7,4) na temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. O diclofenaco

sódico residual e liberado era periodicamente determinado por espectrofotômetro a 276 nm.

Em 2008, Kang *et al.*, realizaram um estudo concernente à preparação, caracterização e citotoxicidade *in vitro* das micropartículas de indometacina (IDMC) encapsulada em poli ácido-l-láctico/poli ácido-láctico-co-ácido glicólico (PLLA/PLGA) utilizando dióxido de carbono supercrítico como anti-solvente e observaram uma liberação inicial de 11,85 % em 30 minutos seguido pela liberação cumulativa de 83,67 % após 30 dias. Os autores indicaram que a IDMC livre atingiu rapidamente o patamar de saturação (48,95 %) em 4 h, enquanto que as amostras contendo IDMC encapsulado apresentaram um baixo *burst* inicial (por *burst*, entenda-se aquelas partículas fracamente ligadas ao material encapsulado, apresentando liberação imediata), não excedendo a liberação de IDMC livre após 48 horas.

Os autores concluíram que os perfis ocorrem em duas etapas, sendo a primeira dada pela liberação da substância através de sua difusão seguida da degradação polimérica posteriormente. Ainda, a proporção entre PLLA e PLGA, cristalinidade e peso molecular do polímero, e tamanho de partícula de micropartículas também têm efeitos sobre a degradação do polímero e taxa de liberação da droga. Os perfis de liberação foram determinados como segue: vinte microgramas de amostra do material encapsulado foi alocado em sacos de diálise pré-tratados e estes colocados em um recipiente contendo uma solução tampão fosfato (pH 6,8) sob agitação e temperatura de 37 °C. Alíquotas da solução eram periodicamente removidas e a concentração de IDMC era analisada por espectrofotômetro a 320 nm. A fim de manter o

volume de solução original, a mesma quantidade retirada para análise era imediatamente recolocada.

Em 2009, Chong *et al.* avaliaram os perfis de liberação de nanopartículas de paracetamol (acetaminophen) encapsuladas em um copolímero de acrilato e metacrilato utilizando a técnica que emprega fluido supercrítico como anti-solvente e verificaram que a liberação do princípio ativo encapsulado foi mais lenta em relação ao paracetamol não-processado, constatando que o polímero empregado age como uma barreira à liberação da substância. Os perfis de liberação *in vitro* do paracetamol não-processado e encapsulado foram determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde uma amostra de ambos os materiais era colocada separadamente em 100 mL de solução tampão (pH 7,4), agitadas a 50 rpm à 37 °C.

Leimann *et al.* (2009) estudaram o microencapsulamento de óleo essencial de capim-limão utilizando o processo de coacervação simples e obtiveram microcápsulas com tamanhos no intervalo de 10 a 250 µm constatando que este processo de microencapsulamento não deteriora o óleo essencial encapsulado com relação à composição e atividade biológica, porém dependendo da condição experimental, microcápsulas de até 1 mm foram formadas. A liberação do óleo essencial foi obtida através da hidrodestilação das microcápsulas em aparelho do tipo Clevenger onde inicialmente as microcápsulas foram filtradas sob vácuo, lavadas triplamente com água destilada e uma vez com etanol para retirada do óleo essencial que não tinha sido microencapsulado. Em intervalos determinados de tempo a quantidade de óleo essencial era mensurada em uma balança repetindo-se o procedimento até que não fosse observada mais extração de óleo das microcápsulas.

Wang *et al.* (2009) investigaram o comportamento das microesferas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) como material encapsulante de dois compostos modelos (*p*-nitroanilina e rodamina B) com diferentes solubilidades em água, preparados pelo método de emulsão/evaporação de solvente. Os testes foram realizados em solução tampão (pH 7,4) e mantidos na temperatura de 37 °C e indicaram que ambos os princípios ativos (*p*-nitroanilina and rodamina B) apresentaram uma liberação acumulativa de aproximadamente 80 % após 5 dias. Os autores concluem que a poli (ϵ -caprolactona) (PCL) tem um comportamento semelhante ao poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV), pois ambos podem ser considerados como polímeros relativamente hidrofóbicos e esta maior afinidade entre o princípio ativo e o agente encapsulante causa uma forte tendência para que a incorporação seja mais eficiente aumentando o seu tempo de liberação.

2.4 – CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

Segundo alguns autores, um futuro promissor está reservado para a área alimentícia e nutracêutica na produção de compostos de ordem nano/micrométrica com alto valor agregado e pureza. Através dos processos de produção convencionais, verificou-se que as limitações que os mesmos possuem muitas vezes restringem seu uso, em virtude de grandes quantidades de solventes empregadas ou por não haver um controle adequado sobre a morfologia, o tamanho e as características das partículas precipitadas, necessárias para determinar sua funcionalidade e

aplicabilidade. Em contrapartida, as técnicas que empregam fluidos pressurizados como anti-solvente mostraram, através de diversos estudos, que é possível o controle efetivo das propriedades de interesse, porém, é necessário o máximo de informações a respeito das variáveis envolvidas no processo.

Em se tratando da área de carotenóides, há uma gama de oportunidades para ser estudada frente às suas importantes características de aplicação, porém na literatura científica, poucos trabalhos foram encontrados. Ainda, para que as características destes materiais possam ser alcançadas, surge a alternativa de realizar seu encapsulamento, protegendo-os, de certa forma, da degradação. Alguns trabalhos sobre a precipitação destes materiais puros são encontrados na literatura, como os de He *et al.* (2006), Miguel *et al.* (2006) e Cocero e Ferrero (2002), focados principalmente no estudo das variáveis de processo a fim de obter partículas com tamanhos característicos. Já trabalhos como o de Martin *et al.* (2007) e Franceschi *et al.* (2009a) mencionam, além da etapa de precipitação dos componentes puros, o encapsulamento de carotenóides em biopolímeros utilizando a técnica que emprega fluidos pressurizados como anti-solventes.

A leitura do estado da arte neste campo revela que o foco principal está voltado para as etapas de precipitação e encapsulamento, baseados principalmente nas características dos materiais formados. Entretanto, uma visão mais ampla deve ser almejada, obtendo-se informações das etapas iniciais do processo de precipitação, encapsulamento e principalmente como estas influenciam na liberação do princípio ativo em questão. O contexto de liberação de micropartículas de carotenóides encapsulados em biopolímeros

apresenta-se ainda bastante incipiente em toda a literatura, não tendo sido encontrado nenhum trabalho elaborado por esta técnica de produção.

Em paralelo, nenhuma técnica é utilizada como padrão na determinação dos perfis de liberação, adotando-se para cada material precipitado, referências que apresentem adequação à substância em estudo. Apenas os trabalhos de Weidner (2009), Leimann *et al.* (2009), Kang *et al.* (2008), Lionzo *et al.* (2007), Soottitawat *et al.* (2005), Lin *et al.* (2000) e Chong *et al.* (2009) relatam técnicas pontuais para análise de liberação aplicadas a outros compostos microencapsulados via processos convencionais. Soppimath *et al.* (2001), em uma revisão sobre nanopartículas poliméricas biodegradáveis como dispositivo de liberação de drogas, enfatizam que diversos métodos na literatura são propostos para determinar os perfis de liberação de substâncias ativas, tais como: células de difusão com membrana artificial ou biológica, ultra-centrifugação e ultra-filtração. Entretanto, além dos contínuos esforços nesta área, existem algumas dificuldades técnicas para o estudo de liberação *in vitro* envolvendo nanopartículas, tais como: condições e determinação dos perfis de liberação, definição dos meios de estudo e o aparato experimental adequado.

Dentro deste contexto, fica evidente que a utilização de fluidos pressurizados como anti-solvente na precipitação e encapsulamento de princípios ativos em biopolímeros mostra-se como uma tecnologia bastante atraente, uma vez que é possível obter produtos praticamente livres de solvente orgânico evitando etapas pós-processamento bem como um controle mais eficiente do TP, DTP e MP. Outro fato

importante são as futuras aplicações dos carotenóides tanto na área farmacêutica (como fortificante vitamínico A) quanto na área alimentícia (pigmentos, corantes ou como alimento funcional, dado pela adição de composto nutracêutico). Entretanto, é de fundamental importância a disponibilidade de informação acerca da liberação destas substâncias e como os parâmetros do processo de encapsulamento influenciam nesta questão. Tendo-se em mãos um panorama geral de liberação que explore as principais variáveis envolvidas, podem-se determinar as melhores condições experimentais com o objetivo de proporcionar a liberação desejada e controlada do caroteno.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentadas as especificações dos materiais e a metodologia detalhada sobre o emprego do dióxido de carbono pressurizado como anti-solvente para a realização dos experimentos de precipitação de β -caroteno e PHBV puros utilizando diclorometano como solvente orgânico bem como a etapa posterior de encapsulamento. Na seqüência, apresenta-se a metodologia/técnica utilizada para determinar a eficiência de encapsulamento, bem como para avaliar os comportamentos de liberação do β -caroteno.

3.1 - CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

As análises necessárias para a obtenção das micrografias do β -caroteno e PHBV não-processados, precipitados e co-precipitados foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina. Para tal, foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) com filamento de tungstênio marca JEOL, modelo JSM-6390LV. As amostras precipitadas foram manualmente dispersas sobre fitas condutoras dupla-face dispostas em porta-amostra de alumínio, recobertas com uma fina camada de ouro utilizando um aparelho metalizador e então analisadas.

A partir das micrografias de MEV, procedeu-se a determinação do tamanho das partículas de β -caroteno e PHBV utilizando o *software*

Size Meter versão 1.1 (desenvolvido por Luiz Henrique Castelan Carlson sob orientação de Ariovaldo Bolzan), onde foram avaliados os resultados da medida da maior dimensão, em termos de comprimento e espessura, de aproximadamente 100 partículas para cada condição experimental. Adotou-se como critério de avaliação apenas a espessura das partículas, com seus respectivos desvios padrão e variâncias, ou seja, por tamanho médio, entende-se então aquele referente à espessura das partículas. Em paralelo, a morfologia das partículas foi avaliada por observação visual das micrografias de MEV de todas as condições experimentais.

3.2 - MATERIAIS

Os reagentes utilizados neste trabalho foram: dióxido de carbono (White Martins S.A., pureza de 99,8 %), diclorometano (Merck, pureza de 99,5 % em fase líquida), *Trans*- β -caroteno (Sigma-Aldrich, pureza aproximada de 95 %) e o copolímero, poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) com massa molar média (MW) de 196.000 Da e índice de poli dispersão de 1,85, gentilmente cedido pela empresa PHB Industrial S/A. Ressalta-se que todos estes materiais foram utilizados como recebidos, sem qualquer tratamento prévio e foram armazenados em condições e local apropriados para que não sofressem qualquer tipo de alteração por interferência de luz, calor e umidade. As Figuras 3.1 e 3.2 apresentam, respectivamente, as micrografias de MEV do β -caroteno e do PHBV não-processados.

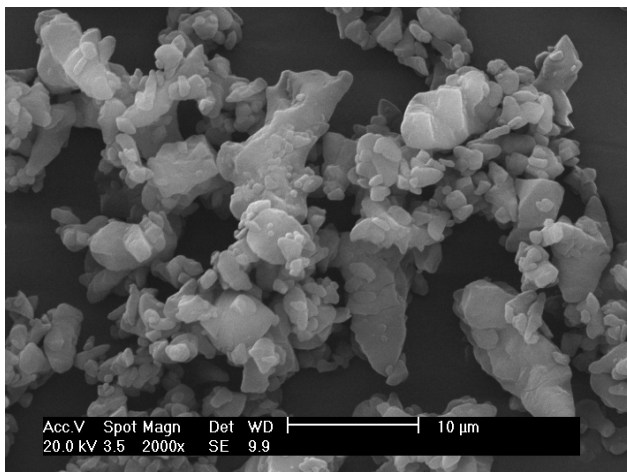


Figura 3.1 – Micrografias de MEV das partículas do β -caroteno não-processado com ampliação de 2000 vezes.

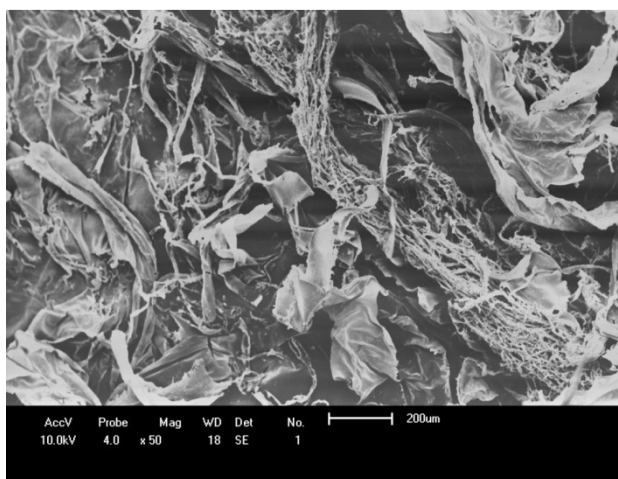


Figura 3.2 – Micrografia eletrônica de varredura do PHBV não processado com ampliação de 50 vezes.

Através das Figuras 3.1 e 3.2 é possível constatar as diferenças visuais entre as morfologias das partículas não processadas: para o β -caroteno encontrou-se partículas do tipo placas, bem como uma pronunciada irregularidade relacionada ao tamanho das partículas puras, e para o polímero não-processado, fica evidente a formação de estrutura fibrosa. Ainda, pela Figura 3.1 e através do *software Size Meter* versão 1.1 foi possível calcular o valor representativo do tamanho médio das partículas de β -caroteno não processado, o qual foi de 4,6 μm .

3.3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.3.1 - Aparato Experimental

Para a realização dos experimentos de precipitação foi utilizada a técnica que emprega fluidos pressurizados como anti-solventes. O aparato experimental foi utilizado por Franceschi (2006) para recristalização de teofilina e por Franceschi *et al.* (2009) para a precipitação e encapsulamento de β -caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica. A Figura 3.3 apresenta um diagrama esquemático do aparato experimental utilizado, o qual consiste dos seguintes itens:

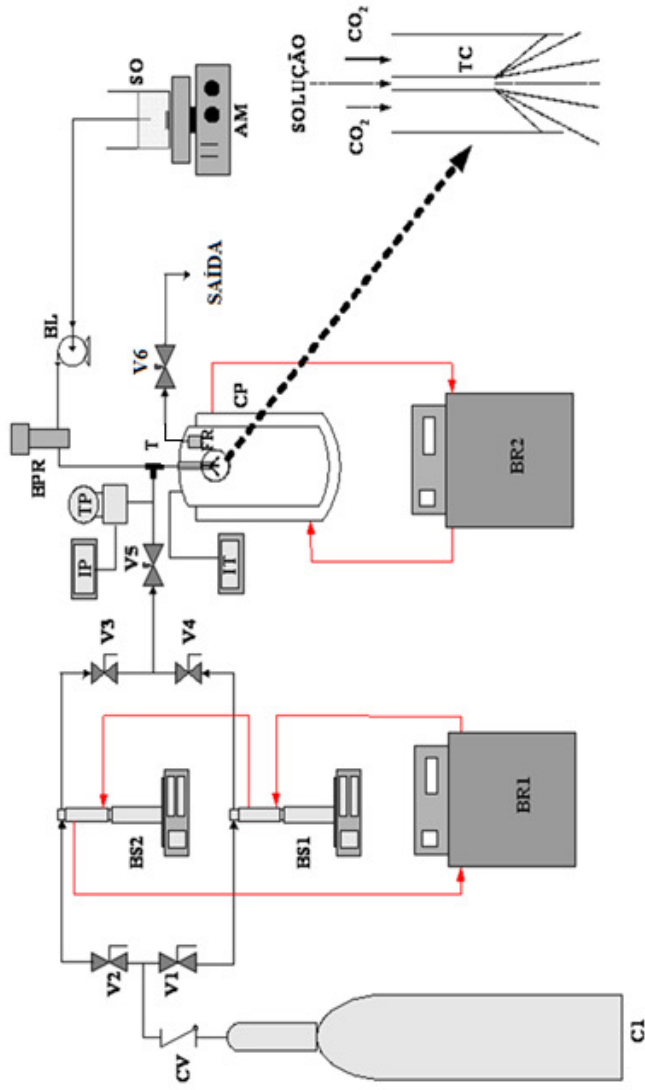


Figura 3.3 – Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para a realização dos experimentos de precipitação e encapsulamento.

C1 – Cilindro de CO₂. Armazenamento do fluido empregado como anti-solvente nos experimentos de precipitação.

CV – Válvula de uma via (*Check-Valve* Marca HIP, Modelo 15-41AF1-T, Pressão de operação até 1034 bar). Este tipo de válvula permite a vazão em um único sentido. É utilizada entre o cilindro e as válvulas V1 e V2 para impedir que uma sobrecarga de pressão seja aplicada na “cabeça” do cilindro de armazenamento.

V1, V2, V3 e V4 – Válvulas de Esfera (Marca Swagelok, Modelo SS-83KS4, Pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente). Quando abertas, as válvulas V1 e V2 permitem a vazão de anti-solvente para as bombas de alta pressão, e as válvulas V3 e V4 das bombas para a câmara de precipitação. O objetivo das válvulas V1 e V2 é separar as duas bombas, evitando que a pressão de trabalho em uma bomba interfira na pressão de trabalho da outra bomba, possibilitando que as mesmas operem independentemente. As válvulas V3 e V4 têm por função isolar a linha das bombas até a câmara de precipitação. Como se trabalha com uma bomba por vez, quando a válvula V3 está aberta, permitindo a vazão de anti-solvente de uma das bombas para a câmara, a válvula V4 está fechada e vice-versa.

BR1 – Banho Ultratermostático de Recirculação 1 (Marca Nova Ética, Modelo 521/2D). Utilizado para manter a temperatura constante nos cilindros das bombas.

BS1 e BS2 – Bombas de Alta Pressão (ISCO 500D). Os experimentos de precipitação empregando anti-solventes pressurizados são comumente realizados com vazão contínua e constante do anti-solvente a pressão constante. É necessário então um equipamento que satisfaça estas condições. As bombas do tipo seringa se encaixam neste

contexto, pois permitem que se opere a vazão constante ou a pressão constante. Neste trabalho foram utilizadas duas bombas de seringa (Marca ISCO, Modelo 500D) que possuem um cilindro interno com capacidade de 506 mL, pressão de trabalho de até 258 bar e vazão máxima de 170 mL.min⁻¹.

V5 – Válvula métrica tipo agulha (Marca HIP, Modelo 15-11AF1, pressão de operação até 1034 bar). O objetivo desta válvula é controlar a vazão de anti-solvente das bombas para a câmara de precipitação. Esta válvula permite uma abertura gradual possibilitando uma regulação fina da vazão.

TP – Transdutor de Pressão (Marca SMAR, Modelo LD 301). É conectado à linha entre a válvula **V5** e a câmara de precipitação para monitorar a pressão no interior desta. Foi utilizado um transdutor de pressão absoluto com faixa de operação de 0 – 250 bar para medida da pressão do sistema. De acordo com especificação de fábrica, a precisão do equipamento é de 0,125% da faixa operacional (0,31 bar).

IP – Indicador Universal (Marca NOVUS, Modelo N1500). Os valores de pressão são coletados em um indicador universal que recebe um sinal digital do **TP** indicando a pressão na câmara de precipitação e na linha até a válvula **V5**.

AM – Agitador Magnético (Marca Velp Científica). O sistema de agitação tem como objetivo manter a solução orgânica sob agitação permanente durante a realização dos experimentos. Para tal foi inserido dentro do frasco que contém a solução uma barra magnética de agitação. Este sistema de agitação possui acoplado a ele um sistema de aquecimento o que permite manter a solução à temperatura constante pré-especificada.

SO – Solução Orgânica. Solução na qual o sólido a ser precipitado é dissolvido em um solvente orgânico.

BL – Bomba de HPLC Digital Série III (Marca Acuflo). Bomba utilizada para deslocar a solução orgânica para a câmara de precipitação. Este tipo de bomba possui um único pistão que permite operar com vazão constante ($0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) tendo uma precisão de $\pm 0,2\%$ sobre toda a faixa de operação. A pressão de trabalho varia de 0 a 414 bar com precisão de $\pm 2 \%$.

BPR – Válvula de regulação de Pressão (*Back Pressure Regulator*, Marca GO-Regulator, Série BP-66, Modelo 1A11QE151). Esta válvula permite que se realize a regulação da pressão desde a bomba de HPLC até ela independentemente da vazão, permitindo assim uma pressão maior anterior a ela e menor depois dela. É construída em aço inox 316L com uma porta de entrada e uma de saída. Segundo o fabricante, o controle de pressão é ajustável na faixa de 0 a 690 bar, com faixa de temperatura de operação entre -40 e 176°C . A pressão na porta de entrada que é regulada por esta válvula é monitorada no visor do painel da bomba de HPLC.

T – Conexão tipo T (Marca Swagelok). União do tipo T, à qual estão conectadas a linha de anti-solvente e a linha da solução. A linha da solução que vai da **BPR** até esta união é constituída por um tubo de polieterecetonona (*PEEK Tubing*) marca Upchurch Scientific, com diâmetro interno de 0,254 mm. Até esta união o anti-solvente e a solução fluem por linhas separadas e a partir dela até a câmara de precipitação pertencem à mesma linha, porém a solução escoar por dentro do tubo capilar e o anti-solvente escoar por fora do tubo capilar e por dentro do tubo de aço inox com diâmetro interno de 1,587 mm.

TC – Tubo Capilar de Sílica Fundida. A função deste tubo é fazer com que ocorra a dispersão do jato da solução dentro da câmara de precipitação como pode ser visualizado na (Figura 3.4). O tubo capilar é conectado ao *PEEK Tubing* em uma extremidade da união T, passando por dentro deste. A outra extremidade do tubo capilar é inserida na câmara de precipitação. O diâmetro interno do tubo capilar utilizado neste trabalho foi de 100 μm e a Figura 3.5 apresenta dois modelos de tubos capilares conectados aos seus respectivos *PEEK Tubing*.

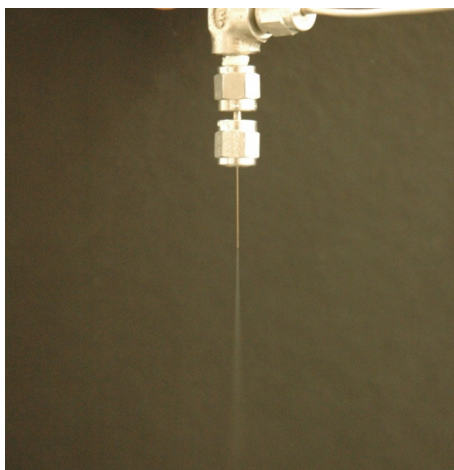


Figura 3.4 – Dispersão do jato da solução no tubo capilar (diâmetro interno de 100 μm).

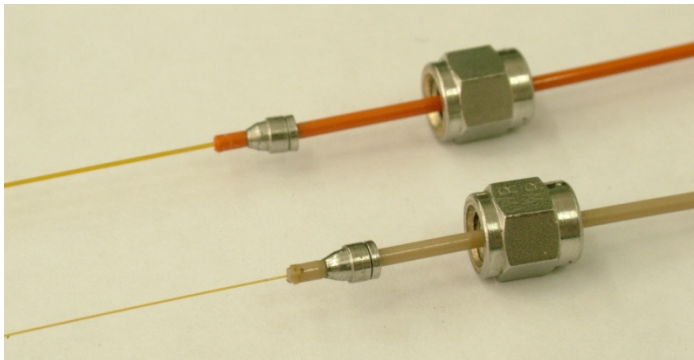


Figura 3.5 – Tubos capilares conectados aos *PEEK Tubing*.

IT – Indicador de Temperatura (Indicador Universal, Marca NOVUS, Modelo N1500) É um conjunto composto por um sensor de temperatura (Pt-100) e um indicador de temperatura usado para medir o valor real da temperatura no interior da câmara de precipitação.

CP – Câmara de Precipitação. Foi utilizada uma câmara cilíndrica de aço inox 316 encamisada, com volume útil de aproximadamente 600 mL (diâmetro interno de 8 cm e altura de 12 cm). A pressão e temperatura máximas de trabalho são, respectivamente, 400 bar e 150°C. A câmara possui cinco entradas na tampa, uma central para a adição da solução orgânica e do anti-solvente e quatro periféricas, três para a inserção do sensor de temperatura, sensor de pressão e saída do anti-solvente e solvente orgânico e a quarta conexão periférica fica vedada para uma possível modificação do sistema de precipitação (ver Figura 3.6).

BR2 – Sistema de Controle de Temperatura da Câmara de Precipitação. A câmara de precipitação possui uma camisa de aço inox 316, a qual está conectada a um banho ultratermostático de recirculação

(BR2). O controle de temperatura é realizado por este banho (Marca Nova Ética, Modelo 521/2D) onde há circulação de água do banho passando pela câmara e desta retornando ao banho. Uma vista das câmaras de precipitação conectadas a todas as linhas é apresentada na figura abaixo.

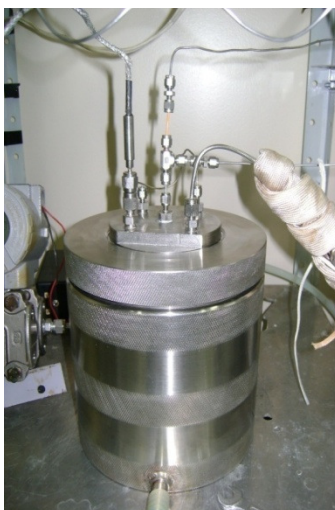


Figura 3.6 – Fotografia mostrando as duas câmaras de precipitação conectadas a todas as linhas da unidade experimental.

FR – Filtro de Retenção. O filtro de retenção é composto por dois filtros de politetrafluoretileno (PTFE), o primeiro com porosidade superficial de aproximadamente $1\ \mu\text{m}$, diâmetro de 8 mm e espessura de 1 mm que serve de base para o outro filtro membrana de politetrafluoretileno, ligado a um suporte de polietileno de alta densidade (Marca Millipore, Modelo FGLP). Este filtro possui porosidade de $0,22\ \mu\text{m}$, espessura de $150\ \mu\text{m}$ e mesmo diâmetro do

primeiro filtro, permitindo temperatura de operação de até 130°C. Estes filtros estão dispostos na saída da câmara de precipitação com a finalidade de reter as partículas precipitadas na câmara de precipitação permitindo apenas o fluxo do anti-solvente e do solvente orgânico. A escolha do filtro é muito importante dado que alguns tipos de filtros podem interagir com o solvente orgânico, dissolvendo-se neste e pondo em risco todo o processo de retenção e coleta das partículas. Os filtros membrana politetrafluoretileno (Teflon[®]) são hidrofóbicos e provêm uma ampla compatibilidade química.

V6 e linha pontilhada – Válvula métrica tipo agulha (marca HOKE, Modelo 1315G2Y, pressão de operação de até 345 bar) com sistema de aquecimento. A finalidade desta válvula é controlar a vazão na saída da câmara de precipitação juntamente com a válvula **V5**. A válvula **V6** possui uma abertura um pouco maior do que a válvula **V5** para compensar a vazão de entrada da solução, mantendo assim a pressão constante na câmara de precipitação. Qualquer pequeno aumento da pressão na câmara durante o experimento promove uma diminuição na vazão do anti-solvente, necessitando um controle rigoroso na abertura da válvula **V6**. Desta forma, quem comanda a variação da vazão de anti-solvente e a manutenção da pressão é esta válvula. Como o anti-solvente expande após esta válvula e conseqüentemente congela devido ao efeito Joule-tomphson ser pronunciado, há a necessidade de um sistema de aquecimento para permitir a manutenção da vazão constante. Para tal foi utilizada uma fita de aquecimento (Marca FISATOM, Modelo 5, 200 W de potência) acoplada a um controlador PID – **CT** – (Marca COEL, Modelo HW1450). A válvula **V6** é envolta pela fita de aquecimento, sendo um

termopar tipo J inserido entre o corpo da válvula e a fita de aquecimento para servir como elemento de alimentação do controlador de temperatura. A manutenção de uma temperatura alta (geralmente 100 °C) impede o congelamento da válvula **V6** e permite um controle maior da vazão nesta válvula.

Conexão do tubo capilar - O tubo capilar é preso ao *PEEK tubing* por um sistema de anilha e base de anilha de forma a propiciar uma boa vedação entre o capilar e este tubo. A união é feita inserindo-se uma das extremidades do capilar (cerca de 6,0 mm) para dentro do *PEEK tubing* e o sistema de anilhamento é então manipulado para que ocorra a fixação do capilar. Um aperto excessivo pode causar estrangulamento afetando o vazão da solução. Porém, se não apertado o suficiente pode fazer com que o capilar solte do *PEEK tubing* ou até haja passagem de fluido entre a parede externa do capilar e a parede interna do tubo.

Uma vista detalhada da unidade experimental utilizada neste trabalho pode ser observada na Figura 3.7 e uma vista geral, na Figura 3.8.



Figura 3.7 - Vista detalhada da unidade experimental utilizada para a precipitação e encapsulamento dos componentes.



Figura 3.8 - Vista geral da unidade experimental utilizada para a precipitação e encapsulamento dos componentes.

3.3.2 - Procedimento Experimental

O procedimento experimental utilizado neste trabalho é semelhante ao descrito por Franceschi *et al.* (2009a) e é válido tanto para a precipitação do β -caroteno puro quanto para a precipitação do polímero puro uma vez que a técnica empregada para a precipitação é a mesma para ambos.

Inicialmente, as soluções orgânicas contendo β -caroteno foram preparadas utilizando diclorometano como solvente orgânico com base no trabalho de Tres *et al.* (2007). As soluções contendo PHBV foram preparadas com base em testes de solubilidade do polímero em diclorometano à temperatura e pressão constantes. A cada experimento realizado, tanto na precipitação do β -caroteno quanto na precipitação do PHBV, uma nova solução era preparada no sentido de evitar que houvesse modificação na concentração da solução devido à evaporação do diclorometano durante o armazenamento dado que este solvente é extremamente volátil. Após preparar a solução que seria utilizada no experimento seguinte, o próximo passo foi carregar as bombas de alta pressão (BS1 e BS2) com CO_2 proveniente do cilindro de estocagem.

A etapa de carga de CO_2 envolve alguns passos. A primeira delas é o deslocamento do fluido do cilindro para a câmara interna de cada bomba. Para tal, as válvulas V1 a V4 foram mantidas abertas. Como uma quantidade relativamente grande de CO_2 era utilizada em cada condição experimental, cerca de 900 a 2000 mL dependendo da condição experimental, foi necessário liquefazer a maior quantidade possível deste no reservatório das bombas de seringa. Apesar da pressão de vapor do CO_2 ser alta à temperatura ambiente (aproximadamente 64

bar a 25 °C), a simples abertura da válvula do cilindro não era suficiente para deslocar a quantidade necessária de CO₂ para a câmara das bombas. Desta forma, a temperatura da camisa do cilindro das bombas foi ajustada em 7 °C com o auxílio do banho de recirculação BR1 e o cilindro deixado aberto por um tempo variando de 30 minutos a 1 hora, dependendo da quantidade de CO₂ disponível no cilindro de estocagem. Nestas condições, geralmente armazenava-se cerca de 490 mL de CO₂ no estado líquido dentro da câmara das bombas.

Durante o tempo de liquefação do CO₂ nas bombas, foi realizada a montagem da câmara de precipitação. Os filtros de retenção foram cuidadosamente colocados na câmara para que ficassem firmemente postados evitando que durante o experimento houvesse um deslocamento destes e o arraste do material precipitado pelo fluxo de saída. Primeiramente, foi colocado o filtro de politetrafluoretileno com maior porosidade servindo de suporte para o filtro membrana que vinha logo a seguir. Os próximos passos foram conectar o sensor de temperatura e a linha de saída da câmara de precipitação. Após isto, a câmara foi fechada e conectada ao banho termostático.

Outra etapa realizada durante a liquefação de CO₂ foi o ajuste da vazão de solução na bomba de HPLC e da pressão nesta através da manipulação da BPR. Para tal não era utilizada solução, mas diclorometano puro para evitar gasto desnecessário da solução, já que foram utilizados cerca de 100 mL de líquido durante este procedimento.

A vazão de solução foi estipulada ajustando-a diretamente na bomba. A pressão na bomba de HPLC foi ajustada manipulando-se a BPR de modo a restringir a passagem do fluxo aumentando a pressão até o valor de 200 bar para evitar qualquer possibilidade de refluxo do

anti-solvente pela linha da solução. Após a pressão ter sido alcançada, diclorometano foi escoado por um determinado tempo de modo a estabilizar a pressão. Após a estabilização da pressão no valor desejado, a vazão foi interrompida e o diclorometano substituído pela solução de maneira a retirar todo seu excesso presente na linha desde a bomba até a saída do tubo capilar. A solução foi escoada por cerca de 10 minutos para minimizar a quantidade de diclorometano na linha. A pressão foi mantida no valor desejado por intermédio da regulagem da BPR.

Realizada esta etapa, o próximo passo foi efetuar a conexão da linha de entrada de CO_2 e da solução na câmara de precipitação. Após todas as conexões terem sido feitas na câmara de precipitação, a válvula V5 era gradualmente aberta para permitir o enchimento da câmara com CO_2 , mantendo-se ainda toda a linha aberta desde o cilindro de armazenagem até a câmara.

Após a câmara de precipitação estar preenchida com CO_2 na sua pressão de vapor, a válvula V5 foi fechada e o sistema de aquecimento, controlado pelo banho de recirculação BR2, acionado. A temperatura no interior da câmara foi então captada pelo sensor de temperatura e monitorada pelo indicador de temperatura (IT). Destaca-se que o sensor e o indicador de temperatura estavam previamente calibrados de modo que a temperatura real do sistema era sempre baseada no indicador (IT).

Enquanto era permitida a estabilização da temperatura no valor estipulado, a válvula do cilindro e as válvulas V1 a V4 foram fechadas e a pressão foi elevada nas bombas de seringa pelo deslocamento do cilindro interno destas, pressurizando toda a linha desde as válvulas V1 e V2 até a válvula V5 até a pressão de 250 bar entre as bombas e a câmara de precipitação. Este valor de pressão nas bombas de seringa foi

estipulado para manter um diferencial de pressão entre as bombas e a câmara de precipitação (80 a 200 bar dependendo da pressão de experimento na câmara de precipitação). Este diferencial de pressão tem como objetivo evitar possível refluxo da câmara de precipitação para as linhas podendo causar precipitação de β -caroteno ou polímero nas linhas e também para fazer com que o CO_2 entrasse com alta velocidade na câmara de precipitação intensificando a dispersão do jato de solução durante os experimentos de precipitação. Outro ponto relevante diz respeito ao modo com que as bombas de seringa eram operadas. Elas nunca foram utilizadas simultaneamente, pois enquanto uma bomba estava sendo utilizada, a outra era carregada com CO_2 para garantir a disponibilidade de anti-solvente durante todo o experimento.

Quando a temperatura do experimento atingia o valor estipulado, a válvula V5 foi novamente aberta gradualmente de modo a permitir a vazão de CO_2 para dentro da câmara até a obtenção da pressão experimental desejada. Uma vez que a pressão na câmara atingisse o valor desejado, a válvula V6 era gradualmente aberta, mantendo-se a válvula V5 ainda aberta, no sentido de ajustar a vazão de anti-solvente na câmara de precipitação, mantendo-se a pressão constante. A vazão foi controlada principalmente pela válvula V6 e monitorado no visor da bomba de seringa que estava sendo utilizada no momento.

Para evitar a redução brusca de temperatura na válvula V6 devido ao efeito Joule-Thompson ser pronunciado, esta foi envolta por uma fita de aquecimento ligada ao controlador de temperatura (CT), tendo um termopar conectado a um controlador de temperatura. A temperatura foi mantida em 100 °C para evitar o bloqueio do fluxo neste

ponto e, conseqüentemente, evitar algum risco tanto ao andamento do experimento quanto a integridade física do experimentalista.

Mantendo temperatura e pressão constantes, o CO₂ foi deixado escoar até o alcance do estado estacionário. O tempo necessário para alcançar este estado variou de 5 a 10 minutos dependendo da pressão e temperatura de precipitação. A partir do momento em que a vazão de CO₂ não mais variava, iniciava-se então a injeção da solução para dentro da câmara de precipitação. Em cada experimento o volume de solução adicionada à câmara foi de exatamente 30 mL. O volume foi fixado neste valor assumindo que a quantidade de sólido (β -caroteno ou polímero) a ser precipitado era suficiente para a realização das análises. Após ter sido injetado o volume especificado da solução, a vazão desta era interrompida e a vazão de CO₂ mantida por mais tempo no sentido de efetuar a “secagem” das partículas precipitadas no interior da câmara e retirar o solvente residual ainda presente no meio.

Depois de proceder a secagem das partículas, o próximo passo era a despressurização da câmara de precipitação. Para isto, a válvula V5 foi fechada e a válvula V6 mantida com uma abertura que permitisse uma despressurização controlada a fim de manter a temperatura constante no valor estipulado. O tempo médio para promover a queda da pressão experimental até a pressão atmosférica foi de 60 e 180 minutos, para os experimentos com pressões de 80 e 200 bar, respectivamente.

Findado a etapa de despressurização, o banho BR2 foi desconectado da câmara de precipitação, todas as linhas foram desconectadas e a câmara foi então aberta para a retirada do material precipitado. Depois de aberta a câmara de precipitação, as partículas precipitadas foram retiradas e colocadas em frascos âmbar de 5 mL. Foi

realizada a coleta do material precipitado na parede e no fundo da câmara de precipitação, cuidadosamente, evitando que as partículas sofressem qualquer dano e de forma rápida minimizando a absorção de umidade. As amostras coletadas foram armazenadas em geladeira devidamente vedadas para proteção contra luz e umidade.

3.3.3 - Determinação do Percentual de Encapsulamento

Nesta seção é apresentada a metodologia para a quantificação de β -caroteno encapsulado, a qual se deu através de espectrofotometria na região de UV-VIS. Ressalta-se que o emprego desta metodologia foi anteriormente adotado por Franceschi *et al.* (2009a) e é usualmente empregada em trabalhos da literatura.

3.3.3.1 - Quantificação de β -caroteno encapsulado através do método de espectrometria na região de UV-VIS

Este procedimento consiste em determinar o percentual e a eficiência de encapsulação de β -caroteno através da suspensão de uma determinada massa deste co-precipitado em um solvente capaz de extrair completamente o carotenóide e realizar a quantificação do material encapsulado por espectrofotometria na região de UV-VIS.

Uma determinada massa de cada amostra obtida nos experimentos de co-precipitação (20 mg aproximadamente) foi pesada em uma balança analítica com precisão de 0,00001g (Mettler Toledo, modelo XS205 DualRange) e adicionada a diferentes volumes de acetona para remover o excesso de β -caroteno não-encapsulado. O

volume de solvente utilizado em cada uma das suspensões preparadas foi estimado como sendo o suficiente para formar uma solução saturada de β -caroteno à temperatura ambiente, baseado no trabalho de Tres *et al.* (2007), levando em consideração a massa do composto presente nas amostras obtidas para preparar as suspensões.

A acetona foi o solvente escolhido devido ao fato do β -caroteno apresentar uma solubilidade menor neste solvente com relação a outros (ver Tabela 3.1), como por exemplo, o etanol, e sendo assim, o uso deste promove uma retirada mais lenta do β -caroteno não-encapsulado, presente na superfície das partículas de polímero ou livre, evitando ou retardando a retirada do material encapsulado. Foram realizados dois procedimentos de retirada do β -caroteno não-encapsulado: o primeiro apenas suspendendo as partículas em acetona sem agitação (tempo aproximado de 20 segundos) e o segundo submetendo as suspensões à agitação por cinco minutos em agitador magnético com o auxílio de uma barra magnética.

Tabela 3.1 - Solubilidade de β -caroteno em diversos solventes e desvio padrão das medidas experimentais.

Solvente	Temperatura [°C]	Solubilidade [mg.mL ⁻¹]	Desvio padrão [mg.mL ⁻¹]
Acetato de etila	20	0,627	±0,081
	30	1,153	±0,242
	40	4,733	±0,117
Acetona	20	0,307	±0,202
	30	0,340	±0,251
	40	0,787	±0,444
Diclorometano	20	7,693	±0,133
	30	13,193	±0,204
	40	18,250	±1,061
Etanol	20	0,360	±0,106
	30	0,400	±0,072
	40	0,540	±0,191

Fonte: Tres *et al.* (2007).

Após as amostras terem sido adicionadas ao solvente, agitadas ou apenas suspensas, filtrou-se a suspensão resultante utilizando um filtro membrana de politetrafluoretileno, ligado a um suporte de polietileno de alta densidade (Marca Millipore, Modelo FGLP) com porosidade de 0,22 μ m. Após a filtração, o material retido no filtro foi seco em estufa a 40 °C por 12 horas e pesado novamente. A massa do material filtrado de cada condição experimental foi então dissolvida em um determinado volume de diclorometano (por ser o solvente capaz de dissolver o polímero e o β -caroteno) e a solução resultante analisada em um espectrofotômetro de UV-VIS (Agilent UV-visible, modelo 8453DE) na faixa de comprimento de onda de 460 nm (Franceschi, 2009).

Para a etapa de quantificação de β -caroteno encapsulado por espectrofotometria foi construída uma curva padrão (calibração) utilizando soluções com diferentes concentrações de β -caroteno em diclorometano. Ressalta-se que as soluções contendo β -caroteno em diclorometano foram preparadas de modo que abrangesse toda a concentração dos compostos na etapa de encapsulamento. Ainda, o comprimento de onda de 460 nm e o preparo de várias soluções contendo somente β -caroteno em diclorometano foram previamente estudados por Franceschi (2009), onde o autor verificou que, para a construção das curvas padrão, neste comprimento de onda ocorre a absorvância máxima do β -caroteno em amostras contendo β -caroteno puro e para a mistura β -caroteno e PHBV. Ainda, Franceschi (2009) constatou através da regressão dos conjuntos experimentais e nos parâmetros das equações que representavam as curvas de calibração, que a concentração de PHBV na solução não tem efeito significativo nos valores de absorvância máxima do β -caroteno.

A partir da absorvância do β -caroteno, obtida em espectrofotômetro de UV-VIS, para cada condição experimental, foi então determinada a concentração deste componente em diclorometano a partir da curva padrão. Com posse dos valores de concentração, foi possível obter a massa de β -caroteno encapsulado em cada uma das amostras tendo-se conhecido o volume de diclorometano no preparo de cada uma das soluções. A partir da massa de β -caroteno encapsulado em cada uma das diferentes amostras analisadas e da massa conhecida do co-precipitado após a filtração e secagem em estufa, determinou-se o percentual real de encapsulamento (PRE) ou carga de β -caroteno e a eficiência de encapsulamento (EE), para cada uma das condições

experimentais, através das Equações 3.1 e 3.2, respectivamente (Kalogiannis *et al.*, 2006):

$$PRE \% = \frac{\text{massa de } \beta - \text{caroteno encapsulado}}{\text{massa de partículas}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.1})$$

$$EE \% = \frac{\text{massa de } \beta - \text{caroteno encapsulado}}{\text{massa total de } \beta - \text{caroteno}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.2})$$

onde, o percentual teórico de encapsulamento é a razão entre a massa de β -caroteno e a massa de partículas (soma das massas de β -caroteno e PHBV) utilizadas nos experimentos de co-precipitação. A massa total de β -caroteno corresponde ao percentual máximo de encapsulamento de β -caroteno em PHBV.

3.3.4 – Comportamento de Liberação *in vitro* de β -caroteno Encapsulado em PHBV

Para a determinação dos comportamentos de liberação *in vitro* do β -caroteno encapsulado em PHBV foi adotado um procedimento semelhante ao de Lionzo (2007). Tal etapa visou fornecer subsídios fundamentais ao desenvolvimento, conhecimento do comportamento e cinética de liberação do β -caroteno quando o mesmo apresenta-se em contato com diversos meios de dissolução. Neste trabalho, as partículas encapsuladas foram submetidas aos solventes puros, acetato de etila e etanol anidro, para obtenção dos comportamentos de liberação. Em paralelo foram escolhidos os meios contendo n-hexano (por apresentar-se como um solvente lipofílico) e solução tampão fosfato (pH 7,4) a fim de comparar os resultados obtidos (com relação ao material

encapsulante e comportamento de liberação) com os encontrados na literatura científica, a qual relata alguns estudos com estes meios de liberação.

Inicialmente, o material resultante dos experimentos de coprecipitação foi submetido à lavagem para a retirada do β -caroteno não-encapsulado. Para isso, foi adotado o mesmo procedimento da etapa para quantificação do β -caroteno encapsulado, onde as partículas coprecipitadas foram suspensas em acetona sem agitação (tempo aproximado de 20 segundos) e em seguida filtradas utilizando um filtro membrana de politetrafluoretileno, ligado a um suporte de polietileno de alta densidade (Marca Millipore, Modelo FGLP) com porosidade de 0,22 μm . Após a filtração, o material retido no filtro e seco em estufa à 40 °C por 12 horas foi pesado novamente em balança analítica com precisão de 0,00001g (Mettler Toledo, modelo XS205 DualRange) para posteriormente ser utilizado nos ensaios de liberação, ou seja, somente adicionando o princípio ativo encapsulado.

As amostras foram adicionadas individualmente nos meios de dissolução (acetato de etila, n-hexano e etanol anidro) sendo que se adotou como padrão o volume de solvente em excesso de 10 %, considerando a solubilidade do soluto no referido solvente (Tres *et al.*, 2007). Especificamente para os ensaios em solução tampão fosfato (pH 7,4) foi adotado um volume de 100 mL levando em consideração a baixa solubilidade do sistema no referido meio. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL, onde o material encapsulado foi colocado em contato direto com o meio de liberação. Todos os recipientes 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. Após serem preparados, os Erlenmeyers foram colocados em um banho-maria incubador (Nova Etica, modelo 501/1D) com temperatura controlada de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e agitação com movimento orbital circular de 80 rpm.

Em tempos específicos, alíquotas de 2 mL eram retiradas do meio contendo o princípio ativo e em seguida filtradas utilizando um filtro membrana de politetrafluoretileno ligado a um suporte de polietileno de alta densidade (Marca Millipore, Modelo FGLP), evitando que fossem levadas para a análise partículas suspensas de β -caroteno. Depois da filtração da alíquota a solução resultante era analisada em quintuplicatas de observação através de um espectrofotômetro de UV-VIS (Agilent UV-visible, modelo 8453DE) na faixa de comprimento de onda de 460 nm a fim de determinar a concentração de β -caroteno no meio de liberação em função do tempo. Ainda, para o cálculo das concentrações, utilizou-se a média (obtidas através de quintuplicatas de observação) dos valores de absorbância juntamente com a curva padrão (calibração) respectiva de cada meio de liberação. Por fim, ressalta-se que para cada alíquota de 2 mL retirada, o mesmo volume contendo o solvente/meio puro era repostado a fim de manter o volume constante.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS

Para a realização dos experimentos de precipitação do β -caroteno e do PHBV puros, foi elaborado um planejamento seqüencial baseado nos resultados obtidos por Franceschi (2009) e Franceschi *et al.* (2009a, 2009b). Ressalta-se que nestes trabalhos as etapas de precipitação e encapsulamento foram estudadas e os autores investigaram o efeito de algumas variáveis de processo no tamanho, distribuição de tamanho e morfologia de partículas precipitadas de β -caroteno e PHBV. A partir das condições que forneceram menor tamanho de partícula na precipitação do princípio ativo e maior tamanho de partícula na precipitação do agente encapsulante, iniciaram o estudo da relação em massa entre β -caroteno e PHBV na etapa de encapsulamento avaliando o percentual e a eficiência de encapsulamento.

O presente trabalho buscou, a partir dos resultados encontrados pelos referidos autores, explorar com mais detalhes: *i)* algumas variáveis que apresentaram-se significativas com relação ao tamanho, distribuição de tamanho e morfologia das partículas de β -caroteno e PHBV precipitadas; *ii)* a relação em massa entre β -caroteno e PHBV na etapa de encapsulamento; *iii)* o efeito do tempo de secagem do material precipitado, e por fim a obtenção dos perfis de liberação das partículas encapsuladas submetidas a diferentes meios de liberação.

A seguir, são apresentadas as condições estudadas por Franceschi (2009) e Franceschi *et al.* (2009a e 2009b) com seus respectivos resultados. Optou-se por apresentar essas informações no início desta seção a fim de permitir um melhor acompanhamento na leitura. Na precipitação do β -caroteno e do PHBV, os autores investigaram a influência das seguintes variáveis: concentração de β -caroteno na solução (CS) (4 e 8 mg.ml⁻¹), concentração de PHBV na solução (CS) (10, 20, 30 e 40 mg.ml⁻¹), pressão (P) (80 e 120 bar), temperatura (T) (20 e 40 °C), vazão de solução (q_s) (1; 2,5 e 4 ml.min⁻¹), vazão de anti-solvente (q_a) (20, 30 e 40 ml.min⁻¹). Os resultados indicaram que a concentração de β -caroteno na solução, a concentração de PHBV na solução e a pressão apresentam efeito significativo em relação ao tamanho médio das partículas formadas. Ainda, a vazão de anti-solvente apresentou-se significativa, a nível de 95 % de confiança, para a análise do tamanho médio das partículas de β -caroteno.

Com relação ao encapsulamento do princípio ativo, segundo Franceschi *et al.* (2009a), uma condição primordial para o sucesso dos experimentos é que as partículas precipitadas do material a ser encapsulado sejam menores do que as do material encapsulante. Desta forma, os valores dos parâmetros de processo foram selecionados com base na condição experimental de precipitação que propiciou menor tamanho de partícula para o β -caroteno e maior tamanho de partícula para o PHBV. Os resultados mostraram que a condição experimental que proporcionou um maior tamanho médio de partículas de PHBV precipitado foi: pressão (80 bar), temperatura (40 °C), vazão de solução (1 ml.min⁻¹), vazão de anti-solvente (40 ml.min⁻¹), concentração na solução (30 mg.ml⁻¹). Para o β -caroteno, a condição experimental em

que se obtiveram menores tamanhos médios de partículas foi: pressão (80 bar), temperatura (40 °C), vazão de solução (1 ml.min⁻¹), vazão de anti-solvente (40 ml.min⁻¹), concentração na solução (8 mg.ml⁻¹).

Baseado nos dados apresentados acima partiu-se, neste trabalho, para uma análise mais ampla de algumas variáveis significativas a fim de se obterem maiores informações desta etapa de precipitação. Para o β -caroteno e PHBV foram utilizadas as seguintes condições otimizadas do trabalho de Franceschi (2009) e Franceschi *et al.* (2009a e 2009b): temperatura (40 °C), vazão de solução (1 ml.min⁻¹), vazão de anti-solvente (40 ml.min⁻¹). Para o estudo de precipitação de PHBV, foi utilizada a concentração na solução de 30 mg.ml⁻¹ e estudou-se apenas o efeito de pressão na faixa de 80 a 200 bar. Para o β -caroteno, além da mesma faixa de pressão citada, o efeito da concentração de 4 e 8 mg.ml⁻¹ também foi investigado.

4.2 - PRECIPITAÇÃO DO PHBV PURO

A Tabela 4.1 apresenta a matriz do planejamento seqüencial de precipitação do PHBV puro empregando CO₂ supercrítico como anti-solvente, bem como os resultados referentes ao tamanho ($X_{\text{mínimo}}$ e $X_{\text{máximo}}$) das partículas de PHBV precipitadas, tamanho médio (\bar{X}) e seu respectivo desvio padrão (σ) e coeficiente de variância (CV). Ressalta-se novamente, que neste conjunto de experimentos a temperatura (40 °C), a concentração de solução (30 mg.ml⁻¹), a vazão de solução (1 ml.min⁻¹) e a vazão de anti-solvente (40 ml.min⁻¹) foram mantidas constantes.

Tabela 4.1 – Condições experimentais do planejamento seqüencial e tamanho das partículas de PHBV puro precipitadas.

Experimento	P [bar]	$X_{\text{mínimo}}$ [μm]	$X_{\text{máximo}}$ [μm]	$\bar{X} \pm \sigma$ [μm]	CV (%)
1	80	0,36	2,14	$1,1 \pm 0,4$	36
2	120	0,36	1,78	$0,8 \pm 0,3$	31
3	160	0,27	1,48	$0,7 \pm 0,2$	32
4	200	0,40	1,15	$0,7 \pm 0,2$	28

Com base na tabela acima, constatou-se que o aumento da pressão de precipitação indica uma tendência à formação de menores partículas de PHBV. Para a condição experimental 1, com pressão de 80 bar, encontraram-se os maiores tamanhos médios das partículas (1,1 μm) e, em contrapartida, no experimento com pressão de 200 bar, o tamanho médio das partículas formadas foi reduzido para 0,7 μm .

Alguns trabalhos na literatura mostram comportamento semelhante com relação à pressão de precipitação, como o de Chen *et al.* (2005) e Franceschi *et al.* (2009a) onde os mesmos constataram que com o aumento da pressão, a uma temperatura fixa, ocorreu um aumento na densidade do CO_2 levando a uma melhor dispersão da solução polimérica no anti-solvente e conseqüente diminuição no tamanho das gotículas formadas.

A Figura 4.1 apresenta o comportamento do tamanho médio das partículas de PHBV precipitadas em função da pressão e a Figura 4.2, traz em forma de diagrama de Pareto, a comprovação do efeito negativo desta variável com relação ao tamanho médio das partículas, ou seja, aumentando a pressão de 80 a 200 bar, ocorre uma tendência à formação de menores partículas, a nível de 95 % de confiança.

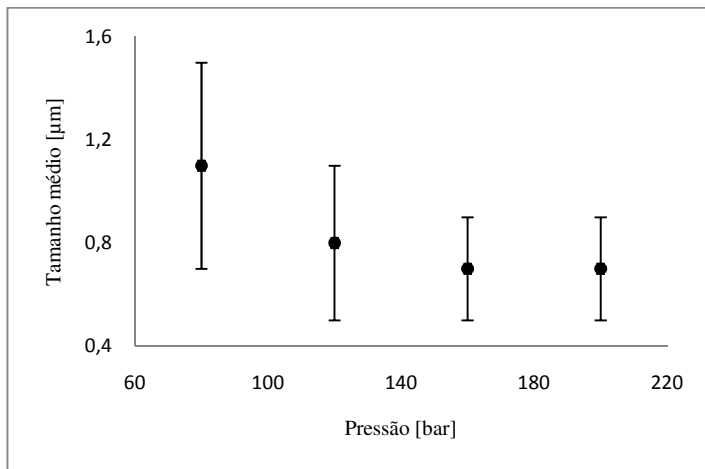


Figura 4.1 - Tamanho médio das partículas de PHBV em função da pressão de precipitação.

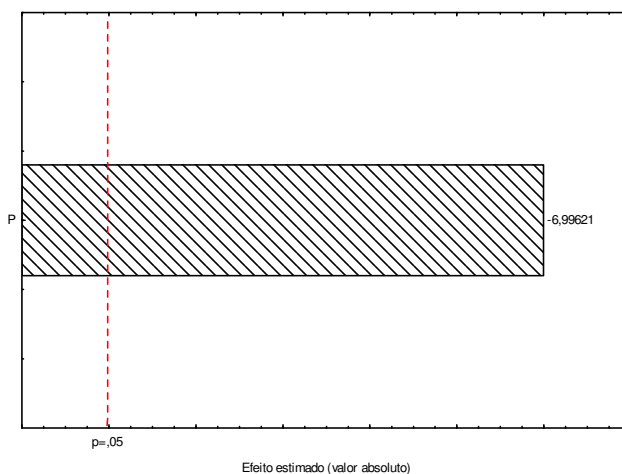


Figura 4.2 - Gráfico de Pareto apresentando o efeito da pressão sobre o tamanho médio das partículas de PHBV precipitadas a partir do planejamento seqüencial avaliando a faixa de pressão entre 80 e 200 bar.

O experimento 1 apresentou resultado discordante daquele obtido por Franceschi (2009) empregando CO₂ supercrítico como anti-solvente nas mesmas condições. Neste trabalho, foi encontrado um tamanho médio de partícula e desvio padrão de $1,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$ e para o referido autor, $27,79 \pm 22,61 \mu\text{m}$, respectivamente. Porém, no restante dos experimentos de precipitação com a concentração de PHBV na solução igual a $30 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, variando a vazão de anti-solvente (1 a $4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$), vazão de solução (20 a $40 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) e pressão de 80 bar, Franceschi encontrou valores na ordem de $3,27 \mu\text{m}$, aproximando-se dos obtidos no presente trabalho.

Com relação à morfologia das micropartículas de PHBV precipitadas, na Figura 4.3 são apresentadas as micrografias de MEV baseadas no planejamento seqüencial (Tabela 4.1) a 80, 120, 160 e 200 bar.

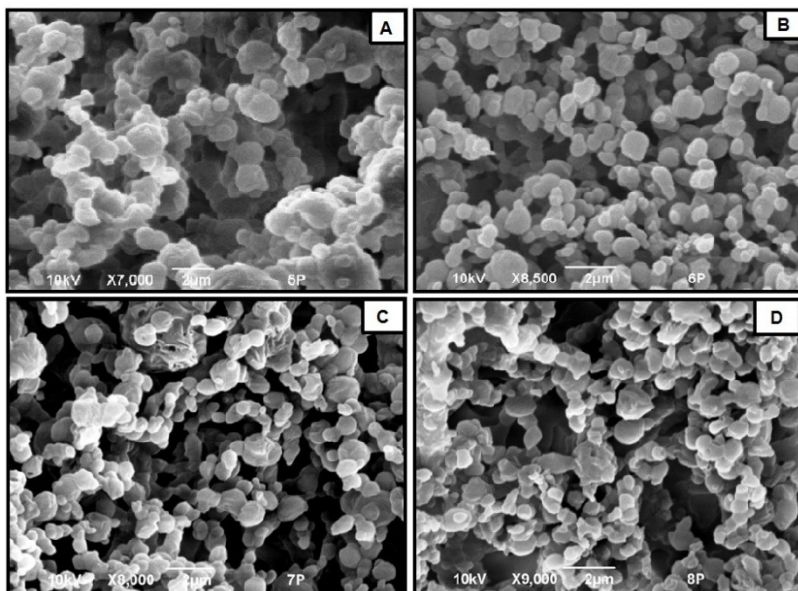


Figura 4.3 - Micrografias de MEV das partículas de PHBV precipitadas com base no planejamento seqüencial. Condição experimental A: 80 bar (ampliação de 7000x); condição experimental B: 120 bar (ampliação de 8500x); condição experimental C: 160 bar (ampliação de 8000x) e, condição experimental D: 200 bar (ampliação de 9000x).

Através das micrografias acima, constataram-se diferenças visuais entre o PHBV não-processado (apresentado na Figura 3.2) e o polímero nas condições experimentais estudadas, onde no primeiro caso a formação de estrutura fibrosa foi encontrada e nas micrografias acima, fica evidente a formação de estrutura tipo esfera independentemente da pressão de precipitação. Especialmente no experimento 4 (micrografia D), ocorreu a formação mais pronunciada de emaranhados/aglomeração em relação aos outros experimentos. O mesmo efeito foi verificado por

Franceschi (2009) na pressão de precipitação do PHBV a 120 bar em comparação à pressão de 80 bar, constatando a ocorrência de auto encapsulamento do polímero, ou seja, parte do polímero dissolvido no solvente orgânico precipitou na forma de pequenas partículas esféricas e parte precipitou na forma de filme recobrando as pequenas partículas já formadas.

4.3 - PRECIPITAÇÃO DE β -CAROTENO PURO

A Tabela 4.2 apresenta a matriz do planejamento sequencial utilizada para a precipitação do β -caroteno puro empregando CO_2 supercrítico como anti-solvente bem como os resultados com relação ao tamanho ($X_{\text{mínimo}}$ e $X_{\text{máximo}}$) das partículas de β -caroteno precipitadas, tamanho médio (\bar{X}) e seu respectivo desvio padrão (σ) e coeficiente de variância (CV). Novamente, algumas variáveis previamente estudadas por Franceschi (2009) foram mantidas constantes, como: temperatura (40 °C), vazão de solução (1 ml.min⁻¹) e vazão de anti-solvente (40 ml.min⁻¹).

Tabela 4.2 - Condições experimentais do planejamento seqüencial e tamanho das partículas de β -caroteno puro precipitadas.

Experimento	P [bar]	CS [mg.ml ⁻¹]	X _{mínimo} [μ m]	X _{máximo} [μ m]	$\bar{X} \pm \sigma$ [μ m]	CV [%]
1	80	4	0,8	4,4	2,2 \pm 0,8	36
2		8	0,3	2,5	1,3 \pm 0,5	41
3	120	4	6,7	93,1	36,6 \pm 21,5	59
4		8	11,3	91,3	39,0 \pm 19,9	51
5	160	4	13,3	107,2	51,9 \pm 18,5	35
6		8	12,6	83,2	41,1 \pm 14,0	34
7	200	4	12,4	57,1	32,8 \pm 8,3	25
8		8	14,6	48,4	30,4 \pm 7,8	26

Através dos resultados obtidos, constatou-se que, mantendo a concentração da solução fixa em 4 mg.ml⁻¹, ocorre um aumento do tamanho médio das partículas de β -caroteno com o aumento da pressão, evidenciado pelos seguintes ensaios: experimento 1, onde o tamanho médio das partículas foi de 2,2 \pm 0,8 μ m, e experimento 7, onde encontrou-se um valor médio de 32,8 \pm 8,3 μ m. Também para a concentração de β -caroteno na solução igual a 8 mg.ml⁻¹, ocorreu o mesmo efeito com o aumento da pressão, iniciando com partículas precipitadas de 1,3 \pm 0,5 μ m (em 80 bar) até partículas com tamanho médio de 30,4 \pm 7,8 μ m (em 200 bar).

Foi possível verificar também um aumento mais pronunciado no tamanho médio das partículas na pressão de 160 bar para ambas as concentrações de β -caroteno, onde nos experimentos 5 e 6, foram encontrados os maiores valores para as partículas precipitadas, os quais foram de 51,9 \pm 18,5 μ m e 41,1 \pm 14,0 μ m para as concentrações de 4 e 8 mg.ml⁻¹, respectivamente. Observou-se que neste valor de pressão o

tamanho médio das partículas precipitadas sofreu uma inversão, ou seja, no intervalo de pressão de 80 a 160 bar tem-se valores crescentes e em 200 bar o valor médio do tamanho das partículas decresce. Ainda, para todos os valores de pressão, a concentração de 4 mg.ml^{-1} apresentou partículas com tamanho médio maiores do que a concentração de 8 mg.ml^{-1} com exceção do experimento a 120 bar onde os valores apresentaram a ordem inversa.

Pelos trabalhos de Cardoso *et al.* (2009) e Miguel *et al.* (2006) pode-se concluir que ambos os efeitos, pressão de precipitação e concentração da solução podem ser explicados em termos de solubilidade e supersaturação, respectivamente. Quando a mistura solvente + anti-solvente encontra-se em uma única fase, um aumento da pressão acima do ponto crítico da mistura aumenta a solubilidade do soluto na mistura diminuindo a supersaturação e conseqüentemente a nucleação, levando a um crescimento das partículas precipitadas. Em contrapartida, quando a solução a ser injetada na câmara de precipitação está próxima da saturação, o mecanismo de nucleação prevalece sobre o mecanismo de crescimento das partículas formadas.

Ao se realizar uma comparação entre os valores referentes ao tamanho médio das partículas de β -caroteno precipitadas obtidos neste trabalho e àqueles encontrados por Franceschi (2009) constatou-se que, na pressão de 80 bar, o referido autor obteve valores de tamanho médio de partícula que variaram de 4,6 a 3,8 μm para as concentrações de solução de 4 e 8 mg.ml^{-1} , respectivamente, enquanto que os resultados do presente trabalho, para as mesmas concentrações mencionadas, indicaram valores compreendidos entre 4,4 e 2,5 μm .

Para a pressão de 120 bar, na concentração de 4 mg.ml^{-1} , Franceschi (2009) obteve um tamanho médio de partícula igual a $42,8 \text{ }\mu\text{m}$, menor do que na concentração de 8 mg.ml^{-1} , onde o valor apresentado foi de $124,9 \text{ }\mu\text{m}$. Neste trabalho, os valores ficaram compreendidos entre $36,57$ e $39,01 \text{ }\mu\text{m}$ para as respectivas concentrações citadas. A Figura 4.4 apresenta de forma gráfica os resultados referentes ao tamanho médio das partículas precipitadas de β -caroteno em função da pressão e de sua concentração na solução obtidos neste trabalho.

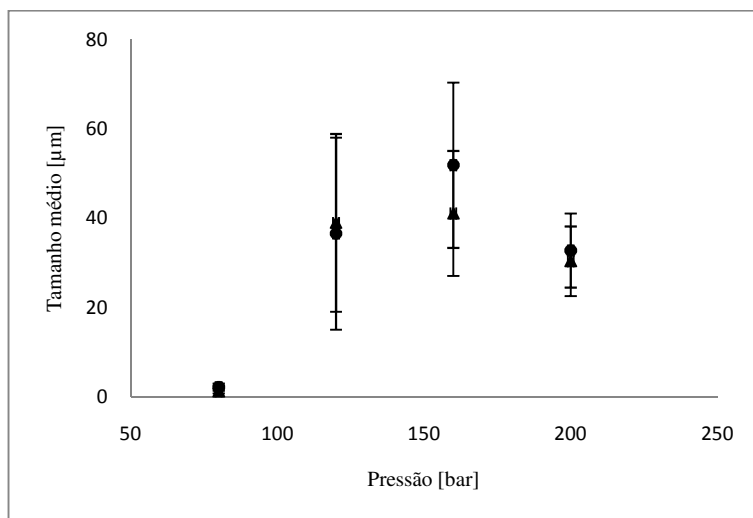


Figura 4.4 - Tamanho médio das partículas precipitadas em função da pressão e concentração de β -caroteno: ● 4 mg.ml^{-1} ; ▲ 8 mg.ml^{-1} .

Para melhor observar os efeitos das variáveis envolvidas no processo de precipitação do β -caroteno, as Figuras 4.5 e 4.6 apresentam em forma de diagrama de Pareto, a nível de 95 % de confiança, o efeito

isolado e sinérgico das variáveis pressão (P) e concentração de solução (CS). Ressalta-se que, para fins de estimativa dos efeitos destas variáveis, o tratamento estatístico dos dados experimentais foi dividido em duas etapas em relação à pressão: a primeira envolvendo todos os valores de tamanho médio de partículas nas pressões de 80 e 120 bar e a segunda com os valores obtidos nas pressões de precipitação de 160 e 200 bar.

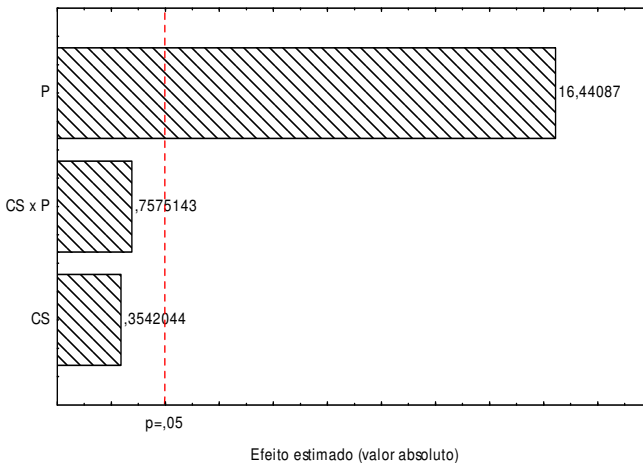


Figura 4.5 - Gráfico de Pareto apresentando o efeito da concentração de solução e pressão sobre o tamanho médio das partículas de β -caroteno precipitadas a partir do planejamento seqüencial avaliando a faixa de pressão entre 80 e 120 bar.

Pela Figura acima constata-se que na faixa de pressão entre 80 e 120 bar ocorreu um efeito positivo da mesma em relação ao tamanho médio das partículas de β -caroteno precipitadas, ou seja, aumentando a pressão, ocorre um aumento do tamanho médio das partículas. Em

contrapartida, não foi encontrado, a nível de 95 % de confiança, efeito significativo da concentração da solução atuando isoladamente ou em conjunto com a pressão.

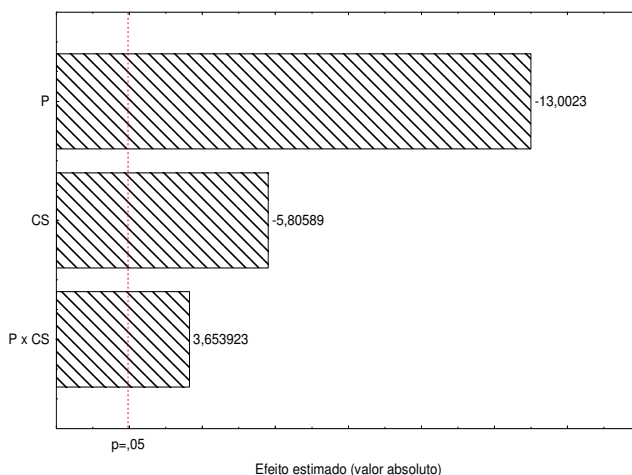


Figura 4.6 - Gráfico de Pareto apresentando o efeito da concentração de solução e pressão sobre o tamanho médio das partículas de β -caroteno precipitadas a partir do planejamento seqüencial avaliando a faixa de pressão entre 160 e 200 bar.

Em se tratando de pressões maiores, a Figura 4.6 mostra um comportamento completamente diferente das variáveis envolvidas. Pelo planejamento seqüencial avaliando a faixa de pressão entre 160 e 200 bar foi encontrado um efeito negativo da pressão e da concentração da solução, ou seja, aumentando-se o valor destas variáveis, menor tamanho médio das partículas de β -caroteno são obtidos. Em contrapartida, para altos valores de pressões inicia-se o efeito sinérgico entre estas duas variáveis (CS e P) proporcionando um aumento do

tamanho médio das partículas formadas. As Figuras 4.7 e 4.8 apresentam as micrografias de MEV das partículas de β -caroteno precipitadas com concentração de solução igual a 4 mg.ml^{-1} e 8 mg.ml^{-1} em função da pressão.

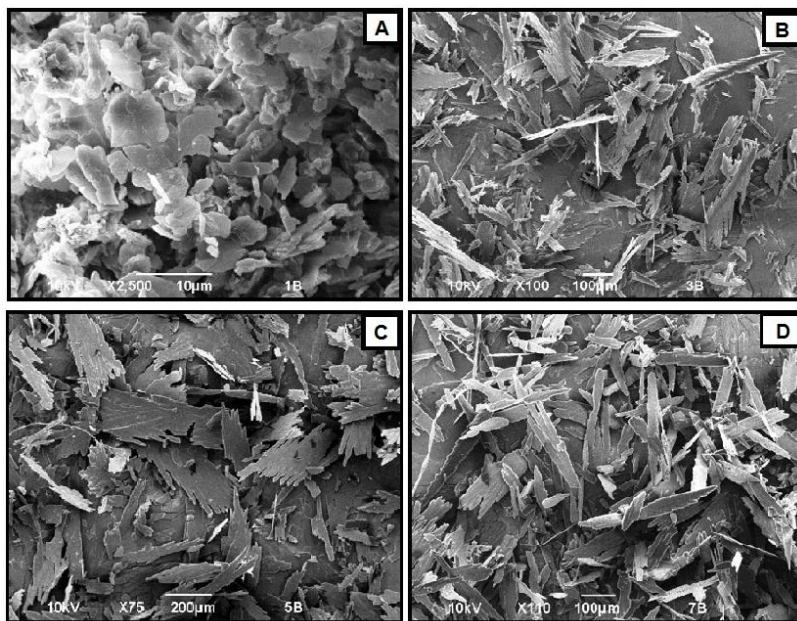


Figura 4.7 - Micrografias de MEV das partículas de β -caroteno precipitadas com 4 mg.ml^{-1} . Condição experimental A: 80 bar (ampliação de 2500x); condição experimental B: 120 bar (ampliação de 100x); condição experimental C: 160 bar (ampliação de 75x) e, condição experimental D: 200 bar (ampliação de 110x).

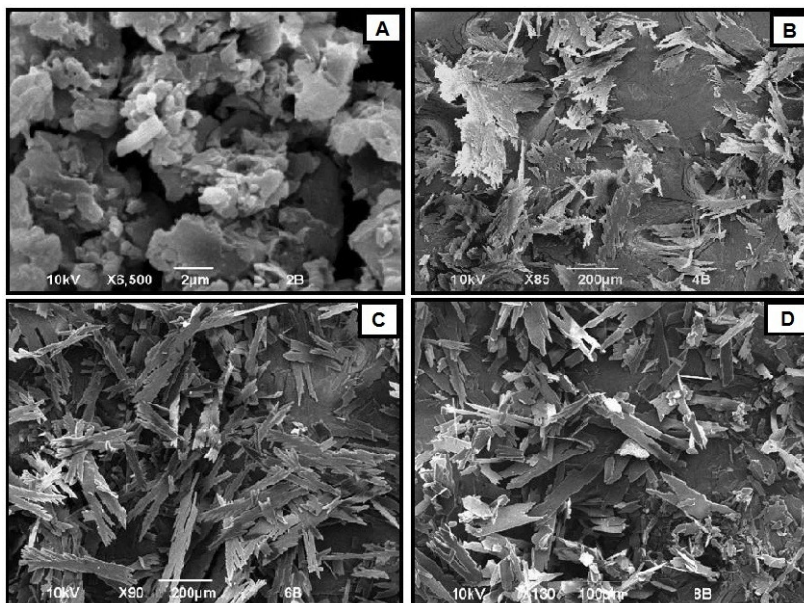


Figura 4.8 - Micrografias de MEV das partículas de β -caroteno precipitadas com 8 mg.ml^{-1} . Condição experimental A: 80 bar (ampliação de 6500x); condição experimental B: 120 bar (ampliação de 85x); condição experimental C: 160 bar (ampliação de 90x) e, condição experimental D: 200 bar (ampliação de 130x).

Constata-se que a pressão exerce um efeito pronunciado sobre a morfologia das partículas precipitadas visto que na concentração de 4 mg.ml^{-1} , a 80 bar, têm-se partículas do tipo placas, modificadas para partículas do tipo folhas quando a pressão é de 120 bar, retornando para o formato de placas entre 160 e 200 bar. Para a concentração de 8 mg.ml^{-1} , o mesmo comportamento referente a morfologia das partículas foi encontrado em todos os valores de pressão estudados. Nesta concentração de solução, Franceschi (2009) concluiu que a pressão também exerce efeito sobre a morfologia das partículas de β -caroteno

precipitadas na pressão de 80 a 120 bar, apresentando comportamento igual ao deste trabalho.

Como apresentado através das análises das micrografias de MEV (Figuras 4.7 e 4.8), não foram encontradas diferenças pronunciadas com relação à morfologia das partículas de β -caroteno precipitadas em diferentes níveis de concentração de solução, evidenciando que a pressão é a variável que apresenta a maior influência nas mudanças. Tal fato pode ser evidenciado a seguir através das micrografias de MEV (Figuras 4.9 e 4.10) que demonstram o comportamento da morfologia das partículas em diferentes níveis de pressão de precipitação e concentração de solução.

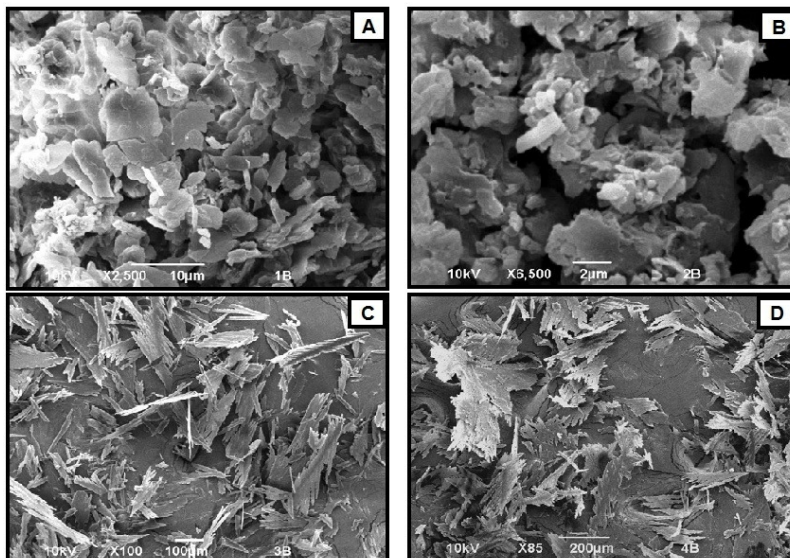


Figura 4.9 - Micrografias de MEV das partículas de β -caroteno precipitadas com base no planejamento seqüencial em função da pressão e concentração da solução. Condição experimental A: 80 bar e 4 mg.ml^{-1} (ampliação de 2500x); condição experimental B: 80 bar e 8 mg.ml^{-1} (ampliação de 8500x); condição experimental C: 120 bar e 4 mg.ml^{-1} (ampliação de 100x) e, condição experimental D: 120 bar e 8 mg.ml^{-1} (ampliação de 85x).

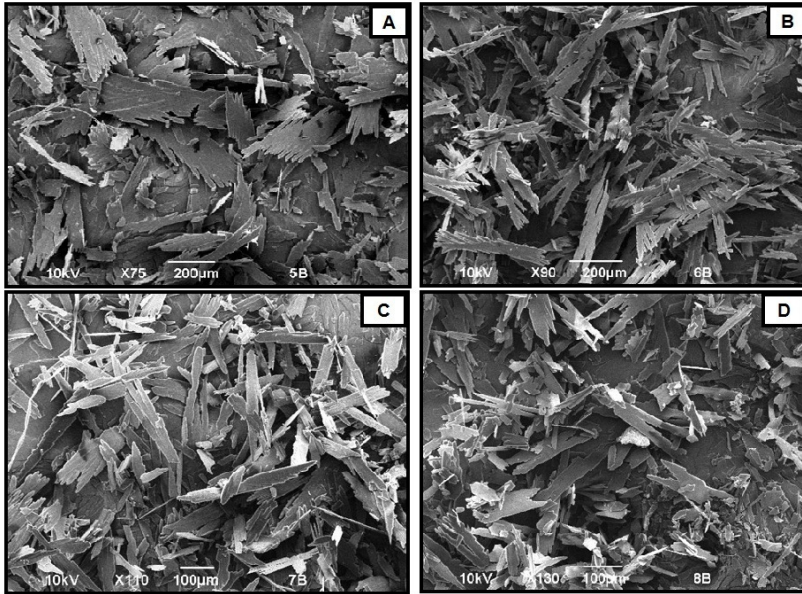


Figura 4.10 - Micrografias de MEV das partículas de β -caroteno precipitadas com base no planejamento seqüencial em função da pressão e concentração da solução. Condição experimental A: 160 bar e 4 mg.ml^{-1} (ampliação de 75x); condição experimental B: 160 bar e 8 mg.ml^{-1} (ampliação de 90x); condição experimental C: 200 bar e 4 mg.ml^{-1} (ampliação de 110x) e, condição experimental D: 200 bar e 8 mg.ml^{-1} (ampliação de 130x).

Novamente, pelas figuras acima (4.9 e 4.10) ficou evidente que, adotando uma mesma pressão de precipitação, e alterando somente a concentração da solução, não ocorreram mudanças na morfologia das partículas precipitadas. Em resumo, é possível inferir que inicialmente as partículas de β -caroteno precipitadas apresentam morfologia do tipo placas, alterando-se para partículas tipo folhas e retornando para o formato inicial em pressões elevadas.

4.4 – INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE SECAGEM

Conforme apresentado desde o início deste trabalho, a preocupação com as características dos materiais precipitados aliado à sua pureza é altamente desejável. Relatou-se também que para realizar os experimentos de precipitação dos componentes puros, foram utilizadas soluções orgânicas contendo β -caroteno e PHBV, respectivamente, preparadas utilizando diclorometano como solvente orgânico.

Kim e Shing (2007), Kang *et al.* (2008) e Cardoso *et al.* (2009) relatam que o limite residual permitido de diclorometano é de no máximo 600 ppm por se tratar de um solvente que pertence a classe 2 na escala de periculosidade. Além disto, Kim *et al.* (2007), Hong *et al.* (2000) e Kang *et al.* (2008), estudando a precipitação de sólidos utilizando diclorometano como solvente orgânico e CO₂ como anti-solvente, reportam tempos de secagem variando entre 30 e 120 minutos acarretando uma quantidade residual de diclorometano nas partículas entre 38 e 50 ppm.

Com base nestes dados, adotou-se como procedimento “*padrão*” na etapa de secagem das partículas de β -caroteno e PHBV precipitadas as seguintes condições: utilização de 2000 ml de CO₂, totalizando um tempo de secagem (TS) de aproximadamente 120 minutos em todos os experimentos. Cabe ressaltar que para a escolha do tempo de secagem, além das informações encontradas na literatura, estudos preliminares realizados pelo grupo de pesquisa indicaram que o mesmo foi suficiente para a realização da secagem não havendo alterações após esse limite de tempo.

Na literatura foram encontrados apenas estudos referentes à toxicidade/resíduo no produto final, não sendo mencionada nenhuma referência com relação à influência do tempo de secagem, o qual é dependente da vazão de anti-solvente e do volume de CO₂, sobre a morfologia e tamanho médio das partículas previamente precipitadas. Tal fato torna-se imprescindível, pois de acordo com os resultados obtidos para os componentes puros, podem surgir alterações nas condições experimentais na etapa de encapsulamento e secagem do co-precipitado, onde o material sofrerá o mesmo procedimento.

Desta forma, optou-se por realizar um conjunto com 4 experimentos (ver Tabela 4.3) de precipitação para o β-caroteno e PHBV puros, variando a quantidade e a vazão de anti-solvente (CO₂) na etapa de secagem das partículas. Foram denominados dois tratamentos de secagem, sempre comparados ao adotado como “*padrão*” inicialmente: *lento* quando utilizou-se um maior volume e menor vazão de anti-solvente (CO₂) e *rápido* quando estas condições foram inversas. As Figuras 4.11 e 4.12 apresentam, respectivamente, as micrografias comparativas dos tratamentos de secagem estudados para as micropartículas puras de PHBV e β-caroteno precipitadas.

Tabela 4.3 - Planejamento sequencial de secagem das micropartículas de β -caroteno e PHBV.

Experimentos	Componentes	P [bar]	T [°C]	q_s [ml.min ⁻¹]	CS [mg.ml ⁻¹]	q_a [ml.min ⁻¹]	Volume de CO ₂ [ml]	Secagem
1						10	2500	<i>Lenta</i>
2	β -caroteno	80	40	1	8	30	1500	<i>Rápida</i>
3	PHBV				30	10	2500	<i>Lenta</i>
4						30	1500	<i>Rápida</i>

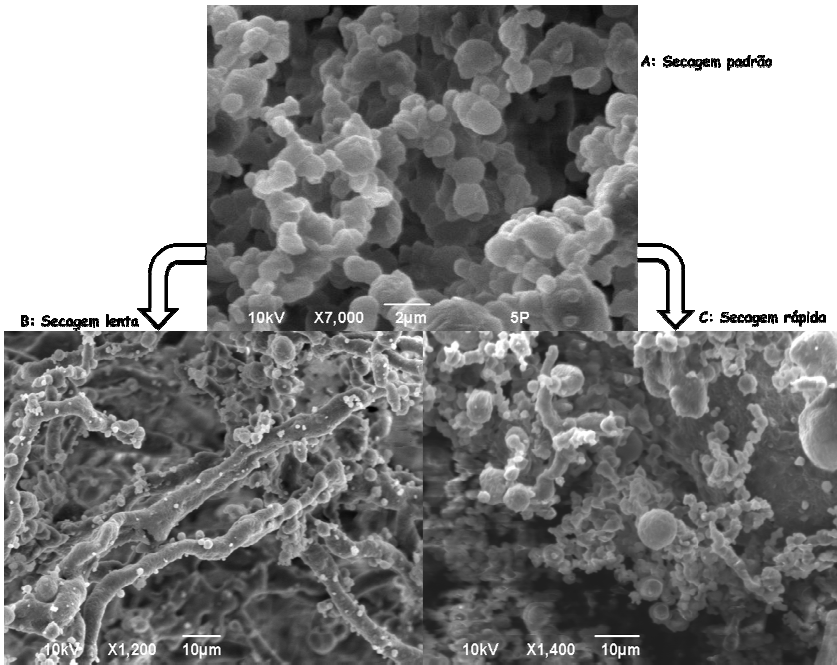


Figura 4.11 – Micrografias de MEV comparativas das partículas de PHBV precipitadas. Condição experimental: Secagem padrão (q_a : 20 ml.min⁻¹; volume de CO₂: 2000 ml) ampliação de 7000x; Secagem rápida (q_a : 30 ml.min⁻¹; volume de CO₂: 1500 ml) ampliação de 1400x e Secagem lenta (q_a : 10 ml.min⁻¹; volume de CO₂: 2500 ml) ampliação de 1200x.

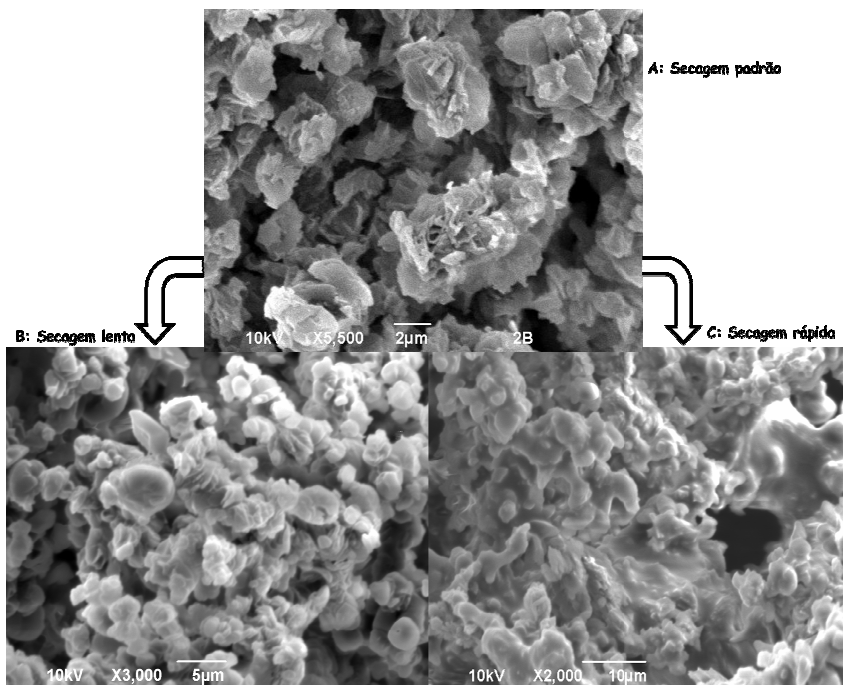


Figura 4.12 – Micrografias de MEV comparativas das partículas de β -caroteno precipitadas. Condição experimental: Secagem padrão (q_a : 20 ml.min⁻¹; volume de CO₂: 2000 ml) ampliação de 7000x; Secagem rápida (q_a : 30 ml.min⁻¹; volume de CO₂: 1500 ml) ampliação de 1400x e Secagem lenta (q_a : 10 ml.min⁻¹; volume de CO₂: 2500 ml) ampliação de 1200x.

Com relação às micrografias dos componentes puros verificou-se que a morfologia do PHBV foi alterada pelos tratamentos de secagem *lento* e *rápido* apresentando uma maior aglomeração e alteração visuais na estrutura das micropartículas. Na morfologia do β -caroteno não foram encontradas diferenças visuais entre as micropartículas submetidas ao tratamento *padrão* e *lento*, porém em contrapartida, a secagem *rápida* promoveu maior aglomeração no material precipitado.

De acordo com as micrografias obtidas, percebeu-se que as menores alterações nas estruturas das micropartículas precipitadas de ambos os componentes ocorreram no tratamento de secagem “padrão” onde a volume e a vazão de anti-solvente (CO₂) foram de 2000 ml e 20 ml.min⁻¹, respectivamente. Sendo assim, estas condições experimentais continuaram sendo adotadas para a etapa de secagem na etapa de co-precipitação dos componentes.

4.5 – ENCAPSULAMENTO DE B-CAROTENO EM PHBV

Para o encapsulamento do β-caroteno em PHBV foram selecionadas as condições experimentais que forneceram as menores partículas do carotenóide e as maiores partículas do biopolímero. Com base nos resultados da etapa de precipitação dos componentes puros, verificou-se que tais condições foram satisfeitas na pressão de 80 bar, temperatura de 40 °C, vazão de anti-solvente de 40 ml.min⁻¹, vazão de solução de 1 ml.min⁻¹.

Yeo e Kiran (2005) e Mattea *et al.* (2008) reportam que a relação entre as concentrações do material a ser encapsulado e o agente encapsulante é um parâmetro fundamental que influencia na eficiência de encapsulamento e na morfologia dos compostos formados utilizando CO₂ como anti-solvente. Lionzo *et al.* (2007) constatou-se que o perfil de liberação do princípio ativo pode ser modulado pela variação entre as concentrações das micropartículas formadas a partir dos biopolímeros, ou seja, seu mecanismo de liberação é dependente da proporção do agente encapsulante nas micropartículas.

Franceschi *et al.* (2009a) na etapa de encapsulamento e na determinação do percentual real e eficiência de encapsulamento, variaram a concentração de β -caroteno e PHBV na solução de 1 a 8,04 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ e 19,90 a 40,09 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente. Em paralelo, verificaram diversos tempos de agitação em ultrassom (0; 0,5; 1; 2 e 3 minutos) na etapa da lavagem do material co-precipitado para a retirada do β -caroteno livre ou não-encapsulado. A Figura 4.13 exemplifica a curva do percentual de encapsulamento em função do tempo de ultrassom na etapa da lavagem do material não-encapsulado.

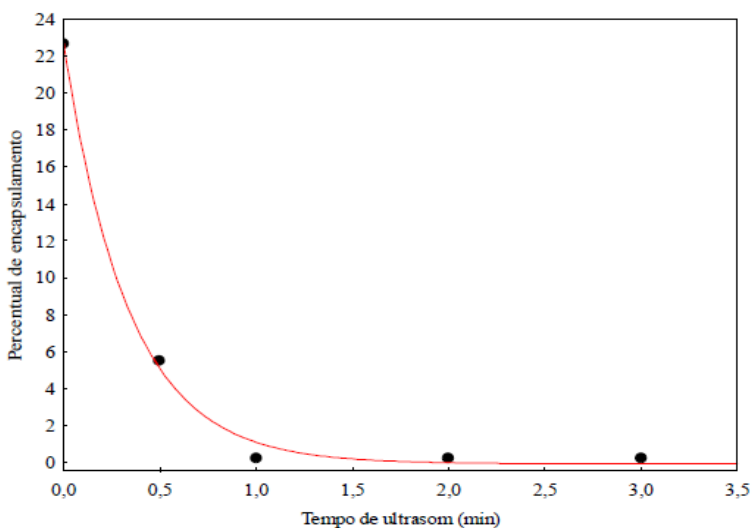


Figura 4.13 - Percentual de encapsulamento em função do tempo de ultra-som.

Fonte: Franceschi (2009).

Para a determinação do percentual real de encapsulamento foi traçada uma reta tangente a curva do percentual de encapsulamento, iniciando na ordenada do gráfico referente ao percentual de

encapsulamento para o tempo zero de ultra-som. A reta tangente continua até tocar a abscissa determinando o tempo de agitação em ultra-som necessário para retirar o β -caroteno não encapsulado (Figura 4.14).

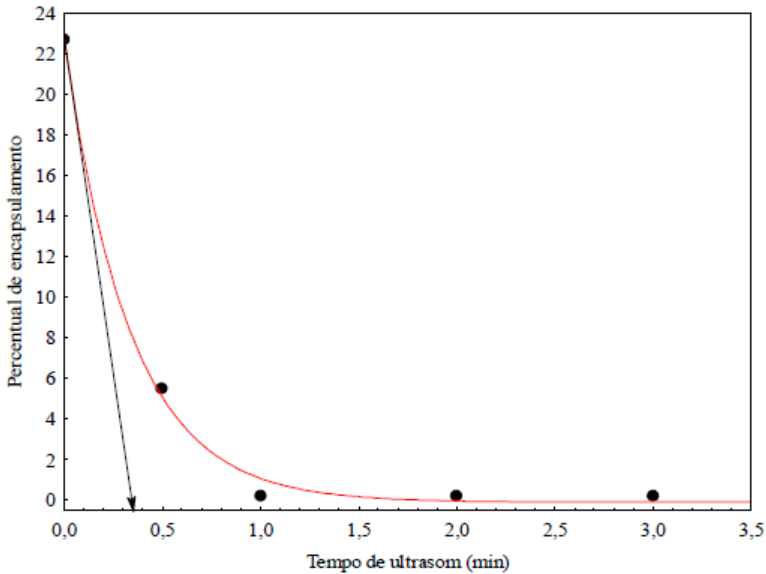


Figura 4.14 - Percentual de encapsulamento em função do tempo de ultra-som.
Fonte: Franceschi (2009).

Com base nas Figuras 4.13 e 4.14 os autores constataram que o percentual real de encapsulamento diminui bastante nos primeiros instantes de lavagem/agitação. Em paralelo, reportam uma analogia deste comportamento com as curvas obtidas por extração, porém de forma invertida, ou seja, no processo de extração supercrítica, as curvas de massa de extrato extraído em função do tempo de extração apresentam-se na forma crescente com o tempo e neste caso, o

percentual de encapsulamento em função do tempo de ultra-som para a retirada do material não encapsulado é uma curva exponencial decrescente com o tempo (Franceschi, 2009).

Franceschi (2009) justifica tal comportamento inferindo que no início do processo de lavagem do material co-precipitado ocorre uma diminuição linear no percentual de encapsulamento, o que significa que somente o β -caroteno livre ou fracamente adsorvido na superfície das partículas de polímero está sendo retirado. Se as amostras do co-precipitado forem deixadas mais tempo sob ultra-som, começa a ocorrer a dissolução do β -caroteno parcialmente encapsulado e em tempos maiores, inicia-se a retirada do β -caroteno encapsulado através da difusão pelos poros das partículas de polímero.

Com base nos resultados obtidos por Franceschi (2009) ao demonstrar o comportamento do percentual real de encapsulamento em função do tempo de lavagem pode-se constatar que nos primeiros instantes de lavagem o material não-encapsulado é removido, representado na figura pelo decréscimo do PRE, e após tempos maiores de lavagem o PRE mantém-se constante. Desta forma, mesmo sendo passível de discussão, este procedimento pode ser considerado válido e eficiente para a remoção do β -caroteno não-encapsulado.

Baseado nos resultados que proporcionaram maiores percentuais reais de encapsulamento obtidos por Franceschi (2009), optou-se, neste trabalho, por fixar a concentração de PHBV na solução no valor de 30 mg.ml^{-1} e variar a concentração de β -caroteno na faixa de 2 a 30 mg.ml^{-1} . Após a realização dos experimentos de co-precipitação, foi efetuada a lavagem do material com acetona, filtração e secagem do material em estufa. O tempo de lavagem foi estudado da seguinte forma:

tempo 20 segundos (onde as amostras do material co-precipitado) foram somente suspensas em acetona e submetidas à agitação manual por 20 segundos; e tempo 5 minutos (onde as amostras foram agitadas com o auxílio de barra magnética por 300 segundos) (mais detalhes no item 3.3.3.1 do Capítulo 3).

A Tabela 4.4 apresenta o planejamento seqüencial com os valores das concentrações de β -caroteno e PHBV na solução orgânica, juntamente com o percentual em massa de β -caroteno em relação à massa total de β -caroteno e PHBV em base livre de solvente orgânico. Ressalta-se a pressão de 80 bar, a temperatura de 40 °C, a vazão de anti-solvente (CO_2) de 40 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ e vazão de solução de 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ foram mantidas constantes.

Tabela 4.4 - Condições experimentais de encapsulamento de β -caroteno em PHBV empregando diclorometano como solvente orgânico e CO_2 como anti-solvente.

Experimento	Concentração de β -caroteno na solução [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Concentração de PHBV na solução [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Percentual em massa de β -caroteno
E1	2,16	30,17	6,68
E2	4,37	30,75	12,45
E3	8,03	30,22	20,99
E3*	8,18	30,63	21,07
E4	10,24	30,02	25,43
E5	12,22	30,10	28,87
E6	14,09	30,17	31,84
E7	16,05	30,24	34,67
E8	30,11	30,70	49,51

* Duplicata do experimento E3.

Como citado anteriormente, adotou-se como procedimento padrão de determinação do teor do material encapsulado neste trabalho, a metodologia empregada por Franceschi *et al.* (2009a). A mesma consiste em determinar o percentual e a eficiência de β -caroteno encapsulado através da suspensão de uma determinada massa deste co-precipitado em um solvente capaz de extrair somente o β -caroteno e realizar a quantificação do material encapsulado por espectrofotometria na região de UV-VIS a 460 nm. Para determinar o teor do β -caroteno encapsulado, são apresentados primeiramente na Tabela 4.5 e Figura 4.15 os valores das concentrações de β -caroteno utilizadas para a construção da curva de calibração e suas respectivas absorbâncias obtidas através de triplicatas das medidas.

Tabela 4.5 - Valores de concentração de β -caroteno em diclorometano e absorbância média (obtida por triplicatas de medida) em espectro de UV-VIS a 460 nm, utilizados para a construção da curva de calibração.

Concentração de β -caroteno [mg.ml ⁻¹]	Absorbância média [UA]	Desvio padrão [UA]
0,0050	0,9263	0,0044
0,0040	0,7601	0,0021
0,0030	0,5900	0,0025
0,0010	0,2096	0,0021
0,0008	0,1795	0,0003
0,0005	0,1070	0,0031
0,0003	0,0662	0,0013
0,0001	0,0299	0,0024

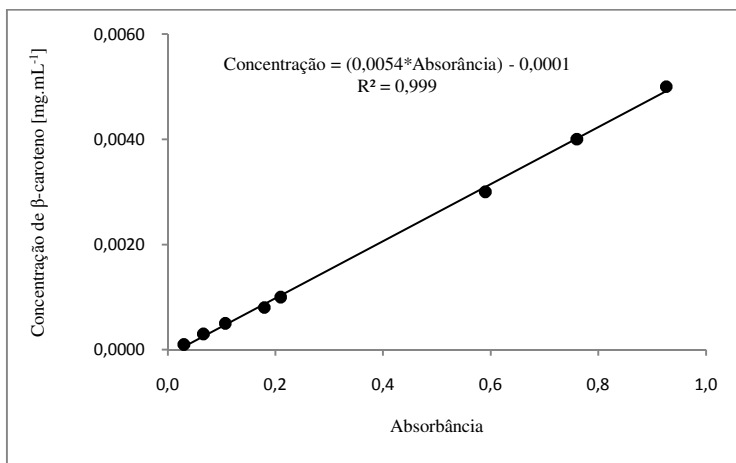


Figura 4.15 - Curva padrão de absorbância de β -caroteno em 460 nm em função da sua concentração em diclorometano.

Os resultados do coeficiente de regressão ($R^2 = 0,999$) indicam que a curva de calibração pode ser aplicada para realizar a quantificação do β -caroteno das amostras co-precipitadas. Com posse de tais informações, foi possível determinar o percentual real e a eficiência de encapsulamento (PRE% e EE%, respectivamente) para as amostras co-precipitadas e submetidas à lavagem com agitação no tempo 20 segundos e 300 segundos (Tabela 4.6). Ressalta-se novamente, que estes valores dos materiais co-precipitados foram obtidos na pressão de 80 bar, temperatura de 40 °C, vazão de anti-solvente (CO_2) de 40 ml.min⁻¹ e vazão de solução de 1 ml.min⁻¹ e concentração de PHBV na solução de 30 mg.ml⁻¹.

Tabela 4.6 - Resultados do percentual real de encapsulamento (PRE) e eficiência de encapsulamento (EE) da co-precipitação de β -caroteno e PHBV.

Experimento	Tempo de agitação [s]	Concentração de β -caroteno na solução [mg.ml ⁻¹]	Concentração de PHBV na solução [mg.ml ⁻¹]	PRE [%]	EE [%]
E1		2,16	30,17	0,12	1,80
E2		4,37	30,75	0,16	1,29
E3		8,03	30,22	0,20	0,95
E3*		8,18	30,63	0,22	1,09
E4	20	10,24	30,02	0,66	2,59
E5		12,22	30,10	2,24	7,75
E6		14,09	30,17	4,53	14,23
E7		16,05	30,24	7,64	22,03
E8		30,11	30,70	27,50	55,54
E1		2,16	30,17	0,04	0,66
E2		4,37	30,75	0,05	0,39
E3		8,03	30,22	0,04	0,22
E4	300	10,24	30,02	---	---
E5		12,22	30,10	---	---
E6		14,09	30,17	---	---
E7		16,05	30,24	8,13	23,45
E8		30,11	30,70	22,31	45,06

* Duplicata do experimento E3.

Pela tabela acima é possível verificar a realização da duplicata do experimento E3, indicando que o aparato experimental e a metodologia aplicada podem ser considerados válidos e aceitáveis para a obtenção dos resultados da etapa de co-precipitação. Na seqüência, a Figura 4.16 apresenta o comportamento da eficiência de encapsulamento em função

da concentração de β -caroteno nas micropartículas co-precipitadas e submetidas a diferentes tempos de lavagem e agitação.

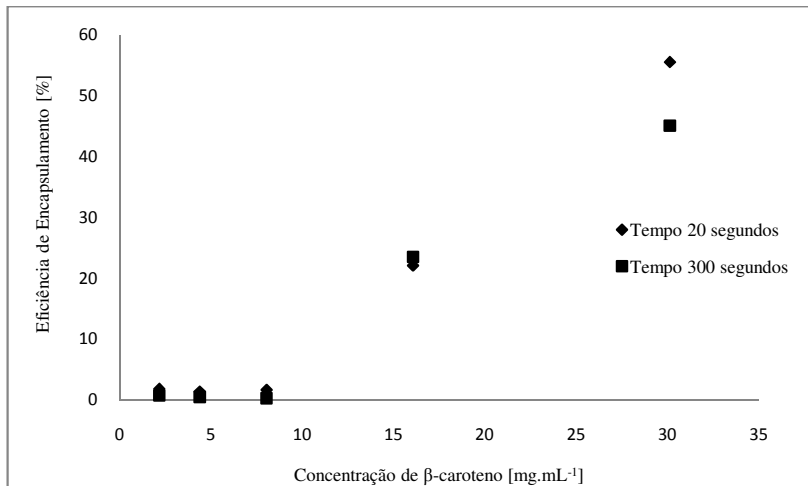


Figura 4.16 – Gráfico comparativo da eficiência de encapsulamento em função da concentração de β -caroteno nas micropartículas co-precipitadas e submetidas a agitação magnética por 20 e 300 segundos.

Pela Figura 4.16 e Tabela 4.6 pode-se observar a influência positiva da concentração de β -caroteno sobre a eficiência do processo de encapsulamento para ambos os tempos de lavagem usados para a remoção do β -caroteno não-encapsulado. Deve-se salientar que, para a obtenção destes resultados, foram realizados procedimentos individuais de lavagem do material co-precipitado para cada condição experimental, respeitando, obviamente, a variável tempo de cada uma das condições. Foi possível verificar uma considerável inclinação na faixa de concentração de β -caroteno que variava de 8 a 16 mg.mL⁻¹ para ambos os tempos de lavagem, e desta forma, três novos experimentos em

concentração teórica de 10, 12 e 14 mg.mL⁻¹, foram conduzidos para verificar o comportamento neste intervalo de concentração nas mesmas condições experimentais citadas no início desta seção, porém somente no tempo de lavagem de 20 segundos (Figura 4.17). Na seqüência a Figura 4.18 apresenta o gráfico comparativo da eficiência de encapsulamento em função da concentração de β -caroteno nas micropartículas co-precipitadas e submetidas à agitação magnética por 20 e 300 segundos.

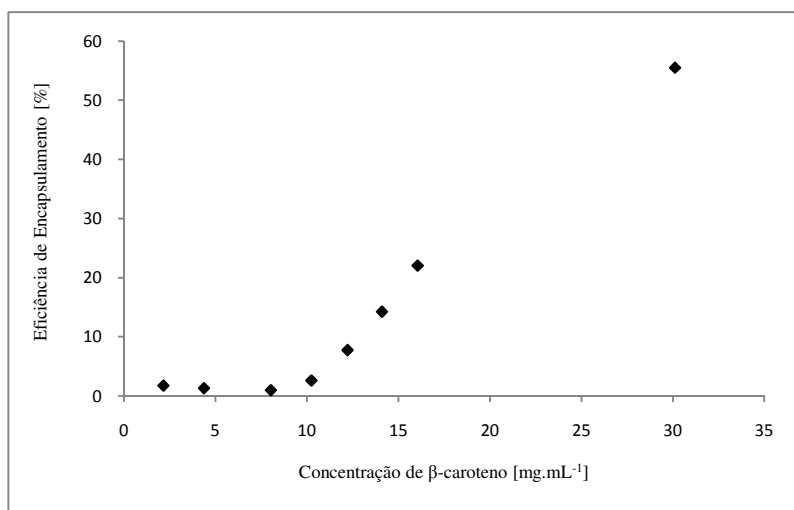


Figura 4.17 – Eficiência de encapsulamento em função da concentração de β -caroteno nas micropartículas co-precipitadas e submetidas a agitação manual por 20 segundos.

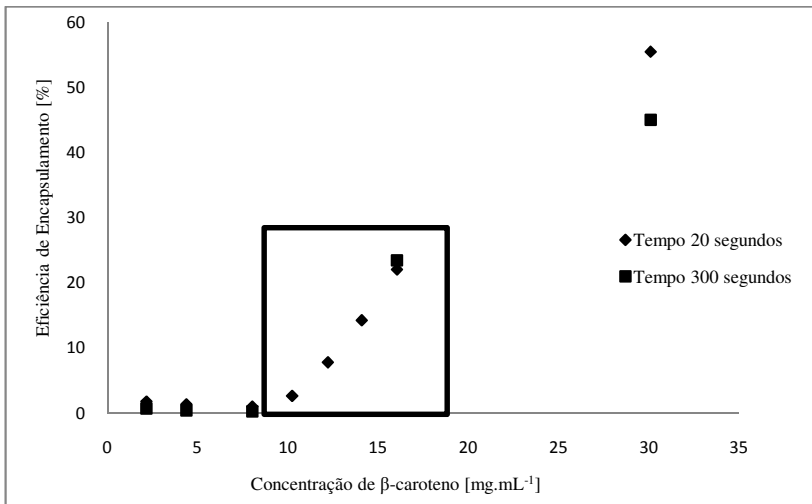


Figura 4.18 – Gráfico comparativo da eficiência de encapsulamento em função da concentração de β -caroteno nas micropartículas co-precipitadas e submetidas a agitação magnética por 20 e 300 segundos.

Pela Figura 4.18 constatou-se que a concentração de β -caroteno segue uma forma exponencial no intervalo teórico de 8 a 16 mg.mL⁻¹. Outra informação importante é com relação ao tempo de lavagem: para todas as concentrações de β -caroteno estudadas verificaram-se maiores eficiências de encapsulamento para o conjunto de experimentos no qual o procedimento de lavagem ocorreu somente pela suspensão das partículas co-precipitadas na solução de acetona e agitadas manualmente no tempo de 20 segundos, com exceção do experimento conduzido a 16 mg.mL⁻¹, que apresentou ordem inversa.

No que diz respeito às percentagens encontradas de β -caroteno encapsulado, pode-se concluir que os valores obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura científica. Exemplos podem ser vistos

no trabalho de Kalogiannis *et al.* (2006) onde os autores reportaram percentuais de encapsulamento de amoxicilina em ácido poli (*L*-lático) na faixa de 0,1 a 21,5% com eficiências de encapsulamento variando entre 0,9 a 42,9%. Kang *et al.* (2008) durante o estudo do encapsulamento de indometacina em uma mistura de ácido poli (*L*-lático) e poli (lactídeo-co-glicolídeo) chegaram a percentuais de encapsulamento da ordem de 2,8% e eficiência de encapsulamento de 14%. Nestes dois trabalhos os autores procedem à lavagem do material co-precipitado para a retirada do princípio ativo não encapsulado semelhante ao procedimento aplicado neste estudo, submetendo somente a amostra resultante à análise do percentual de encapsulamento. No trabalho de Kalogiannis *et al.* (2006), as amostras de co-precipitado foram submetidas a cinco lavagens com etanol e no trabalho de Kang *et al.* (2008) as amostras de co-precipitado foram suspensas em etanol e agitadas por 10 segundos, filtradas e secas em estufa por 24 horas antes de serem submetidas à análise para a determinação do percentual de encapsulamento.

Em comparação ao estudo realizado por He *et al.* (2007), constatou-se que o percentual de encapsulamento máximo encontrado neste trabalho apresentou-se ligeiramente superior ao encontrado pelos autores, o qual foi de 50 %. Entretanto, deve-se salientar que após a realização dos experimentos de co-precipitação de caroteno natural e polietileno-glicol empregando diclorometano como solvente orgânico e CO₂ como anti-solvente, os autores não procederam à etapa de retirada de caroteno não-encapsulado, ou seja, realizaram a determinação do percentual de encapsulamento das amostras co-precipitadas apenas dissolvendo-as em diclorometano e analisando-as em espectrofotômetro

de UV-VIS. Assim, além do material realmente encapsulado considerou-se caroteno encapsulado aquele fracamente aderido à superfície das partículas do polímero.

Por fim, ao comparar os valores dos percentuais de encapsulamento deste trabalho com o de Franceschi (2009) nas mesmas condições de co-precipitação, ou seja, na faixa de concentrações de β -caroteno de 2 a 8 mg.ml⁻¹, verificou-se que no intervalo de tempo estudado pelo autor para a etapa de lavagem de 12,15 a 37,32 segundos, os percentuais de encapsulamento encontrados neste trabalho apresentaram-se inferiores. Entretanto, conforme visto em seu trabalho deve-se ter precaução com relação ao tempo utilizado na etapa da lavagem do material co-precipitado, devido ao fato já mencionado de que no início do procedimento, com algumas micropartículas de β -caroteno livre ou fracamente adsorvidas na matriz polimérica aliada a rápida extração do carotenóide pode ocorrer erros superestimar a medida da eficiência de encapsulamento.

A fim de visualizar a estrutura das micropartículas co-precipitadas que foram submetidas posteriormente à etapa de liberação *in vitro*, bem como evidenciar o efeito do processo de lavagem com acetona para remoção do material não-encapsulado, são apresentadas nas Figuras 4.19, 4.20 e 4.21 as micrografias obtidas em alguns experimentos mencionados na Tabela 4.6, especificamente para o tempo de lavagem de 20 segundos.

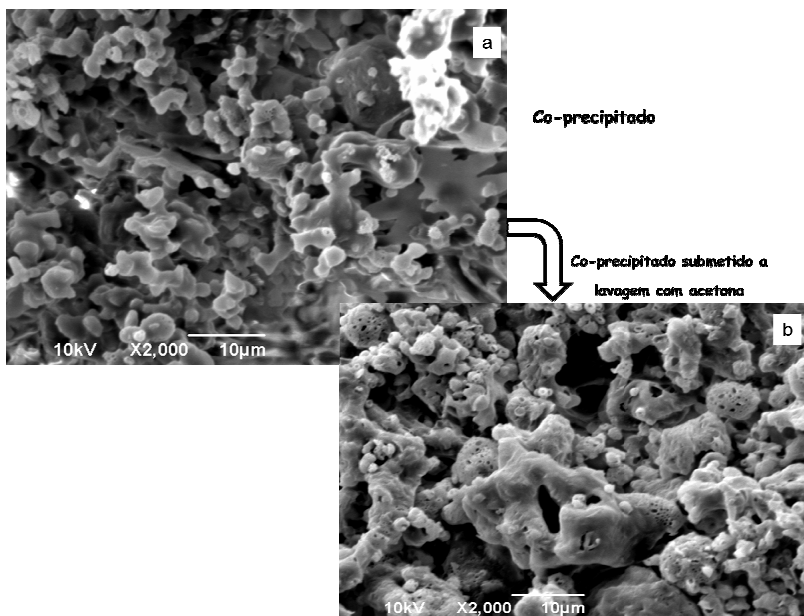


Figura 4.19 - Micrografias de MEV (ampliação de 2000x) das micropartículas co-precipitadas de acordo com as condições do experimento E8 e submetidas ao processo de lavagem (20 segundos) para remoção do material não-encapsulado.

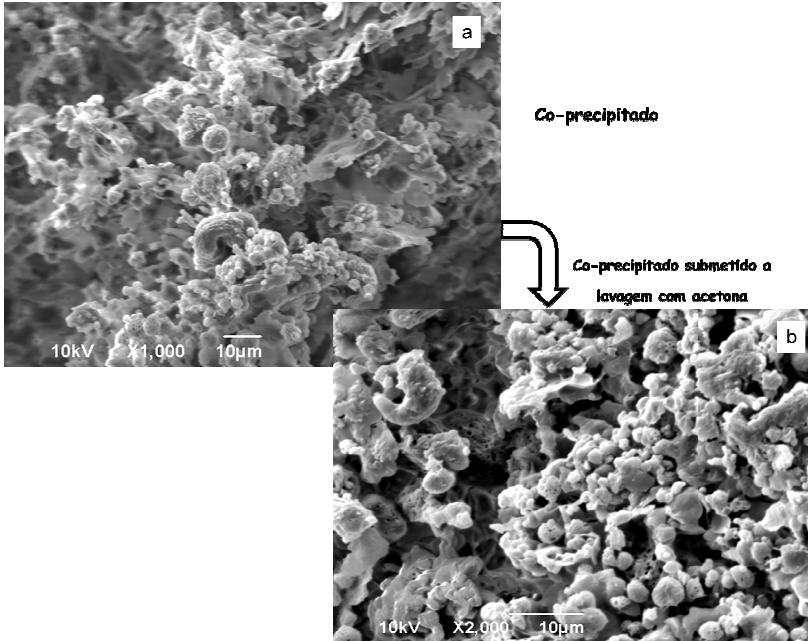


Figura 4.20 - Micrografias de MEV das micropartículas co-precipitadas de acordo com as condições do experimento E7 e submetidas ao processo de lavagem (20 segundos) para remoção do material não-encapsulado: a) ampliação de 1000x e b) ampliação de 2000x.

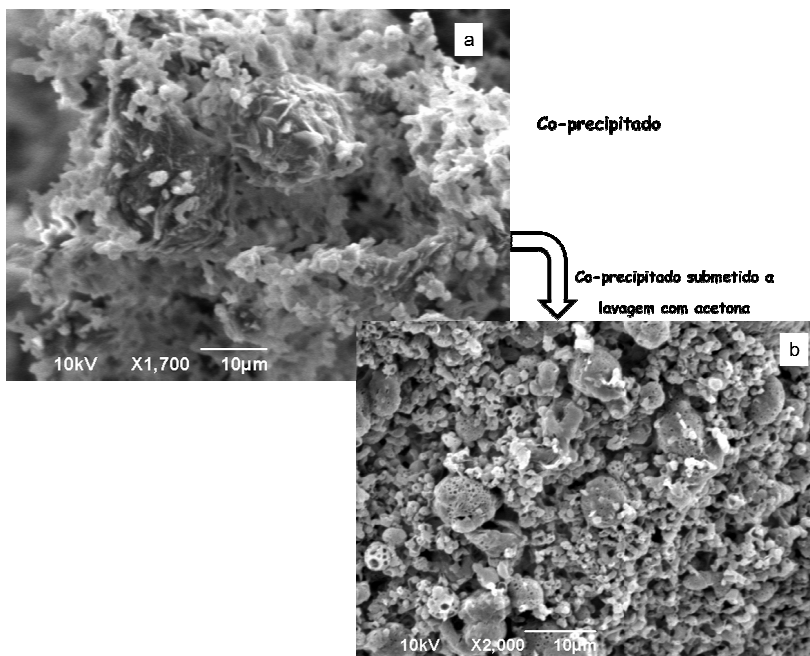


Figura 4.21 - Micrografias de MEV (ampliação de 2000x) das micropartículas co-precipitadas de acordo com as condições do experimento E6 e submetidas ao processo de lavagem (20 segundos) para remoção do material não-encapsulado: a) ampliação de 1700x e b) ampliação de 2000x.

Com base nas micrografias 4.19, 4.20 e 4.21 é possível inferir que visualmente, a acetona mostrou-se eficiente na remoção do material não-encapsulado, pois inicialmente as micropartículas apresentam-se com maior aglomeração, e ao final do tratamento de lavagem a morfologia é predominantemente esférica, com superfície porosa e poucas conexões entre as partículas. Ressalta-se que estas partículas submetidas à etapa de lavagem para remoção do material não

encapsulado foram utilizadas na seqüência para a determinação dos comportamentos de liberação *in vitro*.

4.6 – Comportamentos de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos referentes aos comportamentos de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV e submetidas a diferentes meios de dissolução, como acetato de etila, hexano, etanol anidro e solução tampão fosfato (pH 7,4) na temperatura de 40 °C e 80 rpm conforme procedimento experimental citado no item 3.3.4 do Capítulo 3. Ressalta-se que foram estudados os comportamentos de dissolução para os experimentos E5, E6, E7 e E8 mencionados na Tabela 4.6, uma vez que estes apresentaram os maiores percentuais reais e eficiências de encapsulamento.

O memorial das tabelas e figuras contendo os valores das concentrações de β -caroteno utilizadas para a construção das curvas de calibração e suas respectivas absorbâncias médias para os meios de dissolução são encontradas no Apêndice A desta tese. Ainda, na mesma seção são apresentadas as tabelas que contemplam os ensaios de dissolução, contendo as absorbâncias médias, as concentrações liberadas nos intervalos de tempo e os percentuais de liberação (em relação às respectivas massas iniciais de β -caroteno encapsulado utilizada em cada ensaio).

A Figura 4.22 e 4.23 apresentam os resultados mencionados na Tabela A1 relativos aos comportamentos de dissolução *in vitro* das

partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV e submetidas ao meio contendo acetato de etila na temperatura de 40 °C e 80 rpm em termos de concentração de β -caroteno *versus* tempo e percentagem liberada *versus* tempo, respectivamente. Optou-se por apresentar os resultados desta forma a fim de estabelecer uma comparação entre as diferentes concentrações de β -caroteno estudadas.

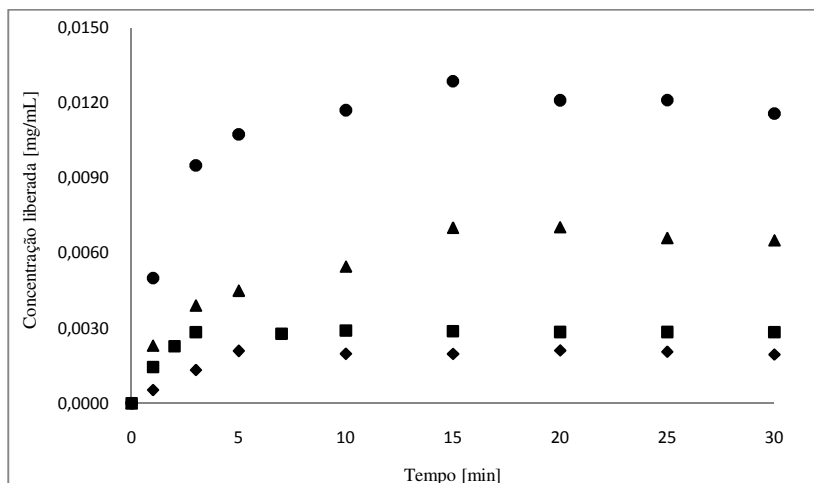


Figura 4.22 – Comportamentos de dissolução *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em acetato de etila na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; ▲, E7; ■, E6; ◆, E5).

Pela Figura acima constatou-se que os comportamentos de dissolução para todas as concentrações de β -caroteno apresentaram-se semelhantes e em aproximadamente 10 minutos o sistema atinge um patamar de liberação constante variando de 26,97 a 71,15 %. Percebe-se que a concentração liberada em ambos os ensaios é proporcional à massa inicial de β -caroteno uma vez que a massa de PHBV foi sempre

mantida constante. Verificou-se também um *burst* (alta quantidade do princípio ativo liberada rapidamente) inicial nos primeiros minutos de liberação, o que pode ser explicado pela pronunciada solubilidade do sistema composto por β -caroteno e PHBV em acetato de etila.

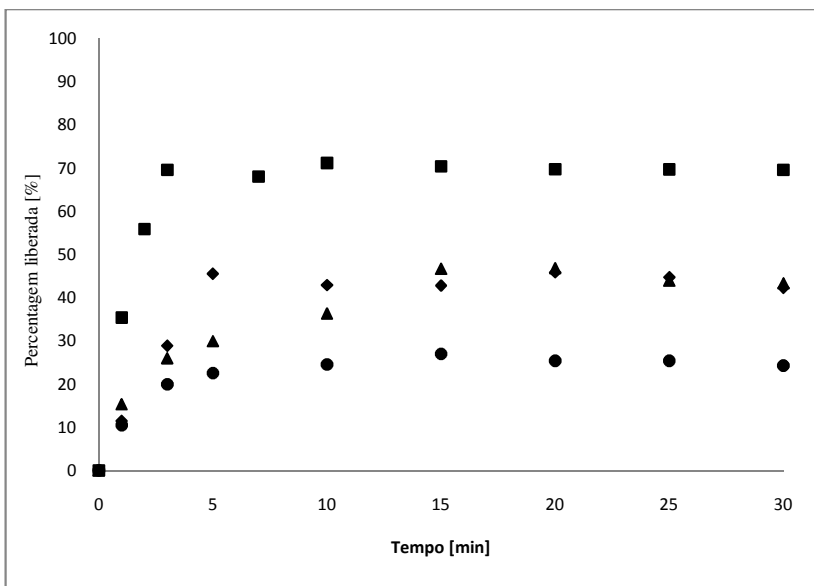


Figura 4.23 – Comportamentos de dissolução *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em acetato de etila na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; ▲, E7; ■, E6; ◆, E5).

Com base na Figura 4.23 constatou-se que as porcentagens liberadas apresentam um comportamento diferente em relação às concentrações de β -caroteno em função do tempo, ou seja, a partir destas informações é possível inferir que quanto maior a quantidade inicial de β -caroteno conseqüentemente maior será a sua concentração liberada, porém as porcentagens do princípio ativo não seguem

necessariamente o mesmo comportamento em ordem crescente de liberação.

Na seqüência, a Figura 4.24 e 4.25 apresentam os comportamentos de dissolução *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV e submetidas ao meio contendo n-hexano na temperatura de 40 °C e 80 rpm em termos de concentração de β -caroteno *versus* tempo e percentagem liberada *versus* tempo, respectivamente. Da mesma forma, os valores detalhados concernentes à dissolução *in vitro* para este solvente orgânico podem ser encontrados no Apêndice A desta tese.

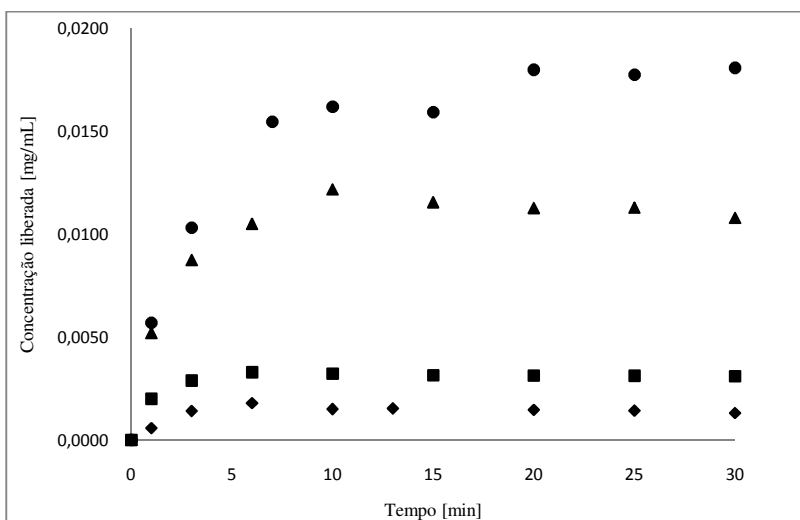


Figura 4.24 – Comportamentos de dissolução *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em n-hexano na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; ▲, E7; ■, E6; ◆, E5).

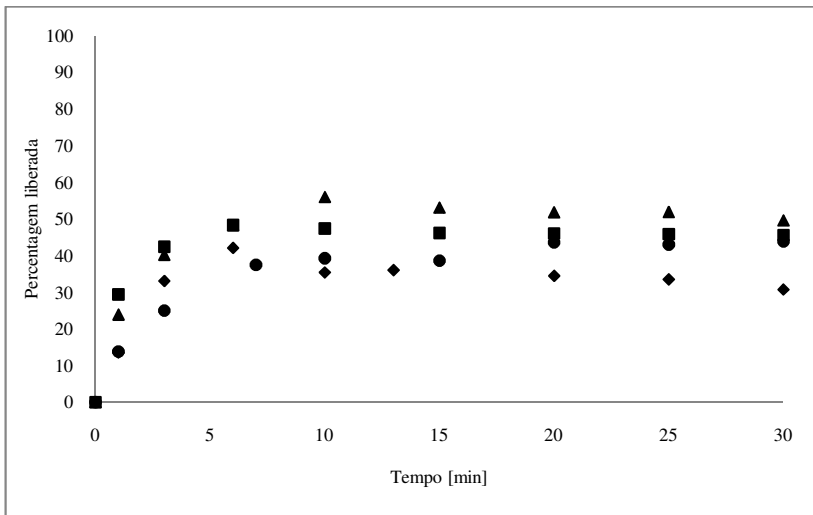


Figura 4.25 – Comportamentos de dissolução *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em n-hexano na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; ▲, E7; ■, E6; ◆, E5).

Para os ensaios de dissolução *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em n-hexano, percebeu-se um comportamento similar aos perfis obtidos na liberação em meio contendo acetato de etila. Em até 10 minutos de liberação, ocorreu um *burst* inicial onde grande concentração do princípio ativo encapsulado foi liberada e nos intervalos seguintes a liberação permanece constante. Com os resultados encontrados nesta etapa, pode-se inferir que o β -caroteno apresenta solubilidade semelhante tanto neste solvente lipofílico quanto em acetato de etila (ver Tabela 3.1). Em todos os ensaios foi obtida a liberação máxima após os 10 minutos iniciais e os percentuais de liberação também foram semelhantes aos ensaios conduzidos em acetato de etila, porém neste caso de 42,09 a 55,96 %.

Novamente para o n-hexano, constatou-se que as percentagens liberadas do princípio ativo não seguiram o mesmo comportamento em ordem crescente de liberação na medida em que se aumenta a concentração inicial de β -caroteno.

A Figura 4.26 apresenta na seqüência, os perfis de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em etanol anidro na temperatura de 40 °C e 80 rpm em termos de concentração liberada *versus* tempo.

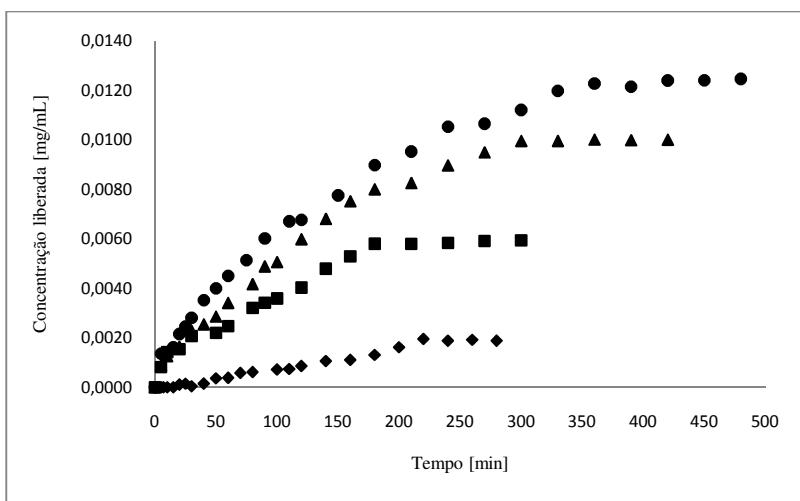


Figura 4.26 - Perfis de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em etanol anidro na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; ▲, E7; ■, E6; ◆, E5).

Com base na Figura 4.26 constatou-se que neste em etanol anidro a liberação ocorreu de forma mais lenta em relação àquelas realizadas em acetato de etila e n-hexano e que neste meio não ocorreu o *burst*

inicial onde grande quantidade do princípio ativo encapsulado é liberada nos minutos iniciais.

No experimento E5 (com concentração teórica de β -caroteno de 12 mg/ml) foi liberado 45,27 % do material encapsulado e no ensaio E6 (com concentração teórica de β -caroteno de 14 mg/ml) este percentual atingiu 79,41 %, ambos estabilizando suas liberações no tempo de 180 minutos. Para o experimento E7 (com concentração teórica de β -caroteno de 16 mg/ml) foi liberado 88,23 % do princípio ativo em 300 minutos, mantendo-se constante na seqüência dos intervalos.

Especificamente para o experimento E8 (com concentração teórica de β -caroteno de 30 mg/ml) verificou-se que mesmo após decorrido o tempo de 480 minutos o material encapsulado continuava a ser liberado, aumentando sua concentração no meio. Desta forma, novos intervalos foram determinados retirando e analisando as amostras até sua liberação constante. A Figura 4.27 apresenta o comportamento completo do experimento E8 após 16 dias de liberação em etanol anidro constatando um comportamento mais lento e controlado, totalizando 82,48 % de liberação de todo o princípio ativo previamente encapsulado.

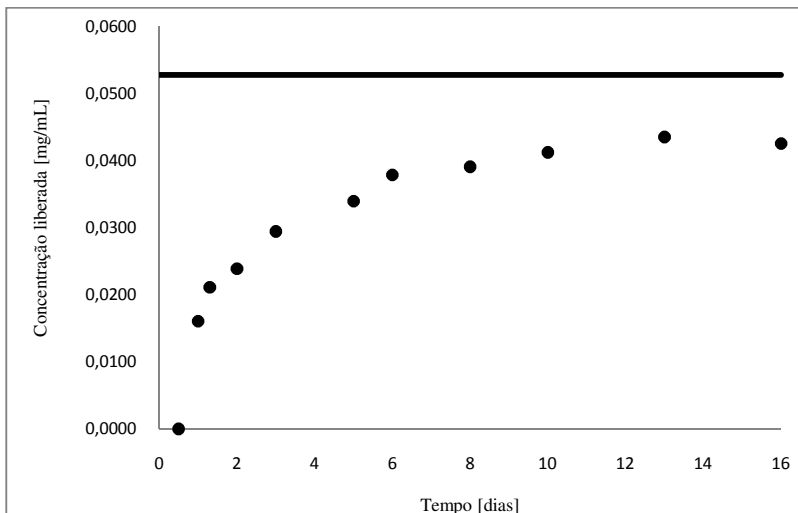


Figura 4.27 - Perfis de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em etanol anidro na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; —, concentração máxima).

Pela Figura 4.27 percebeu-se que este maior tempo de liberação pode ter ocorrido em função de uma menor solubilidade do sistema β -caroteno e PHBV em etanol anidro, uma vez que todo o material encapsulado apresentou longo tempo de liberação, ou seja, lentamente o princípio ativo se difunde através das paredes do polímero e é colocado em contato direto com o meio de dissolução. Em etanol anidro também foi possível constatar outras diferenças entre os ensaios, onde nos meios contendo acetato de etila e n-hexano foi possível verificar apenas diferenças entre as concentrações iniciais de β -caroteno (em relação à concentração total liberada), neste verificou-se que a razão entre a concentração do agente encapsulante e o princípio ativo influenciou diretamente no tempo de liberação, ou seja, em função desta variável

pode-se optar por um sistema com liberação lenta (gradual) ou rápida. Novamente, com objetivo comparativo, a figura abaixo demonstra os mesmos perfis de liberação *in vitro* em termos de percentagens liberadas *versus* tempo.

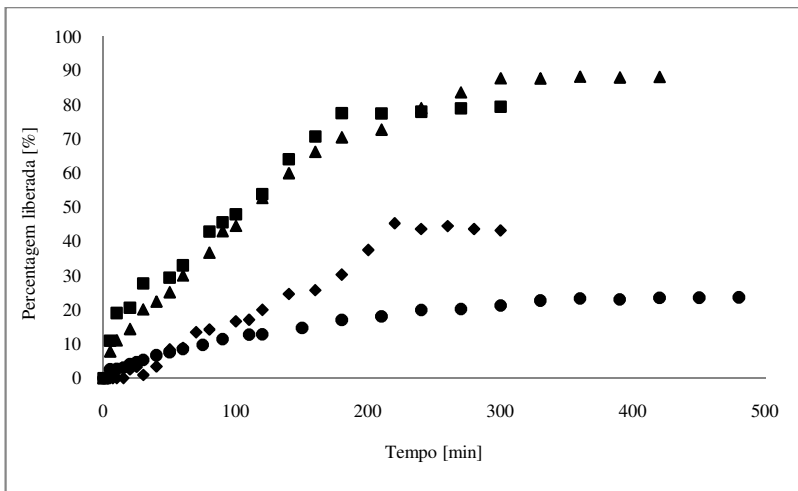


Figura 4.28 - Perfis de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em etanol anidro na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; ▲, E7; ■, E6; ◆, E5).

Pela Figura 4.28 que representa o comportamento de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV em etanol anidro também foi possível constatar que as percentagens liberadas apresentaram um comportamento diferente das concentrações de β -caroteno em função do tempo. Em síntese, para todos os solventes orgânicos é possível concluir que quanto maior a quantidade inicial de β -caroteno conseqüentemente maior será a sua concentração liberada, entretanto, as percentagens deste princípio ativo não seguem

necessariamente o mesmo comportamento. Acredita-se que estes resultados que confrontam as informações concernentes às concentrações liberadas e suas respectivas percentagens em função do tempo são de fundamental importância para auxiliar tanto na escolha da razão entre o β -caroteno/PHBV quanto na seleção do solvente orgânico utilizado como meio de liberação.

Como mencionado anteriormente, nenhum trabalho seqüencial foi encontrado na literatura com referência a etapa de co-precipitação de β -caroteno em PHBV usando a técnica *SEDS* e seus comportamentos de liberação em diferentes meios. Entretanto, trabalhos usando outros biopolímeros e princípios ativos podem ser listados, como o de Kang *et al.* (2008) no qual os autores estudaram o comportamento de liberação *in vitro* de indometacina encapsulada em poli(*L*-ácido lático)/poli(ácido lático-co-ácido glicólico) usando a técnica *SEDS*. Foi encontrada uma liberação de 83,67 % após 30 dias de ensaios das amostras submetidas à solução tampão fosfato salino (ph 6,8), agitação de 60 rpm e temperatura de 37 °C.

Wang *et al.* (2009) ao investigarem o comportamento de liberação de *p*-nitroanilina e rodamina B encapsuladas em microesferas de ϵ -caprolactona (PCL), constataram que em ambos os princípios ativos ocorreu uma liberação de aproximadamente 80 % depois de 5 dias quando submetidas ao meio contendo solução tampão salina (pH 7,4) e temperatura de 37 °C. Os autores mencionam que a solubilidade dos princípios ativos em água é um indicativo de sua afinidade com o polímero usado para seu encapsulamento devido à sua hidrofobicidade, ou seja, quanto maior a afinidade entre o princípio ativo e o polímero, mais forte é a tendência para que o composto se incorpore neste

polímero aumentando conseqüentemente sua eficiência de encapsulamento. Este fato é evidenciado neste trabalho, pois o β -caroteno apresenta baixa solubilidade em água e foram obtidas altas eficiências de encapsulamento e em paralelo, estas eficiências foram maiores na medida em que se aumentavam as concentrações de β -caroteno (mantendo-se fixas as concentrações de PHBV). Por outro lado, princípios ativos com alta solubilidade em água tendem a localizarem-se próximos à superfície do polímero fazendo com que rapidamente sejam liberados, provocando o *burst*.

Em resumo, pode-se inferir que a poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e o poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) são biopolímeros que apresentam características semelhantes uma vez que ambos podem ser considerados como polímeros relativamente hidrofóbicos e esta maior afinidade entre o princípio ativo e o agente encapsulante causa forte tendência para que o composto seja incorporado no polímero aumentando sua eficiência de encapsulamento e conseqüentemente seu tempo de liberação.

Visando uma comparação global entre os perfis de liberação mencionados acima e no Capítulo 2, foram conduzidos novos ensaios de liberação para as partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetendo-as ao meio contendo solução tampão fosfato (pH 7,4) na temperatura de 40 °C e agitação de 80 rpm. A Figura 4.29 apresenta os perfis de liberação referentes aos experimentos E5, E7e E8 em termos de absorbância *versus* tempo.

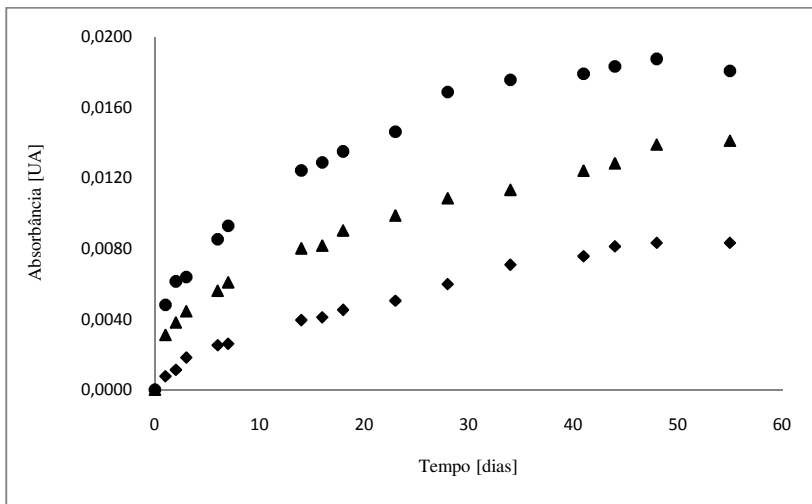


Figura 4.29 - Perfis de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em solução tampão fosfato (pH 7,4) na temperatura de 40 °C e 80 rpm. (●, E8; ▲, E7; ◆, E5).

Pela figura acima nota-se que os resultados são expressos em termos de absorbância *versus* tempo de liberação, ao contrário daqueles apresentados anteriormente. Tal fato deu-se devido à alta imprecisão na determinação das concentrações de β -caroteno liberadas nos intervalos de tempo. Como o sistema composto por β -caroteno e PHBV é altamente hidrofóbico, as quantidades do princípio ativo eram liberadas lentamente e ao se comparar as absorbâncias pontuais com aquelas da curva padrão, obtinham-se valores próximos aos da solução tampão pura (branco) ocasionando erros acumulativos nas determinações das concentrações de β -caroteno através da espectrofotometria na região de UV-VIS. Porém, visualmente através dos perfis encontrados, constata-se que o sistema apresentou uma liberação controlada e prolongada, onde

mesmo após 60 dias de ensaio o princípio ativo continuou a ser liberado. Novamente, como nos outros meios estudados, à medida que se aumenta a concentração inicial do β -caroteno (mantendo a concentração de PHBV constante) aumenta sua concentração liberada nos intervalos de tempo.

A fim de verificar a repetibilidade dos experimentos de liberação, foram conduzidos dois ensaios para o experimento E8 em acetato de etila e em n-hexano adotando todos os procedimentos mencionados anteriormente (lavagem e secagem do material encapsulado, preparação dos meios e procedimentos de análise) avaliando sua liberação. Ressalta-se que estes novos ensaios foram realizados em dias diferentes, porém com massas iniciais de material encapsulado próximas àquelas estudadas nos ensaios anteriores. A Figura 4.30 apresenta ambos os perfis das partículas submetidas à liberação em acetato de etila e em n-hexano na temperatura de 40 °C e 80 rpm para o experimento E8. Os resultados das concentrações liberadas bem como os desvios em relação àquelas inicialmente obtidas são encontrados no Apêndice A.

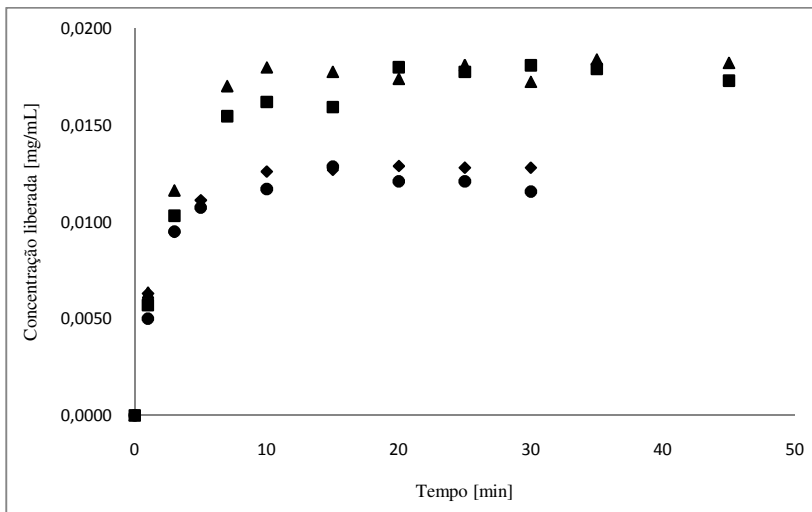


Figura 4.30 – Perfis de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução na temperatura de 40 °C e 80 rpm para o experimento E8: em hexano: ■, concentrações iniciais (ver Tabela 4.12); ▲, réplicas; em acetato de etila: ●, concentrações iniciais (ver Tabela 4.10); ◆, réplica.

Pela Figura 4.30 percebem-se as proximidades entre as concentrações iniciais e as réplicas dos experimentos, confirmados pelos baixos desvios apresentados na Tabela A7. Para a dissolução em acetato de etila foram liberados 23,87 % do princípio ativo encapsulado, valor menor aos 31,50 % encontrado inicialmente e, para a liberação em n-hexano, esta diferença entre os percentuais foi menor, sendo que os ensaios iniciais apresentaram um percentual de liberação de 43,86 % e sua réplica obteve um valor de 40,15 %. Estes resultados podem ser considerados satisfatórios uma vez que todas as etapas que envolvem a liberação do princípio ativo encapsulado podem influenciar diretamente

no resultado final, como por exemplo, a lavagem e secagem do material encapsulado, os procedimentos de retirada e reposição do meio de dissolução e por fim as análises que determinam a concentração liberada do β -caroteno.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1 – CONCLUSÕES

Neste trabalho foram apresentados estudos sobre a etapa de precipitação e encapsulamento de β -caroteno em PHBV utilizando diclorometano como solvente orgânico e dióxido de carbono pressurizado como anti-solvente. Os experimentos foram realizados em uma unidade de bancada empregando a técnica SEDS (Dispersão da Solução Expandida pelo Fluido Supercrítico). Na seqüência, iniciou-se uma nova etapa de estudos na qual foram obtidas informações a respeito da dissolução das partículas co-precipitadas em diferentes meios. As conclusões e considerações desta tese são apresentadas abaixo:

- Na precipitação do PHBV puro, o efeito da pressão foi verificado onde constatou-se que o mesmo apresenta efeito negativo com relação ao tamanho médio das partículas, ou seja, um aumento da pressão indica a tendência de redução no tamanho médio de partículas. A morfologia não foi influenciada pela ação desta variável, apenas obteve-se comportamento diferente do PHBV não processado, o qual inicialmente tinha morfologia fibrosa passando após a precipitação para estrutura do tipo esfera.
- Para o β -caroteno puro foi investigado o efeito da sua concentração na solução e também da pressão de precipitação.

Verificou-se que mantendo a concentração da solução fixa, ocorre um aumento do tamanho médio das partículas de β -caroteno com o aumento da pressão e que no intervalo de pressão de 80 a 160 bar as partículas apresentam valores crescentes e na faixa de 160 a 200 bar o valor médio do tamanho das partículas decresce.

- Na etapa de encapsulamento, na concentração de solução de 30 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de β -caroteno, foram obtidas as eficiências máximas de encapsulamento de 55,53 % e 45,06 %, respectivamente para os tempos de lavagem de 20 segundos e 300 segundos. Na faixa de concentração de 8 a 16 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de β -caroteno foi observado um comportamento exponencial da eficiência de encapsulamento em função da concentração de β -caroteno.
- Foi conduzida uma duplicata de experimento (E3) com concentração de β -caroteno de 8,18 mg/ml mantendo-se fixa a concentração de PHBV na solução (30 mg/ml) a fim de verificar a reprodutibilidade do aparato experimental e da etapa de determinação do percentual real de encapsulamento (PRE). Constatou-se que o aparato experimental e os métodos de determinação do material encapsulado podem ser considerados aceitáveis e válidos para a obtenção dos resultados da etapa de co-precipitação.
- Os comportamentos de liberação *in vitro* indicaram que em acetato de etila e n-hexano, as dissoluções são caracterizadas por um *burst* inicial (10 minutos) na qual grande parte do princípio ativo é liberada. Para ambos os solventes orgânicos constatou-se que a concentração liberada é proporcional a massa

inicial de β -caroteno. Em média, foram obtidos percentuais de liberação que variaram de 26,97 % a 71,15 %, e de 42,09 % a 55,96 %, para os meios puros contendo acetato de etila e n-hexano, respectivamente.

- Em etanol anidro o comportamento de liberação apresentou-se diferente, pois não foi verificado o *burst* inicial e a liberação ocorreu de forma gradual e lenta. Para as concentrações de β -caroteno de 12 e 14 mg/ml as concentrações máximas foram obtidas em 180 minutos com percentuais que variaram de 45,27 % a 79,41 % e na concentração de 16 mg/mL, este máximo foi verificado em 300 minutos com percentual de liberação de 88,23 %. Na concentração de β -caroteno de 30 mg/ml foi encontrado o maior tempo de liberação (16 dias), sendo que o princípio ativo foi 82,48 % liberado.
- Em meio contendo solução tampão fosfato (pH 7,4) não foi possível obter valores das concentrações nos intervalos de tempo. Entretanto, pelos resultados expressos em termos de absorvância e tempo constatou-se que as quantidades do princípio ativo foram liberadas de forma controlada e prolongada (60 dias de ensaio).
- Por fim ressalta-se que os objetivos desta tese de doutorado foram plenamente atingidos obtendo-se partículas de β -caroteno e PHBV puras precipitadas na faixa micrométrica permitindo a co-precipitação com bons percentuais de encapsulamento. Com base nos comportamentos de liberação *in vitro* foi possível indicar que dependendo do meio de dissolução e da razão entre

agente encapsulante/princípio ativo podem-se obter liberações controladas (gradual ou rápida) bem como, diferentes percentuais de liberação. Neste contexto, acredita-se que foram levantadas informações relevantes, principalmente em relação aos comportamentos de liberação, os quais poderão ser utilizados em diferentes estudos e aplicações industriais no setor farmacêutico ou alimentício.

5.2 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Abaixo são descritas algumas sugestões, idéias e hipóteses para continuidade deste trabalho:

- Estudo de outros biopolímeros para possível utilização como agentes encapsulantes, como por exemplo, poli-caprolactona, PHBV:PCL a fim de verificar seu comportamento durante o processo de precipitação e co-precipitação;
- Promover outras formas de contato entre o soluto e o solvente dentro da câmara de precipitação e verificar sua influência direta no tamanho de partículas;
- Estudar os fenômenos que envolvem o processo de precipitação/encapsulamento;
- Desenvolver uma metodologia de retirada do material precipitado e co-precipitado dentro da câmara evitando possíveis alterações;
- Realizar estudos com outros solventes na etapa de liberação, variando temperatura e agitação;

- Desenvolver uma metodologia de aplicação do β -caroteno encapsulado em materiais ou substâncias que permitam verificar a influência deste no que diz respeito às características antioxidantes;
- Modelagem matemática dos perfis de liberação do princípio ativo que contemple as representações adequadas dos mecanismos envolvidos nesta etapa;
- Iniciar estudos com outros princípios ativos;

CAPÍTULO 6

6.1 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBRÓSIO, C.L.B.; SIQUEIRA CAMPOS, F.A.C.; FARO, Z.P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Revista de Nutrição*, 19, 233-243, 2006.
- BAHRAMI, M.; RANJBARIAN, S. Production of micro and nano-composite particles by supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 40, 263–283, 2007.
- BECKMAN, E.J. Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. *Journal of Supercritical Fluids*, 28, 121-191, 2004.
- BENEDETTI, L.; BERTUCCO, A.; PALLADO, P. Production of micronic particles of biocompatible polymer using supercritical carbon dioxide. *Biotechnology and Bioengineering*, 53, 232–237, 1997.
- BOOTH, S.L.; JOHNS, T.; KUHNLEIN, H.V. Natural food sources of vitamin A and provitamin A. *Food and Nutrition Bulletin*, 14, 6-19, 1992.
- CHANG, C.J.; RANDOLPH, A.D.; CRAFT, N.E. Separation of β -carotene mixtures precipitated from liquid solvents with high-pressure CO₂. *Biotechnology Progress*, 7, 275 – 278, 1991.
- CARDOSO, M.A.T.; ANTUNES, S.; VAN KEULEN, F.; FERREIRA, B.S.; GERALDES, A.; CABRAL, J.M.S.; PALAVRA, A.M.S. Supercritical antisolvent micronisation of synthetic all-*trans*- β -carotene with tetrahydrofuran as solvent and carbon dioxide as antisolvent. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 815-822, 2009.

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

CHATTOPADHYAY P.; GUPTA R.B. Production of antibiotic nanoparticles using supercritical CO₂ as antisolvent with enhanced mass transfer. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 40, 3530, 2001.

CHEN, K.; ZHANG, X.; PAN, J.; YIN, W. Recrystallization of andrographolide using the supercritical fluid antisolvent process. *Journal of Crystal Growth*, 274, 226-323, 2005.

CHONG, G.H.; YUNUS, R.; ABDULLAH, N.; CHOONG, T.S.Y.; SPOTAR, S. Coating and Encapsulation of Nanoparticles using Supercritical Antisolvent. *American Journal of Applied Sciences*, 7, 1352-1358, 2009.

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

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

DAVEY, M.W.; SAEYS, W.; HOF, E.; RAMON, H.; SWENNEN, R.; KEULEMANS, J. Application of Visible and Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (Vis/NIRS) to Determine Carotenoid Contents in Banana (*Musa spp.*) Fruit Pulp. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 1742-1751, 2009.

DILLOW, A. K.; DEGHANI, F.; FOSTER, N.; HRKACH, J.; LANGER, R. S. Production of Polymeric Support Materials Using a Supercritical Fluid Anti-solvent Process. *The 4th International Symposium on Supercritical Fluids*, 247-250, 1997.

DIXON, D.J.; JOHNSTON, K.P.; BODMEIER, R.A. Polymeric Materials Formed by Precipitation with a Compressed Fluid Antisolvent. *AIChE Journal*, 39, 127-139, 1993.

EMBLETON, J.K. e TIGUE, B.J. Polymers for biodegradable medical devices XI. Microencapsulation studies: characterization of hydrocortisone-loaded poly (hydroxybutyratehydroxyvalerate) microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 19, 737-752, 2002.

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

FRANCESCHI, E. Recristalização de teofilina empregando dióxido de carbono pressurizado como anti-solvente. *Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim*, 119 páginas, 2006.

FRANCESCHI, E.; KUNITA, M.H.; TRES, M.V.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E.C.; CORAZZA, M.L.; DARIVA, C. FERREIRA, S.R.S. e Oliveira, J.V. Phase behavior and process parameters effects on the characteristics of precipitated theophylline using carbon dioxide as antisolvent. *Journal of Supercritical Fluids*, 44, 8-20, 2008.

FRANCESCHI, E. Precipitação e encapsulamento de β -caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica. *Tese de doutorado apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina*, 2009.

FRANCESCHI, E.; CESARO, A.M.; FEITEN, M.; FERREIRA, S.R.S. DARIVA, C.; KUNITA, M.H.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E.C.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.V. Precipitation of β -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 47, 259-269, 2009a.

FRANCESCHI, E.; CESARO, A.M.; FERREIRA, S.R.S.; OLIVEIRA, J.V. Precipitation of β -carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO₂. *Journal of Food Engineering*, 95, 656-663, 2009b.

FREITAS, S.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of

microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*, 102, 313-332, 2005.

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

GURSEL I., YAGMURLU, F., KORKUSUZ, F. e HASIRCI, V. In vitro antibiotic release from poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) rods. *Journal of Microencapsulation*, 19, 153-164, 2002.

HANNA, M. York, P., Patent WO 98/36825, 1998.

HANNAY, J. B.; HOGARTH, J. On the solubility of solids in gases. *Proc. Roy. Sec.*, 29, 324, 1879.

HE, W.Z.; SUO, Q.L.; HONG, H.L.; LI, G.M.; ZHAO, X.H.; LI, C. P.; SHAN, A. Supercritical antisolvent micronization of natural carotene by the SEDS process trough prefilming atomization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45, 2108-2115, 2006.

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

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

HONG, L.; GUO, J.Z.; GAO, Y.; YUAN, W.K. Precipitation of microparticulate organic pigment powders by a supercritical antisolvent process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39, 4882 – 4887, 2000.

JONHSTON, K.P.; LUNA-BARCENAS, G.; DIXON, D.; MAWSON, S. Polymeric Materials by Precipitation with a Compressed Fluid Anti-

Solvent. *Proceedings of the 3rd International Symposium on Supercritical Fluids*, Tome 3; G. Brunner, M. Perrut (Eds.), 359–364, 1994.

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

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

KANG, Y; WU, J.; YIN, G.; HUANG, Z.; YAO, Y.; LIAO, X.; CHEN, A.; PU, X.; LIAO, L. Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of indomethacin-loaded PLLA/PLGA microparticles using supercritical CO₂ technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70, 85-97, 2008.

KIM, Y.H.; SHING, K.S. Supercritical fluid-micronized ipratropium bromide for pulmonary drug delivery. *Powder Technology*, 179, 90-97, 2007.

KOMURO, T.; YOMOTA, C.; KIMURA, T. In vitro dissolution properties of indomethacin extend release capsules. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43, 79-82, 1991.

LEE, S.Y., CHOI J, WONG H.H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: Mini-review. *International Journal of Biological Micromolecules*, 25, 31–36, 1999.

LEIMANN, F.V.; GONÇALVES, O.H.; MACHADO, R.A.F.; BOLZAN, A. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Materials Science and Engineering*, 29, 430-436, 2009.

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

LIN, S.Y.; CHEN, K.S.; TENG, H.H.; LI, M.J. In vitro degradation and dissolution behaviours of microspheres prepared by three low molecular weight polyesters. *Journal of microencapsulation*, 17, 577-586, 2000.

LIONZO, M.I.Z., RÉ, M.I., GUTERRES, S.S. e POHLMANN, A.R. Microparticles prepared with poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(*ε*-caprolactone) blends to control the release of a drug model. *Journal of microencapsulation*, 24, 175-186, 2007.

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

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

MATTEA, F.; MARTIN, M.; COCERO, M.J. Co-precipitation of β -carotene and polyethylene glycol with compressed CO₂ as an antisolvent: effect of temperature and concentration. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47, 3900 – 3906, 2008.

MARTÍN, A.; MATTEA, F.; GUTIÉRREZ, L.; MIGUEL, F.; COCERO, M.J. Coprecipitation of carotenoids and biopolymers with the supercritical anti-solvent process. *Journal of Supercritical Fluids*, 41, 138 – 147, 2007.

MARTINI, F.C.C. Comparação entre a biodisponibilidade de ferro na presença de vitamina A e beta-caroteno em alimentos e medicamentos. *Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP*, 97 páginas, 2002.

McCANCE, R.A.; WIDDOWSON, E.M. The composition of food. 5. Ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 462 páginas, 1994.

MIGUEL, F.; MARTÍN, A.; GAMSE, T.; COCERO, M.J. Supercritical anti solvent precipitation of lycopene. Effect of the operating parameters. *Journal of Supercritical Fluids*, 36, 225-235, 2006.

MIGUEL, F.; MARTÍN, A.; MATTEA, F.; COCERO, M.J. Precipitation of lutein and coprecipitation of lutein and poly-lactic acid with the supercritical anti-solvent process. *Chemical Engineering and Processing*, 47, 1594 – 1602, 2008.

PALLADO, P.; BENEDETTI, L.; CALLEGARO, L. Patent WO 96/29998, 1996.

PÉREZ DE DIEGO, Y.; PELLIKAAN, H.C.; WUBBOLTS, F.E.; BORCHARD, G.; WITKAMP, G.J.; JANSSENS, P.J. Opening new operating windows for polymers and protein micronization using the PCA process. *Journal of Supercritical Fluids*, 36, 216-224, 2006.

POUTON C.W, AKHTAR S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18, 133–162, 1996.

QING, S.; ROWLEY, K.G.; BALAZS, N.D.H.; Carotenoids: Separation Methods Applicable to Biological Samples. *Journal of Chromatography*, 781, 393 – 418, 2002.

RAMALHO, R. A.; FLORES, H.; SAUNDERS, C. Hypovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública. *Rev. Panam. Salud Publica*, 12, 117-122, 2002.

REVERCHON, E. Supercritical antisolvent precipitation of micro and nano-particles. *Journal of Supercritical Fluids*, 15, 1-21, 1999.

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

REVERCHON, E., SPADA, A. Crystalline microparticles of controlled size produced by supercritical-assisted atomization. *Industrial Engineering Chemical Research*, 43, 2004.

REVERCHON, E.; ADAMIA, R. Nanomaterials and supercritical fluids. *Journal of Supercritical Fluids*, 37, 1–22, 2006.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I.; TORINO, E. Nanoparticles production by supercritical antisolvent precipitations: A general interpretation. *Journal of Supercritical Fluids*, 2007.

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

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Os carotenóides como precursores de vitamina A. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19, 227-242, 1985.

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

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

SHARGEL, L. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, 5 ed., New York: McGraw-Hill, 2005.

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

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48, 139-157, 2001.

SILVA, P. *Farmacologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1450 páginas, 1994.

SOOTTITANTAWAT, A.; TAKAYAMA, K.; OKAMURA, K.; MURANAKA, D.; YOSHII, H.; FURUTA, T.; OHKAWARA, M.; LINKO, P. Microencapsulation of l-menthol by spray drying and its release characteristics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 163-170, 2005.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70, 1-20, 2001.

SUBRA, P.; LAUDANI, C.G.; GONZÁLEZ, A.V.; REVERCHON, E. Precipitation and phase behavior of theophylline in solvent-supercritical CO₂ mixtures. *Journal of Supercritical Fluids*, 35, 95-105, 2005.

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

TAI C.Y.; CHENG C. Supersaturation and crystal growth in gas anti-solvent crystallization. *Journal of Crystal Growth*, 183, 622, 1998.

TRES, M.V.; FRANCESCHI, E.; BORGES, G.R.; DARIVA, C.; CORAZZA, F.C.; OLIVEIRA, J.V.; CORAZZA, M.L. Influência da temperatura na solubilidade de β -caroteno em solventes orgânicos a pressão ambiente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 787-792, 2007.

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

WANG, X., WANG, Y., WEI, K., ZHAO, N., ZHANG, S., Chen, J. Drug distribution within poly(ϵ -caprolactone) microspheres and in vitro release. *Journal of Materials Processing Technology*, 209, 348-354, 2009.

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

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

APÊNDICE A

A.1 – Memorial dos Comportamentos de Liberação *in vitro* das Partículas de β -caroteno Encapsuladas em PHBV

A Tabela A1 e a Figura A1 apresentam os valores das concentrações de β -caroteno utilizadas para a construção da curva de calibração bem como suas respectivas absorbâncias médias (obtida por triplicata de medida) em acetato de etila. A Tabela A2 apresenta na seqüência, as absorbâncias médias (obtida por quintuplicatas de observação) e as concentrações liberadas nos intervalos de tempo para os experimentos E5, E6, E7 e E8 mencionados na Tabela 4.6. Ainda, são apresentados juntamente os respectivos percentuais de liberação (em relação às respectivas massas iniciais de β -caroteno encapsulado utilizada em cada ensaio).

Tabela A1 - Valores de concentração de β -caroteno em acetato de etila e absorvância média (obtida por triplicata de medida) em espectro de UV-VIS a 460 nm utilizados para a construção da curva de calibração.

Concentração de β -caroteno [mg/ml]	Absorvância média [UA]	Desvio padrão [UA]
0,0032	0,6232	0,0062
0,0016	0,2956	0,0037
0,0013	0,2574	0,0035
0,0010	0,2124	0,0031
0,0006	0,1165	0,0025
0,0003	0,0531	0,0045
0,0002	0,0209	0,0044

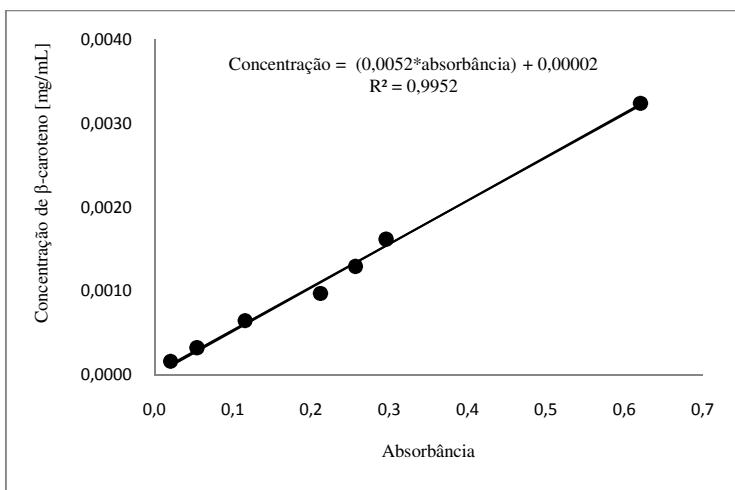


Figura A1 - Curva padrão de absorvância de β -caroteno em 460 nm em função da sua concentração em acetato de etila.

Tabela A2 - Ensaios de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV e submetidas à dissolução em acetato de etila na temperatura de 40 °C e 80 rpm. Ensaios E5, E6, E7 E8 referentes àqueles mencionados na Tabela 4.6 no tempo de 20s.

Ensaios	Tempo [min]	Absorbância média [UA]	Concentração liberada [mg/ml]	Concentração máxima [mg/ml]	Liberação [%]
E5	0	0,0000	0,0000		0,00
	1	0,1049	0,0005		11,55
	3	0,2589	0,0013		29,15
	5	0,4064	0,0021		46,01
	10	0,3833	0,0020	0,0046	43,37
	15	0,3824	0,0020		43,27
	20	0,4094	0,0021		46,35
	25	0,3994	0,0021		45,21
	30	0,3776	0,0019		42,71
E6	0	0,0000	0,0000		0,00
	1	0,2814	0,0014		35,37
	2	0,4421	0,0023		55,86
	3	0,5498	0,0028		69,59
	7	0,5374	0,0028		68,00
	10	0,5621	0,0029	0,0041	71,15
	15	0,5563	0,0029		70,41
	20	0,5510	0,0028		69,74
	25	0,5505	0,0028		69,68
	30	0,5498	0,0028		69,58
E7*	0	0,0000	0,0000		0,00
	1	0,0479	0,0023		15,30
	3	0,0784	0,0039	0,0150	25,95
	5	0,0903	0,0045		29,90
	10	0,1088	0,0055		36,30

Continuação da Tabela A2 - Ensaios de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV e submetidas à dissolução em acetato de etila na temperatura de 40 °C e 80 rpm. Ensaios E5, E6, E7 E8 referentes àqueles mencionados na Tabela 4.6 no tempo de 20s.

Ensaios	Tempo [min]	Absorbância média [UA]	Concentração liberada [mg/ml]	Concentração máxima [mg/ml]	Liberação [%]
E7*	15	0,1387	0,0070	0,0150	46,65
	20	0,1391	0,0070		46,78
	25	0,1315	0,0066		43,91
	30	0,1290	0,0065		43,30
E8*	0	0,0000	0,0000	0,0408	0,00
	1	0,1008	0,0050		10,49
	3	0,1865	0,0095		19,93
	5	0,2103	0,0107		22,52
	10	0,2286	0,0117		24,55
	15	0,2510	0,0129		26,97
	20	0,2365	0,0121		25,38
	25	0,2356	0,0121		25,39
	30	0,2263	0,0116		24,28

* Concentração obtidas por sucessivas diluições (100ml).

A Tabela A3 e a Figura A2 apresentam, na seqüência, os valores das concentrações de β -caroteno utilizadas para a construção da curva de calibração bem como suas respectivas absorbâncias médias (obtidas por triplicatas de medidas) em n-hexano.

Tabela A3 - Valores de concentração de β -caroteno em n-hexano e absorvância média (obtida por triplicata de medida) em espectro de UV-VIS a 460 nm utilizados para a construção da curva de calibração.

Concentração de β -caroteno [mg/ml]	Absorvância média [UA]	Desvio Padrão
0,0045	0,7283	0,0020
0,0011	0,2042	0,0038
0,0008	0,1600	0,0032
0,0005	0,0776	0,0020
0,0001	0,0062	0,0056

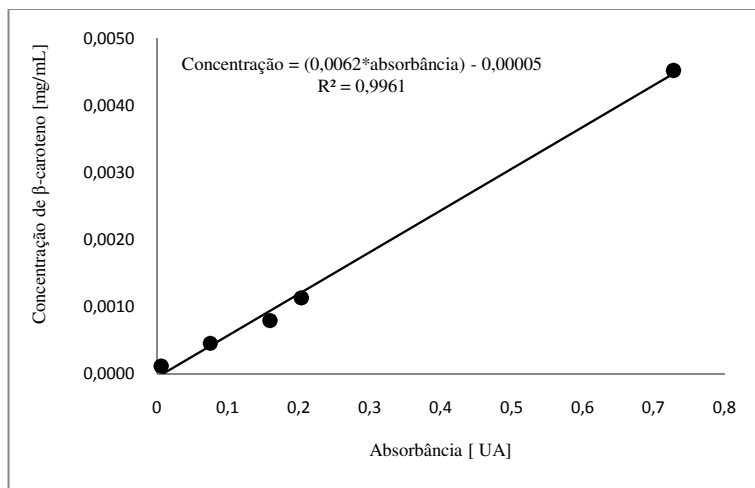


Figura A2 - Curva padrão de absorvância de β -caroteno em 460 nm em função da sua concentração em n-hexano.

Pelo valor do coeficiente de regressão encontrado para os valores das concentrações de β -caroteno e suas respectivas absorvâncias constata-se que o mesmo apresentou-se próximo ao valor unitário ($R^2 =$

0,9961) podendo então ser adotada esta curva para a determinação das concentrações do princípio ativo nos intervalos de tempo estudados. A Tabela A4 apresenta as absorbâncias médias (obtidas por quintuplicatas de observação) e as concentrações liberadas nos respectivos tempos para os experimentos E5, E6, E7 e E8 juntamente com os percentuais de liberação (em relação às respectivas massas iniciais de β -caroteno encapsulado utilizada em cada ensaio).

Tabela A4 - Ensaio de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em n-hexano na temperatura de 40 °C e 80 rpm. Ensaio E5, E6, E7 E8 referentes àqueles mencionados na Tabela 4.6 no tempo de 20s.

Ensaio	Tempo [min]	Absorbância média [UA]	Concentração liberada [mg/ml]	Concentração máxima [mg/ml]	Liberação [%]
E5	0	0,0000	0,0000		0,00
	1	0,1011	0,0006		13,54
	3	0,2354	0,0014		33,08
	6	0,2972	0,0018		42,09
	10	0,2512	0,0015	0,0043	35,38
	13	0,2556	0,0015		36,02
	20	0,2448	0,0015		34,45
	25	0,2381	0,0014		33,48
	30	0,2192	0,0013		30,73
E6	0	0,0000	0,0000		0,00
	1	0,3307	0,0020		29,42
	3	0,4733	0,0029		42,42
	6	0,5392	0,0033	0,0068	48,43
	10	0,5279	0,0032		47,40
	15	0,5146	0,0031		46,19

Continuação da Tabela A4 - Ensaios de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em n-hexano na temperatura de 40 °C e 80 rpm. Ensaios E5, E6, E7 E8 referentes àqueles mencionados na Tabela 4.6 no tempo de 20s.

Ensaios	Tempo [min]	Absorbância média [UA]	Concentração liberada [mg/ml]	Concentração máxima [mg/ml]	Liberação [%]
E6	20	0,5129	0,0031	0,0068	46,03
	25	0,5113	0,0031		45,89
	30	0,5082	0,0031		45,60
E7*	0	0,0000	0,0000	0,0218	0,00
	1	0,0913	0,0052		23,88
	3	0,1492	0,0088		40,19
	6	0,1776	0,0105		48,26
	10	0,2047	0,0122		55,96
	15	0,1946	0,0116		53,08
	20	0,1900	0,0113		51,79
	25	0,1896	0,0113		51,88
	30	0,1826	0,0108		49,59
E8*	0	0,0000	0,0000	0,0413	0,00
	1	0,1004	0,0057		13,82
	3	0,1744	0,0103		25,00
	7	0,2575	0,0155		37,49
	10	0,2694	0,0162		39,27
	15	0,2685	0,0159		38,63
	20	0,2983	0,0180		43,63
	25	0,2944	0,0178		43,03
	30	0,2999	0,0181		43,86
	35	0,2968	0,0179		43,39
	45	0,2877	0,0173		41,94

* Concentração obtidas por sucessivas diluições (100ml).

A seguir são apresentados os valores das concentrações de β -caroteno utilizadas para a construção da curva de calibração bem como suas respectivas absorbâncias médias (obtidas por triplicatas de medida) em etanol anidro (Tabela A5 e Figura A3). Novamente verificou-se um bom valor do coeficiente de regressão ($R^2 = 0,9984$), podendo utilizar tais padrões para o cálculo das concentrações de β -caroteno liberadas.

Tabela A5 - Valores de concentração de β -caroteno em etanol anidro e absorbância média (obtida por triplicata de medida) em espectro de UV-VIS a 460 nm utilizados para a construção da curva de calibração.

Concentração de β -caroteno [mg/ml]	Absorbância média [UA]	Desvio padrão
0,0166	0,7841	0,0026
0,0116	0,5674	0,0023
0,0083	0,4169	0,0060
0,0050	0,2660	0,0040
0,0017	0,1022	0,0034
0,0008	0,0475	0,0067

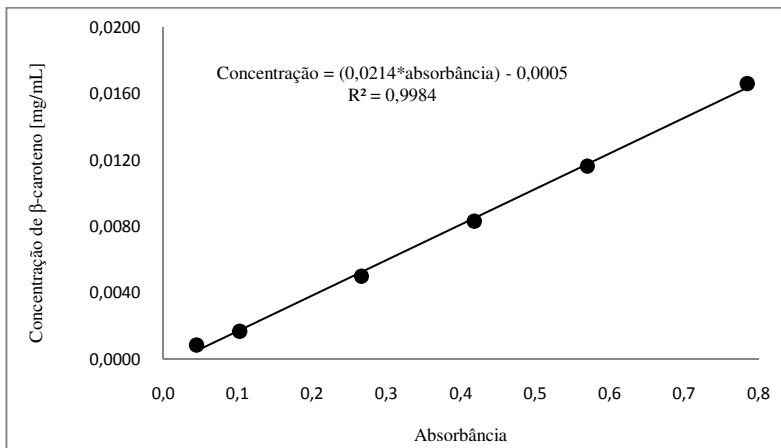


Figura A3 - Curva padrão de absorvância de β-caroteno em 460 nm em função da sua concentração em etanol anidro.

A Tabela A6 apresenta as absorvâncias médias (obtidas por quintuplicatas de observação) e conseqüentemente as concentrações liberadas nos respectivos tempos para os experimentos E5, E6, E7 e E8 juntamente com os percentuais de liberação (em relação às respectivas massas iniciais de β-caroteno encapsulado utilizada em cada ensaio) para os experimentos de liberação em etanol anidro.

Tabela A6 - Ensaios de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em etanol anidro na temperatura de 40 °C e 80 rpm. Ensaios E5, E6, E7 E8 referentes àqueles mencionados na Tabela 4.6 no tempo de 20s.

Ensaio	Tempo [min]	Absorbância média [UA]	Concentração liberada [mg/ml]	Concentração máxima [mg/ml]	Liberação (%)
E5	0	0,0000	0,0000		0,00
	1	0,0328	0,0000		0,00
	3	0,0602	0,0000		0,00
	5	0,0416	0,0000		0,00
	7	0,0201	0,0000		0,00
	10	0,0155	0,0000		0,00
	15	0,0197	0,0000		0,00
	20	0,0284	0,0001		2,51
	25	0,0299	0,0001		3,26
	30	0,0252	0,0000	0,0043	0,91
	40	0,0302	0,0001		3,38
	50	0,0403	0,0004		8,39
	60	0,0413	0,0004		8,87
	70	0,0505	0,0006		13,43
	80	0,0520	0,0006		14,21
	100	0,0569	0,0007		16,62
	110	0,0578	0,0007		17,07
	120	0,0637	0,0009		19,98
	140	0,0730	0,0011		24,60
	160	0,0753	0,0011		25,71
180	0,0845	0,0013		30,27	
200	0,0990	0,0016		37,49	
220	0,1148	0,0020		45,27	
240	0,1114	0,0019		43,60	

Continuação da Tabela A6. Ensaios de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em etanol anidro na temperatura de 40 °C e 80 rpm. Ensaios E5, E6, E7 E8 referentes àqueles mencionados na Tabela 4.6 no tempo de 20s.

Ensaio	Tempo [min]	Absorbância média [UA]	Concentração liberada [mg/ml]	Concentração máxima [mg/ml]	Liberação [%]
E5	260	0,1131	0,0019	0,0043	44,46
	280	0,1114	0,0019		43,61
	300	0,1105	0,0019		43,18
E6	0	0,0000	0,0000	0,0075	0,00
	5	0,0617	0,0008		10,98
	10	0,0900	0,0014		19,06
	20	0,0955	0,0015		20,63
	30	0,1202	0,0021		27,69
	50	0,1262	0,0022		29,42
	60	0,1387	0,0025		33,01
	80	0,1733	0,0032		42,90
	90	0,1829	0,0034		45,63
	100	0,1910	0,0036		47,97
	120	0,2117	0,0040		53,87
	140	0,2473	0,0048		64,06
	160	0,2705	0,0053		70,69
	180	0,2943	0,0058		77,53
	210	0,2941	0,0058		77,46
	240	0,2958	0,0058		77,95
270	0,2994	0,0059	78,97		
300	0,3009	0,0059	79,41		
E7	0	0,0000	0,0000	0,0113	0,00
	5	0,0648	0,0009		7,81
	10	0,0820	0,0013		11,07
	20	0,0995	0,0016		14,38

Continuação da Tabela A6. Ensaios de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em etanol anidro na temperatura de 40 °C e 80 rpm. Ensaios E5, E6, E7 E8 referentes àqueles mencionados na Tabela 4.6 no tempo de 20s.

Ensaio	Tempo [min]	Absorbância média [UA]	Concentração liberada [mg/ml]	Concentração máxima [mg/ml]	Liberação [%]
E7	30	0,1300	0,0023	0,0113	20,12
	40	0,1421	0,0025		22,40
	50	0,1567	0,0029		25,15
	60	0,1825	0,0034		30,03
	80	0,2180	0,0042		36,72
	90	0,2514	0,0049		43,03
	100	0,2596	0,0051		44,58
	120	0,3027	0,0060		52,71
	140	0,3412	0,0068		59,98
	160	0,3744	0,0075		66,24
	180	0,3969	0,0080		70,50
	210	0,4089	0,0082		72,75
	240	0,4421	0,0090		79,02
	270	0,4666	0,0095		83,64
	300	0,4883	0,0100		87,75
	330	0,4883	0,0099		87,73
360	0,4909	0,0100	88,23		
390	0,4897	0,0100	88,01		
420	0,4906	0,0100	88,17		
E8	0	0,0000	0,0000	0,0527	0,00
	5	0,0870	0,0014		2,58
	10	0,0892	0,0014		2,67
	15	0,0989	0,0016		3,07
	20	0,1241	0,0022		4,09
	25	0,1379	0,0025		4,65

Continuação da Tabela A6. Ensaios de liberação *in vitro* das partículas de β -caroteno encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução em etanol anidro na temperatura de 40 °C e 80 rpm. Ensaios E5, E6, E7 E8 referentes àqueles mencionados na Tabela 4.6 no tempo de 20s.

Ensaio	Tempo [min]	Absorbância média [UA]	Concentração liberada [mg/ml]	Concentração máxima [mg/ml]	Liberação [%]
E8	30	0,1545	0,0028		5,32
	40	0,1878	0,0035		6,68
	50	0,2100	0,0040		7,58
	60	0,2335	0,0045		8,53
	75	0,2632	0,0051		9,74
	90	0,3043	0,0060		11,41
	110	0,3368	0,0067		12,73
	120	0,3395	0,0068		12,84
	150	0,3857	0,0078		14,71
	180	0,4428	0,0090		17,03
	210	0,4684	0,0095	0,0527	18,07
	240	0,5151	0,0105		19,97
	270	0,5210	0,0106		20,21
	300	0,5468	0,0112		21,26
	330	0,5828	0,0120		22,72
	360	0,5968	0,0123		23,29
	390	0,5905	0,0121		23,03
	420	0,6025	0,0124		23,52
450	0,6030	0,0124		23,54	
480	0,6055	0,0125		23,64	

A Tabela A7 os resultados das concentrações liberadas bem como os desvios em relação àquelas inicialmente obtidas para os ensaios de liberação *in vitro* do experimento E8 (β -caroteno: 30mg/ml e PHBV:

30mg/ml) submetido à dissolução em acetato de etila e hexano na temperatura de 40 °C e 80 rpm.

Tabela A7 - Ensaio de liberação *in vitro* do experimento E8 (β -caroteno: 30mg/ml e PHBV: 30mg/ml) submetido à dissolução em acetato de etila e hexano na temperatura de 40 °C e 80 rpm.

Ensaio	Tempo [min]	Concentração liberada [mg/ml]		Desvio Padrão
		Inicial*	Réplica	
n-hexano	0	0,0000	0,0000	0,0000
	1	0,0057	0,0063	0,0003
	3	0,0103	0,0116	0,0007
	7	0,0155	0,0170	0,0008
	10	0,0162	0,0180	0,0009
	15	0,0159	0,0177	0,0009
	20	0,0180	0,0174	0,0003
	25	0,0178	0,0181	0,0002
	30	0,0181	0,0172	0,0004
	35	0,0179	0,0184	0,0002
Acetato de etila	0	0,0000	0,0000	0,0000
	1	0,0050	0,0063	0,0007
	3	0,0095	0,0095	0,0000
	5	0,0107	0,0111	0,0002
	10	0,0117	0,0126	0,0005
	15	0,0129	0,0127	0,0001
	20	0,0121	0,0129	0,0004
	25	0,0121	0,0128	0,0004
	30	0,0116	0,0128	0,0006

* Valores das concentrações liberadas nos meios contendo n-hexano e acetato de etila expressas na Tabela 4.10 e 4.8, respectivamente.