

Estela Muchiuti Aranha

**ENCAPSULAMENTO DA α -BIXINA EM PHBV EMPREGANDO
TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA E O CONTROLE DE SUA
LIBERAÇÃO *IN VITRO***

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza.

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza.

Coorientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira.

Florianópolis
2013

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

Aranha, Estela Muchiuti
ENCAPSULAMENTO DA γ -BIXINA EM PHEV EMPREGANDO
TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA E AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO IN VITRO
/ Estela Muchiuti Aranha ; orientadora, Selene Maria de
Arruda Guelli Ulson de Souza. ; co-orientador, José
Vladimir de Oliveira. - Florianópolis, SC, 2013.
112 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Encapsulamento de bixina. 3.
PHEV. 4. Fluido supercrítico . I. de Arruda Guelli Ulson de
Souza., Selene Maria. II. de Oliveira, José Vladimir. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Estela Muchiuti Aranha

**ENCAPSULAMENTO DA α -BIXINA EM PHBV EMPREGANDO
TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA E O CONTROLE DE SUA
LIBERAÇÃO *IN VITRO***

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 27 de setembro de 2013.

Prof.^a Selene Maria Arruda Guelli Ulson de Souza, Dr.^a
Orientadora

Prof. Antônio Augusto Ulson de Souza, Dr.
Coorientador

Prof. José Vladimir de Oliveira, Dr.
Coorientador

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Bruno Augusto Matta Cariofi, Dr.

Prof. Marcelo Lanza, Dr.

Prof. José Antônio Ribeiro de Souza, Dr.

"Descobrir consiste em olhar para o
que todo mundo está vendo e pensar
uma coisa diferente"

(Roger Von Oech).

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus porque, sem Ele, não poderia estar aqui agradecendo a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Aurora e José Francisco, por tudo que fizeram e fazem por mim até hoje, pois sem eles nada seria.

Ao meu irmão Renato, pela amizade e momentos de descontração.

Aos meus orientadores e professores, Dr. Antônio Augusto Ullson de Souza, Dr. José Vladimir de Oliveira e Dr.^a Selene Maria de Arruda Guelli Ullson de Souza, que acreditaram em mim para a realização deste trabalho, sempre com muita paciência, entusiasmo e dedicação sempre colocando-se à disposição para discussões e esclarecimentos.

Aos meus colegas e amigos do laboratório – LABMASSA, em especial a Danielle Mass, Diego Todescato e Josilma Fontana, pela amizade, paciência, discussões de trabalho e pelos momentos de descontrações que me proporcionaram.

Agradeço aos meus amigos pelo enorme aprendizado, apoio e carinho em todos os momentos, em especial a Aline Tomadon, Beatriz Pamato, Caroline Lohn, Paulo Tatim e Renata Bet. E a Cleomara Muchiuti e Mariah Zipf que mesmo de longe nunca deixaram de me incentivar e apoiar.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

A CAPES, pelo auxílio financeiro na realização de parte deste trabalho.

E a todos que de alguma forma diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a aplicação de dióxido de carbono pressurizado como anti-solvente para o encapsulamento da bixina em poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV).

Para os experimentos de encapsulamento, utilizou-se diclorometano como solvente orgânico e dióxido de carbono como antissolvente e uma câmara de precipitação. Durante o processo de encapsulamento, os parâmetros mantidos constantes foram: vazão de solução ($1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e a vazão do antissolvente ($20,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), e a influência dos seguintes parâmetros foram investigados: pressão (80 a 100 bar), temperatura (308,5 e 313,5 K), concentração de bixina na solução orgânica ($0,4$ a $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e concentração de PHBV na solução orgânica ($1,0$ a $20,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

O percentual e eficiência de encapsulamento foram determinadas submetendo as amostras do material coprecipitado à agitação manual por 20 segundos, a partir do qual foi obtido um percentual real de encapsulamento máximo e uma eficiência máxima de encapsulamento de 42,4 % e 92,0 %, respectivamente. Observou-se que tanto a pressão, temperatura, e a relação de concentração encapsulante e encapsulado na solução orgânica inicial, possuem influência tanto na eficiência de encapsulamento como na morfologia das partículas. Os experimentos em que foram obtidos maiores percentuais e eficiência de encapsulamento foram selecionados para o estudo dos ensaios de liberação em meios puros (etanol, acetato de etila, acetona e éter etílico) a $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e 120 rpm. Constatou-se que em acetona o comportamento de liberação foi caracterizado por um *burst* inicial, na qual grande parte do princípio ativo foi liberada nos primeiros 20 minutos, onde o percentual médio máximo de liberação foi de 92,44 %. Em Acetato de etila, éter etílico e etanol os comportamentos das liberações apresentaram-se diferentes do encontrado em acetona, não sendo verificado o *burst* inicial. As liberações em éter etílico e etanol ocorreram mais lentamente que em acetato de etila, chegando próximo dos 600 minutos até atingir o percentual médio de liberação de 95,23 % quando o meio de dissolução era composto por etanol. Os valores de concentração dos princípios ativos liberados foram proporcionais aos percentuais reais de encapsulamento da bixina, e dependendo da polaridade do solvente onde se encontravam as partículas pode se obter uma liberação mais rápida ou mais lenta.

Palavras chave: Encapsulamento. Fluidos supercríticos. Liberação *in vitro*. Bixina..

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the application of pressurized carbon dioxide as anti-solvent for the encapsulation of bixin in poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV).

For the encapsulation trials, dichloromethane and carbon dioxide were used as organic solvent and as antisolvent respectively, and also a precipitation chamber. During the encapsulation process, the parameters were maintained constant: flow solution ($1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) and antisolvent flow rate ($20.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), and the influence of the following parameters were investigated: pressure (80 to 100 bar) and temperature (308.5 and 313.5 K), bixin concentration of the organic solution (0.4 to $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and concentration of PHBV in organic solution (1.0 to $20.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

The rate and encapsulation efficiency were determined by subjecting samples of the material to coprecipitate manual shaking for 20 seconds, from which it was obtained a percentage of actual maximum and a maximum encapsulation efficiency of encapsulation of 42.4% and 92.0%, respectively. It was observed that both the pressure, temperature, and the ratio of encapsulating and encapsulated organic concentration in the initial solution have much influence on the encapsulation efficiency and particle morphology. The experiments in which higher percentages and encapsulation efficiency were obtained were selected for the study of the release tests in pure media (ethanol, ethyl acetate, acetone and ethyl ether) at $28^\circ \text{C} \pm 0.5^\circ \text{C}$ and 120 rpm. It was found that in acetone the release behavior was characterized by an initial burst, in which much of the active ingredient was released in the first 20 minutes, being 92.44 % the maximum average percentage of release. In ethyl acetate, diethyl ether and ethanol releases showed behaviors were different from those found in acetone, although the initial burst was not verified. Releases in ethyl ether and ethanol occurred more slowly than in ethyl acetate, reaching close to 600 minutes to reach the average percentage of release of 95.23 % when the dissolution medium was composed of ethanol. The concentration values of the released active ingredients were proportional to the actual percentage of encapsulation of bixin, and depending on the polarity of the solvent in which the particles were can get a faster or a slower release.

Keywords: Encapsulation. Supercritical fluids. In vitro release, Bixin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Corantes naturais cis-bixina(1), genipina(2) e andirobina(3) isolados de plantas brasileira.....	28
Figura 3.2 – Trecho da carta de Pero Vaz de Caminha a El-rei D. Manoe.....	29
Figura 3.3 – Estrutura básica dos carotenoides.....	31
Figura 3.4 – Fotos do fruto do urucum: A – Fruto verde; B – Cachopa com frutos maduros; C – em floração; D – Fruto maduro aberto com sementes expostas.....	33
Figura 3.5 – Estrutura dos carotenoides bixina e norbixina, cis e trans, e do principal produto de degradação.....	34
Figura 3.6 – Estrutura química da bixina.....	35
Figura 3.7 – Representação de microcápsulas (A) e microesferas (B).....	37
Figura 3.8 – Esquema básico de obtenção de partículas através do processo de antissolvente supercrítico.....	39
Figura 3.9 – Fórmula estrutural dos comonômeros que formam o PHBV.....	41
Figura 4.1 - Diagrama esquemático do aparato experimental de coprecipitação.....	49
Figura 4.2 - Tubos capilares conectados aos <i>PEEK Tubing</i>	50
Figura 4.3 – Câmara de precipitação conectada a todas as linhas da unidade de coprecipitação.....	51
Figura 4.4 - Filtro membrana de politetrafluoretileno.....	52
Figura 4.5 - Vista da unidade experimental de precipitação.....	53
Figura 4.6 – Vista geral da unidade experimental de precipitação.....	53
Figura 5.1 – Curva padrão da absorbância média de bixina pura e de bixina e PHBV em 520 nm em função da concentração em diclorometano.....	67
Figura 5.2 – Partículas coprecipitadas de bixina e PHBV referentes ao experimento B5.....	70
Figura 5.3 – Micrografias de MEV da bixina encapsulada a 35 e 40 °C com ampliação de 10000 vezes. (A) Experimento B5; (B) Experimento B7.....	72
Figura 5.4 – Diagrama de distribuição do tamanho de partículas B7e B8.....	73
Figura 5.5 – Micrografias de MEV da bixina encapsulada a 80 e 100 bar com ampliação de 10000 vezes. (A) Experimento B7; (B) Experimento B8.....	73
Figura 5.6 – Micrografias de MEV da bixina encapsulada a 40°C, 80 bar com ampliação de 10000 vezes. (A) Experimento B3; (B) Experimento B7; (C) Experimento B10.....	75
Figura 5.7 – Diagrama de distribuição do tamanho de partículas B3, B7 e B10.....	76

Figura 5.8 – Micrografias de MEV da bixina encapsulada a 35°C, 80 bar com ampliação de 10000 vezes. (A) Experimento B1; (B) Experimento B13.....	77
Figura 5.9 – Diagrama de distribuição do tamanho de partículas B1e B13.....	77
Figura 5.10– Perfis de liberação <i>in vitro</i> das partículas de bixina encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução na temperatura de 28 °C e 120 rpm para o experimento B13 em acetona.....	79
Figura 5.11 – Perfis de liberação <i>in vitro</i> das partículas de bixina encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução na temperatura de 28 °C e 120 rpm para o experimento B14 em acetato de etila.....	80
Figura 5.12 – Perfis de liberação <i>in vitro</i> das partículas de bixina encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução na temperatura de 28 °C e 120 rpm para o experimento B13 em éter etílico.....	81
Figura 5.12 – Perfis de liberação <i>in vitro</i> das partículas de bixina encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução na temperatura de 28 °C e 120 rpm para o experimento B15 em etanol.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Propriedades termofísicas das substâncias.....	46
Tabela 5.1– Planejamento dos experimentos de encapsulamento.....	64
Tabela 5.2 – Absorbância máxima dos solventes.....	66
Tabela 5.5 - Resultados do percentual teórico de encapsulamento (PTE), do percentual real de encapsulamento (PRE), eficiência de encapsulamento (EE) da co-precipitação de bixina e PHBV e o percentual em massa de bixina(τ).....	69
Tabela 5.6 – Valores do tamanho de partículas nas diferentes condições experimentais.....	71
Tabela 5.6 – Solubilidade da bixina em diferentes solventes a 25°C.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

PHBV – Poli(3-hidroxi-butarato-co-hidroxi-valerato)
CO₂ – Dióxido de Carbono
SC-CO₂ – Dioxido de Carbono supercrítico
SEDS – Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos
SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde
MS – Ministério da Saúde
K₂Cr₂O₇ – Dicromato de Potássio
OH – Hidroxila
UV – Ultravioleta
RMN-H¹ – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ¹
RMN-C¹³ – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono ¹³
O₂ – Oxigênio molecular
DCL – Dupla Ligação Conjugada
µm- micrometro
GAS – Gás Antissolvente
SAS – Antissolvente Supercrítico
ASES – Sistema de Extração de Solvente em Aerosol
EM – Transferência de Massa
S – Saturação
PHA – Polihidroxi-alcanoato
PHB – Poli(hidroxi-butarato)
HB – Hidroxibutirato
HV – Hidroxivalerato
PCL – Poly-ε-Caprolactone
pH – Potencial Hidrogeniônico
M – Massa Molecular
T_c – Temperatura crítica
°C – Graus Celcius
P_c – Pressão crítica
ρ – Densidade
HPLC – Cromatografia Líquida de alta Eficiência
FEG – Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução
LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
MEV – Microscopia de Varredura Eletronica
PRE% – Percentagem Real de Encapsulamento
EE – Eficiência de Encapsulamento
rpm – Rotações Por Minuto
mg – Miligramas

mL – Mililitro

PTE% – Percentagem Teórica de Encapsulamento

$X_{\text{mínimo}}$ – Tamanho mínimo

$X_{\text{máximo}}$ – Tamanho máximo

$X_{\text{médio}}$ – Tamanho médio

σ – Desvio padrão

CV – Coeficiente de variação

L-PLA – Ácido Poli(L-láctico)

nm – Nanômetros

r^2 – Coeficiente de correlação

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 2.1– Saturação.....	38
Equação 4.1 – Percentual Real de Encapsulamento.....	60
Equação 4.2 – Eficiência de Encapsulamento.....	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. OBJETIVO GERAL.....	25
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
3.1. CORANTES.....	27
3.1.1. Corantes naturais.....	27
3.2. CAROTENOIDES.....	30
3.2.1. Urucum.....	32
3.2.2. Bixina.....	084
3.2.2.1. <i>Bixina Como Antioxidantes.....</i>	35
3.2.2.2. <i>Estabilidade da Bixina.....</i>	35
3.3. MÉTODOS DE ENCAPSULAÇÃO.....	36
3.3.1. Processos de Obtenção de Partículas por antissolvente supercrítico.....	37
3.3.2. Materiais Encapsulantes.....	39
3.3.3. Liberação Controlada.....	42
3.4. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE.....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1. ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS.....	45
4.2. APARATO EXPERIMENTAL DE COPRECIPITAÇÃO/ ENCAPSULAMENTO.....	42
4.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DE COPRECIPITAÇÃO.....	54
4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTICULAS.....	57
4.4.1. Morfologia e Distribuição do Tamanho das Micropartículas.....	57
4.4.2. Determinação do Percentual de Encapsulamento.....	58
4.4.2. Quantificação de Bixina Encapsulado Através do Método de Espectrometria na Região de UV-VIS.....	58
4.4.3. Liberação <i>In Vitro</i> de Bixina Encapsulada em PHBV.....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	63
5.1. ENCAPSULAMENTO	63
5.1.1. Quantificação da Bixina por UV-Visível.....	66
5.1.2 Eficiência de Encapsulamento.....	68
5.1.2.1 <i>Efeito da temperatura.....</i>	71
5.1.2.2. <i>Efeito da pressão</i>	72
5.1.2.3. <i>Efeito da concentração do encapsulado.....</i>	73
5.1.2.4. <i>Efeito da concentração do encapsulante.....</i>	00000075

5.2 LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS PARTÍCULAS DE BIXINA ENCAPSULADAS EM PHBV.....	77
6. CONCLUSÕES.....	85
6.1. CONCLUSÕES GERAIS.....	85
6.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
APÊNDICE A – ESPECTROS DE VARREDURA DA BIXINA PURA EM DIFERENTES SOLVENTES.....	97
APÊNDICE B – CURVAS PADRÕES DE BIXINA EM DICLOROMETANO.....	101
APÊNDICE C – MICROGRÁFICAS DE FECS DAS PARTÍCULAS.....	105
APÊNDICE D – COMPORTAMENTOS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS PARTÍCULAS DE BIXINA ENCAPSULADAS EM PHBV.....	109

1. INTRODUÇÃO

A cada dia que passa a nanotecnologia recebe mais investimentos e desperta interesses das mais variadas áreas, devido principalmente ao seu grande potencial de abrangência, ocasionando um impacto não somente no desenvolvimento tecnológico, mas também no econômico. Diante deste grande interesse, foi criado no Brasil a Iniciativa Brasileira em Nanotecnologia, a fim de promover a articulação entre o desenvolvimento da nanotecnologia e as necessidades da indústria (MCTI).

A microencapsulação apresenta grande aplicação principalmente nas áreas farmacêuticas, alimentar, e agro-química. A microencapsulação permite que o encapsulado, composto bioativo, seja protegido por uma matriz de revestimento e tenha uma lib

eração que pode ser modificada com o objetivo de atuar num determinado local de interesse, por um tempo específico e seja liberado a uma velocidade determinada; aumente as taxas de dissolução de algum material pouco solúvel em água; altere as propriedades de superfície, além de proteger as substâncias de agentes atmosféricos (oxigênio, luz e calor) (BAHRAMI et al., 2007)(SUAVE et al., 2006). Os compostos encapsulados geralmente se apresentam nas formas líquidas ou sólidas (FÁVARO TRINDADE et al., 2008).

O polímero poli (3-hidroxi-butilirato-co-valerato) (PHBV) apresenta grande destaque nesta atuação de material de revestimento nos processos de encapsulamento de compostos antioxidantes e corantes naturais. O PHBV é um copolímero termoplástico semi-cristalino biodegradável e biocompatível produzido por fermentação bacteriana. A sua biodegradabilidade permite a sua aplicação biomédica, incluindo nos processos de liberações controladas via agentes (VOLOVA et al., 2003)(KALOGIANNIS et al., 2006)(POUTON; AKNTAR, 1996).

Existem várias técnicas utilizadas na preparação de micropartículas, elas podem ser métodos químicos, físicos e físico-químicos. No entanto, a escolha da técnica mais adequada depende dos requisitos do produto final de interesse (BANSODE et al.,2010).

A utilização de fluidos supercríticos são alternativas nas técnicas utilizadas de microencapsulamentos, eles fazem uso principalmente do dióxido de carbono (CO₂) como fluido supercrítico. A vantagem na sua utilização é que em estado supercrítico (sc-CO₂) é um excelente solvente alternativo por ser barato, abundante, facilmente removível do produto final, inodoro, atóxico, não inflamável, e etc.

As indústrias estão cada vez mais em busca de substituintes para corantes e aditivos sintéticos. Alguns já foram proibidos em vários países como Estados Unidos, Japão, e países da Europa. A substituição por produtos naturais se dá por serem considerados seguros, menos susceptíveis a efeitos adversos e ocasionadores de danos à saúde, porém apresentam grande instabilidade com relação à luz e ao calor (ALAMEIDA et al., 1995). Assim as técnicas de encapsulamento podem ser aplicadas com grandes benefícios a estes materiais, principalmente aos antioxidantes (Reineccius, 1995).

Dentre os antioxidantes se encontra a bixina, um pigmento do urucum, que tem destaque por apresentar um amplo espectro de aplicação. A América Latina se destaca com uma produção de 60 % de todo o urucum consumido no mundo, seguido pela África com 27% e a Ásia 12%, sendo assim um corante natural de suma importância.

O conhecimento dos dados toxicológicos para os estudos de avaliação de risco à saúde humana e animal é tão importante para corantes sintéticos quanto para os naturais. Estudos realizados nos últimos anos demonstram a atoxicidade de extratos de urucum, como em 2002, Paumgarten e colaboradores, avaliaram a atoxicidade de extrato de urucum (28% de bixina) em ratos. Os resultados demonstraram que não há efeito adverso, sugerindo desta forma, que os extratos de urucum não se mostraram tóxicos para as ratas, nem embriotóxicos.

Diante de várias características do urucum, ele é amplamente utilizado em muitos alimentos processados, especialmente em produtos lácteos. O menor custo de produção associado a sua atoxicidade o torna um corante alimentar natural atraente e conveniente à substituição dos corantes sintéticos (Agnier et al., 2004).

Neste trabalho, a bixina, foi microencapsulada em um polímero biodegradável (PHBV) pela técnica SEDS, visando aumentar a estabilidade oxidativa durante o processamento e a estocagem. Para avaliar a eficiência do encapsulamento optou-se na utilização de um método de extração e de determinação do teor de corante microencapsulado. Além de se determinar as características morfológicas do produto final e suas distribuições de tamanho de partículas. Através de uma liberação monitorada (release) foi determinado o perfil de liberação das bixina em diferentes solventes com polaridades distintas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Microencapsular a bixina em PHBV através do processo de Dispersão de Solução Aumentada por Fluido Supercríticos (SEDS) empregando CO₂ como fluido supercrítico.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- ✓ Obter micropartículas poliméricas de PHBV contendo o composto corante do urucum (bixina) através do processo *SEDS* utilizando dióxido de carbono supercrítico;
- ✓ Analisar a influência de diferentes variáveis: temperatura, pressão, concentração de bixina e concentração do polímero PHBV;
- ✓ Comparar a eficiência do encapsulamento dos experimentos realizados nas diferentes condições;
- ✓ Realizar avaliações microscópicas das partículas com relação à morfologia e distribuição de tamanho das partículas produzidas;
- ✓ Estudar o comportamento do processo de liberação *in vitro* da bixina nos diferentes solventes: etanol, éter etílico, acetato de etila e acetona.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CORANTES

Os corantes são definidos como aditivos alimentares, substâncias que conferem, intensificam ou restauram a cor de determinado alimento. Segundo a portaria SVS/MS 540/97, aditivo é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos com o objetivo de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento.

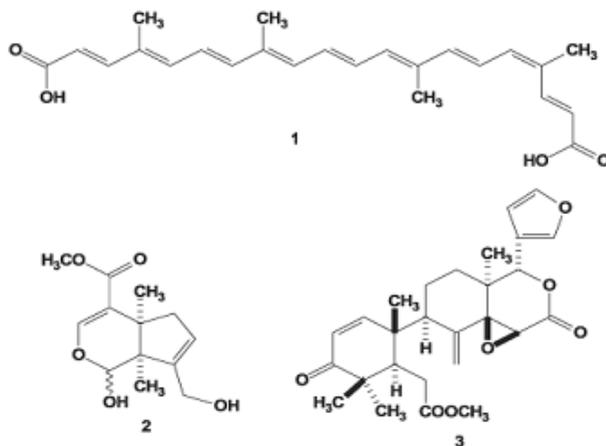
Existem três categorias de corantes permitidas pela legislação para uso em alimentos, os corantes naturais, os corantes caramelos e os corantes artificiais. Segundo o artigo 10 do Decreto nº55 871, de 26 de março de 1967 (Brasil, 2002b) são considerados corantes naturais, os pigmentos ou corantes inócuos extraídos de substâncias vegetais ou animais. Os corantes caramelos são produtos obtidos a partir do tratamento térmico de carboidratos, por meio de tecnologias adequadas. Já os corantes artificiais são as substâncias obtidas por processos de sínteses e apresentam composições químicas definidas (SATO et al., 2002).

3.1.1 Corantes naturais

As primeiras substâncias corantes eram obtidas a partir da extração de flores, sementes, frutos, cascas, madeiras, raízes de plantas e de origem animal. (SERRANO et al., 2007). O primeiro corante a ser conhecido pela humanidade foi o Negro-de-Fumo (Carbon Black). Há relatos que os caçadores do Período Glacial pintavam, com fuligem e ocre, as paredes das cavernas reservadas ao culto, criando obras que resistem há milênios (ALMEIDA, 2006).

As civilizações indígenas americanas já realizavam as pinturas dos corpos e cabelos antes de qualquer relato de escrita ou pinturas em cavernas e sítios sagrados, como modo de expressão e comunicação. Os corantes naturais (Figura 3.1), como cis-bixina (1), genipina (2) e andirobina (3), eram comumente utilizados para estes fins, tanto estéticos, religiosos e de proteção (Veigas, et al, 2006).

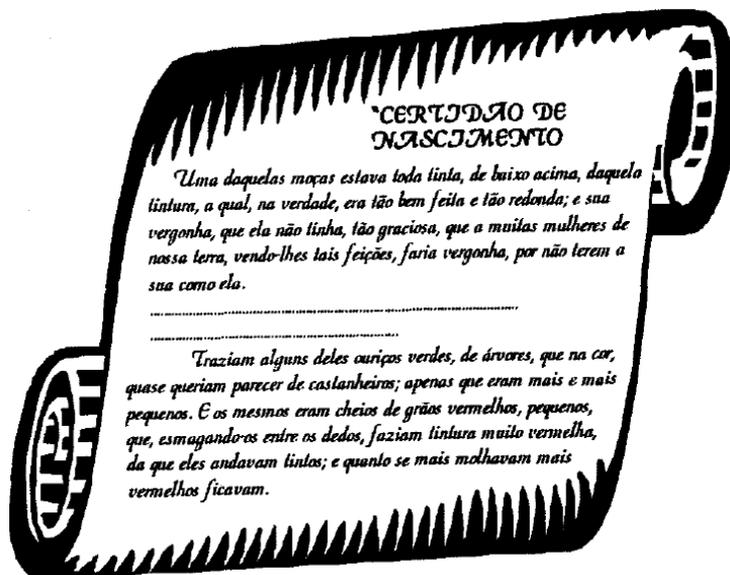
Figura 3.1 – Corantes naturais cis-bixina(1), genipina(2) e andirobina(3) isolados de plantas brasileiras.



FONTE: Adaptado VIEGAS et al. (2006).

O comércio de produtos naturais (as especiarias) marcou o início da história do Brasil, motivo pelo qual levou a várias disputas de posse da nova terra e, por fim, a colonização portuguesa (VEIGAS et al., 2006). Em um dos trechos da carta de Pero Vaz de Caminha a El-rei D. Manoel (Figura 3.2), considerada por muitos como “a certidão de nascimento do Brasil”, o escrivão descreve a nova terra batizada de ilha de Vera Cruz. Além da nudez das índias e das suas pinturas, alguns ouriços que os índios levavam aos portugueses despertaram a atenção do cronista (PINTO, 1995).

Figura 3.2 – Trecho da carta de Pero Vaz de Caminha a El-rei D. Manoel



FONTE: PINTO (1995).

O ouriço citado na carta à El-rei D. Manoel, era a bixácea – Bixa orellana – conhecida como urucu; os indígenas utilizavam suas sementes, cujo corante é o norcarotenoide bixina.

Até final do século XIX, muitos outros produtos naturais despertaram interesse por parte dos europeus, como o pau-brasil (*Cesalpinia echinata*) de onde era obtido um corante de cor vermelha, muito utilizado para tingimento de roupa e como tinta de escrever, este já era conhecido e utilizado nas Índias Orientais desde a Idade Média (VEIGAS et al., 2006).

Em 1856 foi sintetizado o primeiro corante orgânico, por William H. Perkin. O cientista trabalhava no estudo da oxidação da fenilamina, também conhecida como anilina, com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), em seu pequeno laboratório caseiro. Certa vez, após realizar seu experimento e descartar o precipitado resultante da reação, lavou o resíduo do frasco com álcool, se deparando com o aparecimento de uma coloração avermelhada. Ele repetiu a reação, sob as mesmas condições, e obteve novamente o mesmo produto, chamando-o de Púrpura de Tiro que, posteriormente, passou a ser denominado pelos franceses de Mauve (HASSEMER, 2006; PINTO, 1995).

Apesar dos corantes sintéticos apresentarem menores custos de produção, maior estabilidade (luz, oxigênio, calor e pH), uniformidade na cor conferida, alto poder tintorial, isenção de contaminação microbiológica e custo de produção relativamente baixo, o número de aditivos sintéticos permitidos nos países desenvolvidos está diminuindo significativamente em favor dos pigmentos naturais (LOPES et al., 2007).

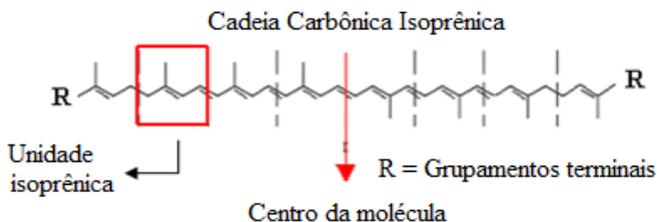
Os corantes mais empregados pelas indústrias alimentícias têm sido os naturais, como o extrato de urucum, carmim de cochonilha. São baixos os números de corantes artificiais comprovadamente inócuos à saúde. Desta forma pesquisas sobre novas fontes, extrações e estabilidade dos corantes naturais têm sido amplamente desenvolvidas e estudadas, a fim de permitirem suas utilizações sem qualquer prejuízo (SILVA, 2007).

3.2 – CAROTENOIDES

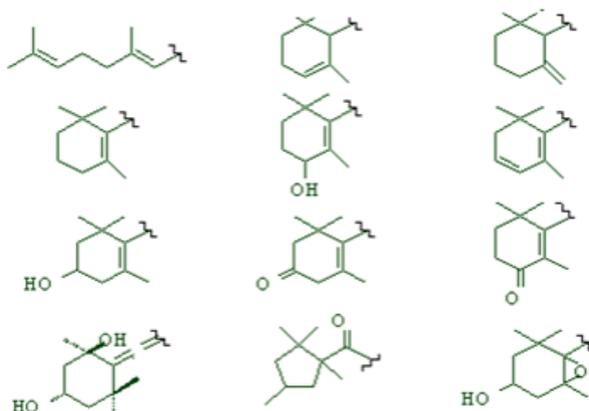
Os carotenóides compreendem uma família de corantes naturais, com mais de 600 estruturas conhecidas. O metabolismo humano não é capaz bioquimicamente de sintetizar tais substâncias, sendo possível apenas se acumularem e/ou converterem os precursores obtidos a partir de suas fontes (SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

Quimicamente, os carotenoides são definidos como tetraterpenoides (C_{40}) (hidrocarbonetos de ocorrência natural e seus derivados), ou seja, união de oito unidades isoprenoides (C_5) de cinco átomos de carbono, formando uma cadeia carbônica de quarentas átomos de carbono, exceto a crocetina e a bixina, que possuem menos de quarenta átomos de carbono na cadeia carbônica (VILELLA, 1976). Na Figura 3.3 é apresentada a estrutura central poliênica, a sequência de unidades terpenoides e algumas das mais comuns terminações de cadeias encontradas nos diversos carotenóides (SCHWARTZ et al., 2003). A estrutura linear básica é simétrica, podendo apresentar uma ou ambas extremidades cíclicas. O extenso número de estruturas é resultado de ciclizações e outras modificações que podem ocorrer nas moléculas isoladamente ou em conjuntos, como: hidrogenação, desidrogenação, migração da dupla, redução ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de função oxigenada (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Figura 3.3 – Estrutura básica dos carotenoides.



Alguns Grupos Terminais de Carotenóides



FONTE: Adaptado de SCHWARTZ (2003).

Os carotenóides classificam-se em dois grandes grupos: carotenóides hidrocarbonados e carotenóides oxigenados, sendo respectivamente os carotenos e as xantofilas. Estes grupos ainda são subdivididos estruturalmente em outros sete grupos (GROODWIN, 1965):

- ✓ Hidrocarbonetos: Apresentam em sua estrutura apenas átomos de carbono e hidrogênio. Na mesma divisão são encontrados os super-hidrogenados, com até 76 átomos de hidrogênio denominados fotoenos e fitofluenos.
- ✓ Álcoois: Apresentam um grupo hidroxila (OH) ligado aos anéis iononas da cadeia.
- ✓ Cetonas: Apresentam grupos carbonilas ligados aos anéis iononas.
- ✓ Epóxidos: Apresentam oxigênios entre carbonos formando ciclos.
- ✓ Éteres: Apresentam oxigênios entre carbonos.
- ✓ Ácidos: Apresentam grupos carboxilas ligados na extremidade da cadeia carbônica, pois não possuem anéis ionona. Derivados

diterpênico, 20 átomos de carbono formam cadeias poli-insaturadas, tetrametilada e dicarboxílica.

- ✓ Ésteres: Apresentam o grupo carboxil entre carbonos. Os ésteres de ácidos carotênicos como a bixina, pigmento vermelho do urucum, e os ésteres das xantofilas como a luteína são importantes representantes desta classe (VILLELA, 1976).

3.2.1 Urucum

O urucuzeiro é uma planta nativa da América do Sul, mais especificamente da região amazônica, porém também pode ser encontrada em regiões da América Central, Índia e África. Sua estrutura etimológica tem origem da palavra “uru-ku” que em tupi significa vermelho. Pertencente à família das bixáceas, recebe o nome científico de *bixa orellana l.* em homenagem a Francisco Orellana, que durante uma expedição na região Amazônica foi o primeiro europeu a navegar o rio Amazonas, considerado o maior rio do mundo (PINTO, 1995; CORLETT, 2004).

A árvore começa a produzir frutos a partir dos dois anos de idade, podendo dar frutos durante cerca de doze anos. Em condições normais atinge em média 3,00 e 4,00 metros de altura e apesar de ser cultivada em diversas regiões do Brasil, não se desenvolvendo a baixas temperaturas, necessita uma temperatura média próxima a 25 °C, além de distribuições abundantes de chuvas mensais, suportando até três meses de estiagem (OLIVEIRA, 2005).

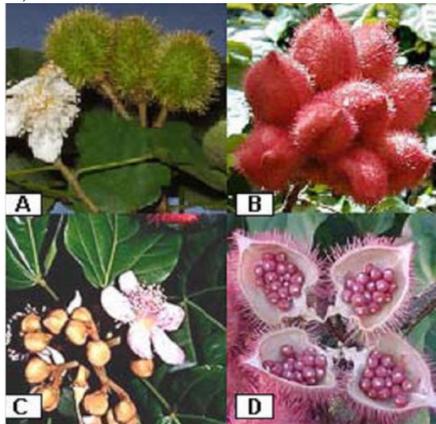
O principal produto comercial são as sementes retiradas do fruto do urucum, denominado cachopa (Figura 3.6). Antes da sua maturação fisiológica a coloração do fruto varia de verde-claro, verde escura, amarela-alaranjada e vermelho-escuro. Aproximadamente 50 sementes estão presentes em uma cachopa bem desenvolvida. Camadas de tecidos que envolvem as sementes (pericarpo) são as responsáveis pelos pigmentos oriundos do urucum. O pigmento vermelho-amarelado do pericarpo é uma mistura de bixina, norbixina, β -caroteno, crisptoxantina, luteína, zeaxantina e metilbixina (FRANCO et al., 2008; BALASWAMY et al., 2006). Podemos relacionar o principal responsável pela coloração avermelhada da semente de urucum, ao composto que se apresenta sob duas formas: bixina (lipossolúvel) e norbixina (hidrossolúvel).

A coloração avermelhada da semente relaciona-se diretamente ao percentual de bixina e norbixina presente. Quanto maior for a concentração de bixina, mais puxado para a tonalidade vermelha será o pigmento, se o

oposto ocorre, e a concentração de norbixina for mais predominante, maior a tendência para uma tonalidade amarelada.

A Jamaica tem a reputação de produzir o urucum com melhor qualidade, uma vez que este apresenta elevados teores de bixina quando comparado com o produzido na Índia, em média, 3 % e 2 %, respectivamente (ROBBINS, 1995).

Figura 3.4 – Fotos do fruto do urucum: A – Fruto verde; B – Cachopa com frutos maduros; C – em floração; D – Fruto maduro aberto com sementes expostas



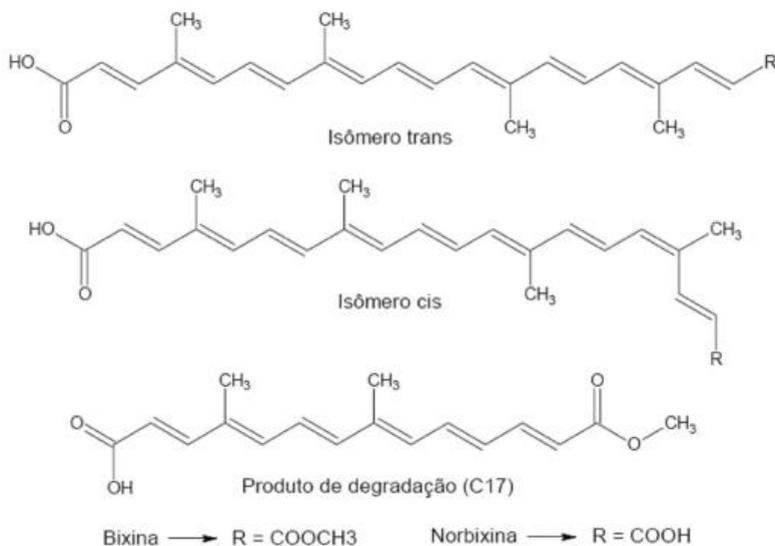
FONTE: OLIVEIRA, (2005).

A composição do extrato de urucum, devido sua intensa instauração, está sujeito não somente à oxidação, mas também à isomerização. Determinadas técnicas empregadas no processo de extração e concentração final dos pigmentos, utiliza-se de determinadas condições de calor, luz, ácidos e/ou adsorção em superfícies ativas, que podem promover a isomerização da forma cis para a forma trans, uma configuração mais estável, variando o percentual da trans-bixina do extrato (ROBBINS, 1995). A isomerização pode ser normalmente detectada em decorrência de alguns fatores, como: redução da intensidade da cor; aumento da solubilidade, e aumento do ponto de fusão (compostos cis apresentam menores pontos de fusão que os correspondentes trans). Produtos de isomerização são frequentemente caracterizados pelo deslocamento da banda de absorção na região do ultravioleta (UV), onde o isômero trans absorve em um comprimento de onda maior que seu precursor.

Os principais produtos da degradação térmica foram caracterizados como os isômeros de cor amarela e os produtos de hidrólise do éster trans-monometil do ácido 4,8-dimetiltetradecahenaenedioico, frequentemente

designado por C17. Na Figura 3.5 são ilustradas as estruturas moleculares da bixina e norbixina, cis e trans, além do principal produto de decomposição (C17) (NAJAR et al., 1988, MCKEOWN, 1963, 1965; SCOTTER, 1995).

Figura 3.5 – Estrutura dos carotenoides bixina e norbixina, cis e trans, e do principal produto de degradação.

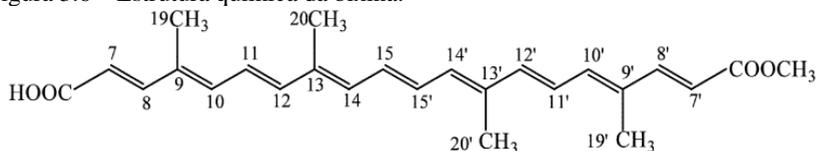


FONTE: Adaptado SCOTTER, (1995).

3.2.2 Bixina

A bixina (Figura 3.6) foi o primeiro cis-carotenóide isolado a partir de uma fonte natural, das sementes da *bixa orellana*. Embora citada pela primeira vez em 1825, por Boussingault e sua cristalização obtida com sucesso em 1875 por Ettí, apenas em 1961 sua estrutura e estereoquímica foram desvendadas completamente, em grande parte por meio de estudos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H) e carbono (RMN-¹³C). Pertencente a um pequeno grupo de apocarotenóides naturais, grupo derivado dos carotenóides, sua formação é oriunda das degradações oxidativas dos carotenóides C₄₀ (JONDIKO e PATTENDEN, 1989).

Figura 3.6 – Estrutura química da bixina.



FONTE: SUO et al., (2005).

Apresenta destaque frente a outros carotenóides, por ser encontrada naturalmente na configuração *cis* e por possuir em sua estrutura dois grupos carboxílicos, sendo um ácido carboxílico em uma extremidade e na outra um éster metílico. Tal característica confere a lipossolubilidade à molécula. Caso ocorra a hidrólise alcalina do agrupamento metílico, é obtido o sal da norbixina apresentando característica hidrossolúvel (KIOKIAS e GORDON, 2003).

3.2.2.1 Bixina Como Antioxidantes.

Antioxidantes são substâncias que, quando presentes, atrasam ou inibem a oxidação de um substrato de maneira considerável. São moléculas muito estáveis, capazes de serem doadoras de elétrons à espécie reativa, neutralizando-a e reduzindo sua capacidade de danificar biomoléculas (BAGCHI & PURI, 1998). A bixina tem papel de grande destaque neste quesito, por ser capaz de interceptar e desativar moléculas reativas de oxigênios singletos, sendo eficaz no combate e proteção de efeitos mutagênicos e genotóxicos induzidos (THRESIAMMA et al., 1998; SILVA et al., 2001).

Estudos realizados por Lima et al (2003), e Lima et al (2001) reportam a utilização da bixina como antioxidante na prevenção da aterosclerose, um estreitamento dos pequenos vasos sanguíneos que fornecem sangue e oxigênio ao coração, além de atuar como agente hipolipidêmico, provomendo desta forma a redução dos níveis de colesterol.

3.2.2.2 Estabilidade da Bixina

Diferentemente dos corantes sintéticos, alguns corantes naturais como a bixina são em sua grande maioria termolábeis, e uma das maiores causas da perda da cor durante a estocagem é a oxidação dos mesmos, que é acelerada pela luz, temperatura e presença de catalisadores metálicos (SARANTÓPOULOS et al., 2001). A perda da coloração desses compostos

é explicada por um processo conhecido como foto-oxidação, irreversível e envolve diretamente os pigmentos receptores de luz, os quais, ao absorverem a luz, são excitados e interagem com o O₂, gerando desta forma radicais livres que levam à destruir os pigmentos (NAJAR et al., 1988).

Como são facilmente oxidados, podem potencializar as ações antioxidantes em uma mistura. Além de serem extremamente reativos e consequentemente instáveis, devido a sua longa cadeia de duplas ligações conjugadas (DLC) (QING et al., 2002).

O espectro característico dos carotenoides é consequência destas DLC. As Moléculas orgânicas podem absorver luz nas regiões do ultravioleta e do visível, como consequência desta absorção de luz, ocorrem transições eletrônicas que levam as moléculas a um estado de maior energia (estado excitado). No caso dos carotenóides, essas transições eletrônicas ocorrem dos orbitais Pi (ligantes) aos orbitais Pi* (antiligantes). Devido à deslocalização dos elétrons através das conjugações do cromóforo. O estado excitado da molécula é relativamente de menor energia, de modo que em geral a absorção da luz visível é suficiente para promover as transições. Quanto maior o número de DLC, menos energia é necessária para promover a excitação e, conseqüentemente, o valor do comprimento de onda máximo de absorção é maior. Ao menos 7 DLC são necessárias aos carotenóides para que haja percepção de cor pelo olho humano. O aumento no número das ligações conjugadas resulta em maiores bandas de absorção em maiores comprimentos de ondas, e, neste caso, os carotenóides tornam-se mais vermelhos (PACHECO, 2009).

A fim de se evitar os problemas de oxidação nos pigmentos, veem surgindo novas pesquisas, produtos e tecnologias. As pesquisas sobre a microencapsulação são as mais promissoras, sendo capazes de prevenir ou diminuir a oxidação dos carotenóides presentes nos pigmentos encapsulados (BERSET, 1990). Segundo Giese (1993), os pigmentos de páprica, urucum e cúrcuma são mais estáveis nas formas encapsuladas que livres.

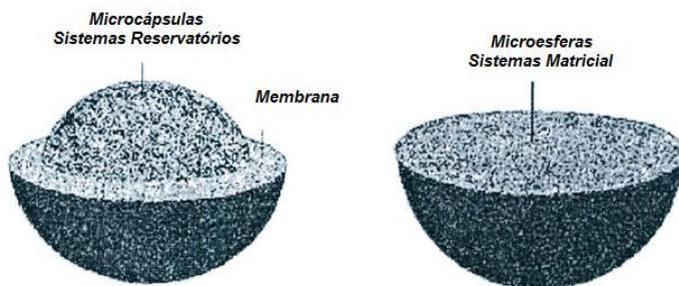
3.3 MÉTODOS DE ENCAPSULAÇÃO

A técnica de encapsulação consiste no empacotamento de partículas, como pigmentos, acidulantes, nutrientes, enzimas e conservantes, através de membranas. Estas membranas são denominadas de encapsulantes, coberturas ou paredes, enquanto que os materiais encapsulados são os recheios ou núcleos (Gibbs, 1999). Os produtos destes processos geram dois tipos de estruturas, as microesferas e microcápsulas (Figura 3.7). Microesferas são sistemas onde o encapsulado encontra-se

homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz, obtendo-se um sistema monolítico, não sendo possível identificar um núcleo diferenciado. As microcápsulas, ao contrário, contêm sistemas onde é possível identificar um núcleo diferenciado, que pode ser líquido ou sólido, onde o material encontra-se envolvido por uma membrana, isolando o núcleo do meio externo (JUNIOR, 2005).

Existem três classificações possíveis referentes aos tamanhos das partículas encapsuladas: macropartículas ($> 5000 \mu\text{m}$), micropartículas ($0,2 - 5000 \mu\text{m}$) e nanopartículas ($< 0,2 \mu\text{m}$) (AUGUSTIN et al., 2001).

Figura 3.7 – Representação de microcápsulas (A) e microsferas (B).



FONTE: JUNIOR, (2005).

Vários métodos podem ser utilizados no processo, entre os quais podem destacar: atomização, extrusão, leito fluidizado, coacervação, secagem em tambor, inclusão molecular, liofilização e inclusão em lipossomas. Dentre estas a secagem por atomização (*spray drying*) é um dos métodos mais empregados, devido ao baixo custo de processo, emprego de uma ampla variedade de agentes encapsulantes, boa retenção dos compostos e excelente estabilidade do produto final (REINECCIUS, 1989).

3.3.1 Processos de Obtenção de Partículas por antissolvente supercrítico

Fluidos supercríticos têm sido utilizados como meio de obtenção de micro e nanopartículas. Devido à baixa solubilidade de certos solutos em soluções líquidas em dióxido de carbono supercrítico, é possível o processamento destes materiais com o fluido supercrítico como antissolvente.

É necessário que o soluto de interesse seja muito solúvel no solvente orgânico e insolúvel ou pouco solúvel no antissolvente e, ainda, que o

solvente orgânico possua maior afinidade pelo antissolvente que pelo soluto. Desta forma, quando a solução contendo o soluto entra em contato com o antissolvente, a solubilidade do soluto no solvente orgânico é reduzida significativamente, devido ao antissolvente causar um decréscimo no poder de solvatação do solvente orgânico levando a precipitação do soluto sob a forma particulada. Ocorre uma transferência de massa simultânea no sistema: a rápida difusão do fluido supercrítico na solução líquida e do solvente na fase supercrítica (TAI e CHENG, 1998).

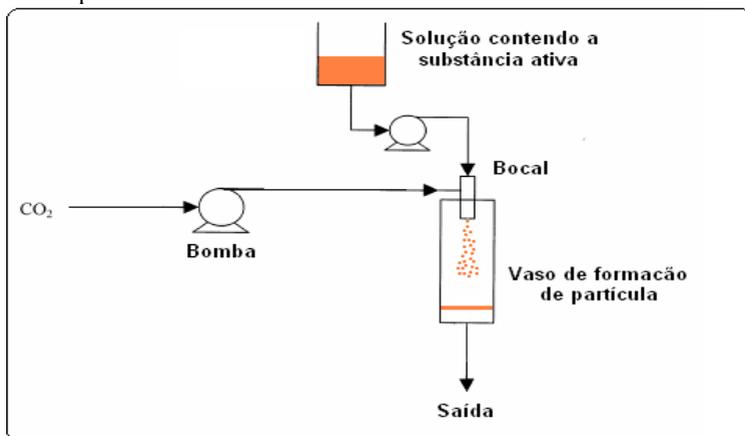
A força motriz causadora desta precipitação é a supersaturação que ocorre devido à difusão do antissolvente nas gotas atomizadas do solvente contendo o soluto. A supersaturação (S) é definida como a relação entre a fração molar da substância ($x^{\text{Substância}}$) no sistema solvente/antissolvente e a fração molar de equilíbrio da substância ($x^{\text{Equilíbrio Substância}}$) no mesmo sistema e nas mesmas condições de pressão e temperatura (Equação 2.1) (Antunes, 2007).

$$S = \frac{x^{\text{Substância}}}{x^{\text{Equilíbrio Substância}}} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

Quando agregados de moléculas, presentes na solução atingem uma determinada dimensão crítica se tem início à nucleação. A formação desses agregados é termodinamicamente desfavorável em soluções homogêneas ou soluções heterogêneas em presença de substratos que facilitem a nucleação, mas ocorre devido ao movimento Browniano. Quando os agregados atingem uma dimensão crítica, a absorção de qualquer molécula suplementar já é termodinamicamente favorável, tendo um crescimento regular e irreversível (Antunes, 2007).

Segundo Jung e Perrut (2001), três caminhos para a obtenção das partículas são possíveis: GAS/SAS (*Gas anti-solvent/supercritical anti-solvent*), ASES (*aerosol solvent extraction system*), também conhecido como PCA (*Precipitation with a compressed anti-solvent*) e SEDS (*Solution enhanced dispersion by supercritical fluids*). Reverchon e Adami (2006) ainda citam um quarto caminho, o SAS-EM (*Supercritical anti-solvent with enhanced mass transfer*). A Figura 2.8, ilustra o processo com antissolvente supercrítico.

Figura 3.8 – Esquema básico de obtenção de partículas através do processo de antissolvente supercrítico.



Fonte: Adaptado de Jung e Perrut, (2001).

A diferença básica dentre os vários tipos de processos está no equipamento e no modo como ocorre a injeção da solução nos vasos de precipitação. No caso do SEDS, o injetor é coaxial permitindo introduzir a solução com o substrato de interesse e o antissolvente (fluido supercrítico) simultaneamente no vaso de precipitação, onde a temperatura e a pressão são controladas.

2.3.2 Materiais Encapsulantes

O principal fator que influencia a estabilidade de compostos encapsulados é a natureza do material encapsulante (ROSENBERN et al, 1990). Durante o processo de escolha do material a ser utilizado são levados em consideração fatores como: propriedades físicas e químicas do núcleo (porosidade, solubilidade etc.) e da parede (viscosidade, propriedades mecânicas, transição vítrea, capacidade de formação de filme etc.), compatibilidade do núcleo com a parede, mecanismo de controle e fatores econômicos (BRAZEL, 1999). Além do material de parede ser necessariamente insolúvel e não reativo com o núcleo (JACKSON & LEE, 1991). É de suma importância este estudo preliminar, já que as propriedades do encapsulante e do princípio ativo encapsulado influenciam diretamente no processo de seleção da microencapsulação.

Os encapsulantes devem atender ainda aos seguintes requisitos: boas propriedades de formação de filme; baixa viscosidade a altas concentrações

de sólidos (menor que 0,5 Pa.s em concentrações superiores a 45%); sabor e odor suaves; fácil reconstituição além de um baixo custo (FAVARO-TRINDADE et al, 2008). Em função de geralmente um único agente encapsulante não possuir todas as propriedades do material ideal para utilização como encapsulante, pesquisas recentes têm focado na utilização de misturas (GHARSALLAOUI et al., 2007).

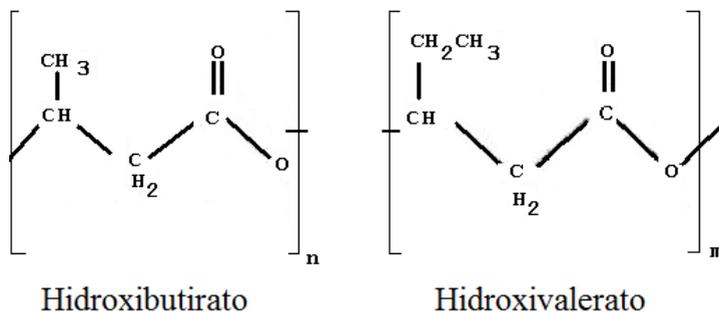
A classe de materiais mais estudada no processo de microencapsulação, devido a sua grande versatilidade e propriedades variadas, são os materiais poliméricos. Muitos polímeros biodegradáveis são descritos na utilização em processos de microencapsulação. Estes podem ter origem natural, sintética ou semissintética. Entretanto são poucos os polímeros biocompatíveis com o organismo dos seres humanos (SILVEIRA, et al, 2004, JAIN et al., 1998).

Os polímeros biodegradáveis são aqueles onde a degradação é mediada, pelo menos parcialmente, por sistema biológico, ou seja, pela ação de micro-organismos presentes no ambiente (bactérias, fungos e algas). Para poder ser considerado biodegradável, 80 a 90% do carbono deveram ser convertidos em CO₂ no prazo máximo de 180 dias (ASTM D883, 1994). Os poliésteres, polifosfazenos, poliortoésteres, poliaminoácidos, polianidridos e as polieuretanas são alguns exemplos desta classe de polímeros que vêm sendo comumente utilizada no processo de microencapsulação (ALBINI, 2012).

Com a diversidade dos poliésteres naturais, formou-se a família dos polihidroxicanoatos (PHAs). Os PHAs são produzidos por bactérias através de biossíntese direta de carboidratos. O vasto potencial de aplicação depende do comprimento e da composição das cadeias poliméricas dos PHAs. O poli (hidroxibutirato) – PHB ou P(3HB) é o principal representando dessa família juntamente com o poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) – PHBV ou poli(3HB-co-3HV)(BRUNEL, 2008).

O PHBV é um copolímero semicristalino de cadeia linear, que apresenta diferentes proporções de unidades hidroxibutirato (HB), e de unidades hidroxivalerato (HV) (Figura 3.9). Assim como os demais PHAs, o PHBV é produzido por um grande número de bactérias (LEMES, 2005).

Figura 3.9 – Fórmula estrutural dos comonômeros que formam o PHBV.



FONTE: LEMES, (2005).

O polímero PHB foi identificado pela primeira vez no Instituto Pasteur – Paris - em 1925. O pesquisador do instituto observou a formação do polímero em grânulos, sendo fonte de energia e de estocagem de carbono, no interior de microorganismos, como na bactéria *Alcaligenis Euterophus*. Inicialmente foi identificado erroneamente com sendo um material lipídico. Somente com o surgimento de interesses biotecnológicos, estes compostos passaram a ser alternativas na produção de plásticos biodegradáveis (BRUNEL, 2008).

As bactérias são capazes de produz o polímero a partir de carboidratos básicos como a glicose e frutose, como um mecanismo acumulador de reservas energéticas, da mesma forma que os animais armazenam gordura (SHARMA & RAY, 1995).

A fermentação bacteriana é a principal fonte do polímero PHB. O processo é constituído de duas etapas: uma etapa fermentativa, na qual os micro-organismos alimentados com ácido butírico ou frutose metabolizam o açúcar disponível e acumularam o PHB no interior da célula como fonte de reserva. E na etapa de extração, onde se remove e purifica com solventes adequados, o polímero acumulado no interior da célula dos microorganismos, até a obtenção de um produto final sólido e seco (PACHEKOSKI, 2005).

O PHBV é copolímero do hidroxibutirato, com segmentos aleatórios de hidroxivalerato, produzido através de um processo fermentativo similar ao de produção do PHB. Este se difere pela utilização de ácido propiônico, juntamente com a glicose, como fonte de carbono. O responsável pela concentração de HV presente no copolímero, é a quantidade inicial do ácido propiônico utilizado na alimentação das bactérias fermentativas,

possibilitando desta forma uma variação do tempo de degradação e das propriedades térmicas e mecânicas do mesmo (PACHEKOSKI, 2005).

Devido as suas propriedades como a biodegradabilidade, compatibilidade biológica e a sua semelhança com os termoplásticos convencionais, o polímero apresenta uma grande possibilidade de aplicação na área da saúde (matriz de sistemas de liberação controlada de drogas, suporte para crescimento de tecidos e próteses), na agricultura e na indústria (produção de embalagens) (LEMES, 2005).

3.3.3 Liberação Controlada

Com o processo de encapsulação, o núcleo fica protegido do ambiente externo, até que sua liberação seja conveniente. As taxas de liberação dos núcleos encapsulados são afetadas diretamente pelas interações com o material que os encapsula, a volatilidade do núcleo, a relação núcleo/encapsulante, tamanho das partículas e grau de viscosidade do polímero encapsulante (DASHEVCKY e ZESSIN, 1997; DE ROOS, 2000; GANDER, 1996; ZINUTTI et al., 1994). O mecanismo de liberação é determinado e influenciado a partir do tipo e geometria das partículas do núcleo, e principalmente do material encapsulante (WHORTON, 1995).

Durante os processos de liberação, os mecanismos envolvidos variam, dentre as possibilidades a liberação pode ser controlada e ativada por: solvente, difusão, pH, temperatura e pressão. É comum a ocorrência dos mecanismos combinados (POTHAKAMURY e BARBOSA-CÁNOVAS, 1995).

Quando se utiliza a técnica de atomização ou extrusão, os mecanismos mais comuns envolvidos nas liberações são através da difusão e pela ação do solvente (AZEVEDO, 2005).

Atualmente, os interesses essenciais são atribuídos ao encapsulamento de *flavors*, lipídeos e carotenoides, entre outros compostos. Wagner e Warthesen verificaram que os carotenoides da cenoura quando submetidos ao encapsulamento por *spray drying* em amido parcialmente hidrolisado possuíam uma melhor estabilidade. O mesmo relatado por Beauts et al. que encapsularam a oleoresina de páprica em maltodextrina. Matioli e Rodriguez-Amaya (2003), encapsularam licopeno (extraído de goiaba vermelha *in natura*) utilizando alfa, beta e gama ciclodextrinas. Wagner (2010) estudou sobre a etapa de precipitação e encapsulamento de β -caroteno em PHBV.

Barbosa, Borsarelli, Mercadante (2005) produziram microcápsulas de bixina utilizando goma arábica e maltodextrina e verificaram menor taxa de degradação para bixina encapsulada quando comparada à bixina livre.

Lobato (2013) produziu cápsulas de bixina através de deposição interfacial do polímero poly-ε-caprolactone (PCL), constatando que o encapsulamento promoveu o aumento da estabilidade da bixina durante a fotossensibilização e aquecimento em sistemas modelos. Mendes (2012) microencapsulou o corante do urucum, com goma de cajueiro como material de parede, aplicando os processos de liofilização e atomização, notando que o processo de liofilização levou a menores valores de degradação da bixina encapsulada que o por atomização. Suo et al, (2005) por sua vez utilizaram-se da técnica de SEDS com o objetivo de avaliar a eficiência das tecnologias de precipitação em fluidos supercríticos no processamento de pigmentos naturais (bixina) e estudou os efeitos das variáveis operacionais no processos de SEDS.

3.4 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

Com o desenvolvimento da indústria, conseqüentemente ocorre a busca de novos produtos que possuam melhor qualidade e segurança. Há compostos como os carotenóides (ex. bixina) que podem ser aplicados a uma vasta gama de produtos de todos os setores industriais. Porém esta classe de compostos apresentam algumas limitações nos processos de armazenamentos e aplicações, podendo sofrer oxidação e/ou termodegradação. A microencapsulação pode amenizar essa situação, aumentando sua estabilidade e tornando possível a incorporação em sistemas alimentícios e cosméticos, sem que ocorra uma perda significativa de suas propriedades químicas e sensoriais (LEIMANN, 2008).

Técnicas convencionais de precipitação/encapsulamento utilizam grandes quantidades de solventes, provocando uma grande quantidade de contaminações com solventes no solo e nas águas subterrâneas, além de não possuem controle adequado sobre a morfologia das partículas formadas. Em contrapartida, técnicas que se fazem uso dos fluidos supercríticos apresentam inúmeras vantagens nestes processos de encapsulamento de princípios bioativos em biopolímeros, oferecendo uma maior estabilidade das partículas evitando que apresentem uma menor vida útil de suas propriedades, além de serem técnicas econômicas e flexíveis.

Entretanto, além da etapa de encapsulamento, 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 da liberação de micropartículas de carotenoides encapsuladas em biopolímeros apresenta-se ainda bastante incipiente em toda a literatura, bem como a área de nanotecnologia com a bixina que ainda há poucos trabalhos científicos

publicados a respeito dos mesmos e quando encontrados são bastante recentes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são especificados os materiais e a metodologia utilizada empregando dióxido de carbono pressurizado como antissolvente para a realização dos experimentos de coprecipitação/encapsulamento da bixina utilizando diclorometano como solvente orgânico. E a avaliação de sua liberação *in vitro* em diferentes solventes.

4.1. ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS

Para os experimentos de precipitação/encapsulamento/liberação foram utilizados os seguintes reagentes:

- Acetato de etilo (99,5% LAFAN, Brasil);
- Acetona (99,5% LAFAN, Brasil);
- Bixina - Padrão (Chr. Hansen A/ S, Dinamarca);
- Clorofórmio P.A. (Vetec, pureza de 99,5%)
- Dióxido de carbono (CO₂) (White Martins S.A., pureza de 99,8%);
- Diclorometano (DCM) (99,5% Macron Chemicals, EUA
- Etanol anidro (99,5% LAFAN, Brasil);
- Éter etílico (99,5% LAFAN, Brasil);
- Heptano P.A.(Vetec, pureza de 99,5%);
- Copolímero, Poli(hidroxibutirato-co-hidroivalerato) (PHBV) com massa molar (M_w) de 196.000 e índice de poli dispersão de 1,85, gentilmente cedido pela empresa PHB Industrial S/A.

Todos estes materiais, exceto o copolímero PHBV, foram utilizados como recebidos, sem qualquer tratamento prévio e foram armazenados de forma adequada evitando assim o contato com a luz, calor e umidade. O copolímero foi submetido a uma pré-purificação, pela dissolução em clorofórmio e sua posterior precipitação em heptano para retirada de impurezas.

A Tabela 4.1 apresenta algumas propriedades termofísicas das substâncias utilizadas neste trabalho na etapa de precipitação/encapsulamento.

Tabela 4.1 – Propriedades termofísicas das substâncias.

Substância	M (g/mol)	T _c (°C)	P _c (atm)	V _c (cm ³ /mol)	ρ* (g/cm ³)
Dióxido de Carbono	44,0	30,8	73,0	94,0	0,713
Diclorometano	84,9	245,1	60,9	-	1,322

(Fonte: BIRD et al., 1960.)

*Densidade a 25 °C.

4.2 APARATO EXPERIMENTAL DE COPRECIPITAÇÃO/ENCAPSULAMENTO

Os experimentos de coprecipitação/encapsulamento foram realizados em um aparato experimental baseado na técnica que emprega fluidos pressurizados como antissolventes empregando a técnica denominada *Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids* (SEDS). O aparato utilizado no presente trabalho é o mesmo adotado por Franceschi et al. (2008), Franceschi et al. (2009a,b) e Priamo et al. (2010), que utilizaram no estudo da precipitação e encapsulamento de β-caroteno em PHBV. A Figura 4.1 apresenta um diagrama esquemático do aparato experimental utilizado.

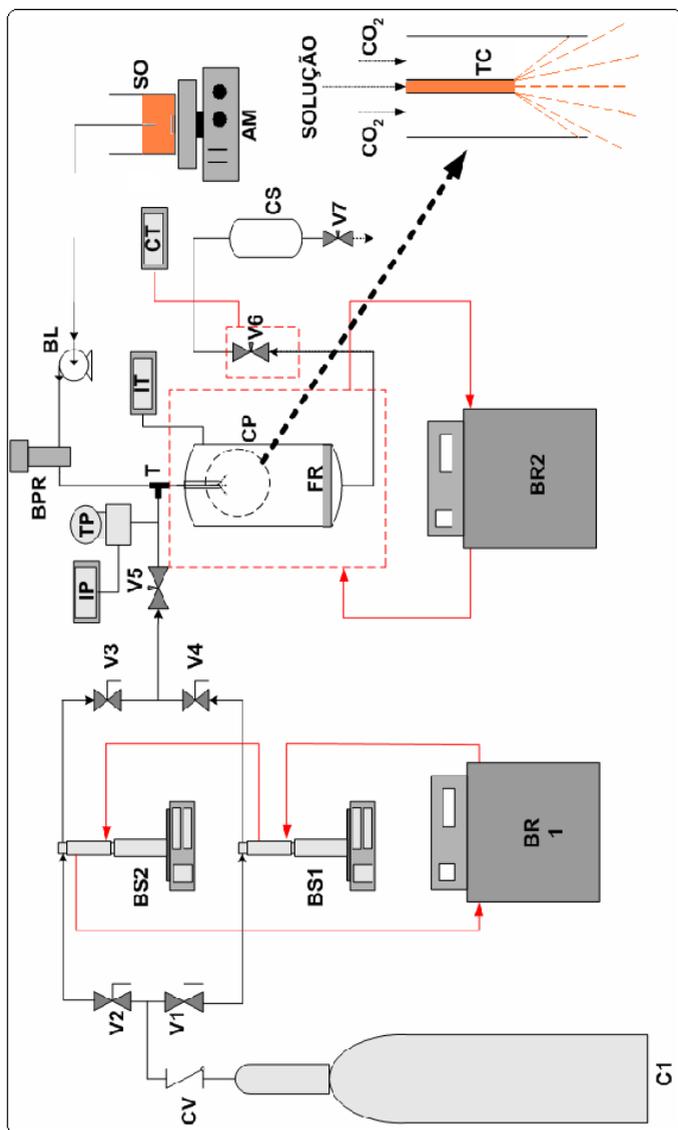


Figura 4.1 - Diagrama esquemático do aparato experimental de coprecipitação.

O aparato experimental utilizado na coprecipitação/encapsulamento da bixina é constituído de:

C1 – Cilindro de Dióxido de Carbono utilizado no armazenamento do fluido empregado como antissolvente 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 o fluxo em um único sentido. Utilizada entre o cilindro e as válvulas V1 e V2 impede que uma sobrecarga de pressão seja aplicada no 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). As válvulas V1 e V2 são responsáveis pelo fluxo do antissolvente até as bombas de alta pressão, enquanto que as válvulas V3 e V4 controlam o fluxo das bombas à câmara de coprecipitação. É permitido o fluxo de antissolvente de uma bomba por vez para a câmara.

BR1 – Banho Ultratermostático de Recirculação 1 (Marca Nova Ética, Modelo 521/2D) é responsável por manter a constante a temperatura nos cilindros das bombas;

BS1 e BS2 – Bombas de Alta Pressão (ISCO 500D). Permitem que se mantenha o fluxo e a pressão contínuo e constante do antissolvente. Possuindo dois cilindros 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). Controla o fluxo de antissolvente das bombas para a câmara de precipitação.

TP – Transdutor de Pressão (Marca SMAR, Modelo LD 301). É conectado à linha entre a válvula **V5** e a câmara de precipitação com intuito de monitorar a pressão no interior da câmara. Transdutor de pressão absoluto opera na faixa de 0 – 250 bar;

IP – Indicador Universal (Marca NOVUS, Modelo N1500). indica a pressão na câmara de precipitação e da linha até a válvula **V5**;

AM – Agitador Magnético (Marca Velp Científica). Mantém a solução orgânica sob agitação durante a realização dos experimentos com auxílio de uma barra magnética de agitação (“peixinho”) facilitando a passagem da solução pelo sistema.

SO – Solução Orgânica. Solução na qual o composto a ser precipitado é dissolvido em um ou mais solventes orgânicos;

BL – Bomba de HPLC Digital Série III (Marca AcufLOW). Utilizada no deslocamento da solução orgânica para a câmara de precipitação. A bomba possui um único pistão que permite operar com fluxo 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.

BPR – Válvula de regulação de Pressão (*Back Pressure Regulator*, Marca GO-Regulator, Série BP-66, Modelo 1A11QE151). Permite a regulação da pressão com uma maior pressão anteriormente a ela e menos posterior ela. Construída em aço inox 316L com uma porta de entrada e uma de saída. Seu controle de pressão é ajustável na faixa de 0 a 690 bar, com faixa de temperatura de operação entre $-313,15$ e $387,15 \text{ K}$. A pressão regulada por esta válvula é monitorada pelo visor do painel da bomba de HPLC;

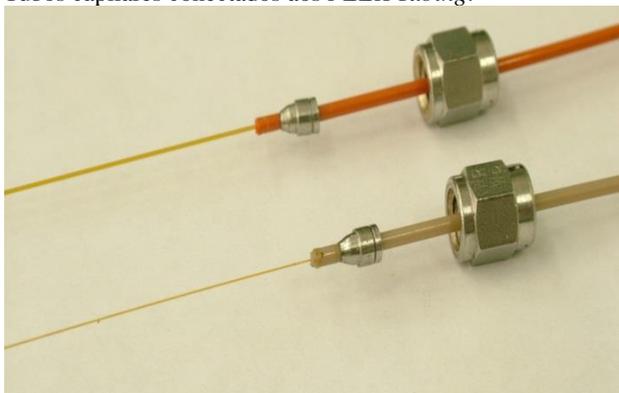
T – Conexão tipo T (Marca Swagelok). Estão conectadas a linha de antissolvente e a linha da solução. Até esta união o antissolvente e a solução fluem por linhas separadas e a partir dela até a câmara de coprecipitação pertencem à mesma linha, tendo a solução escoando por dentro de um tubo capilar e o antissolvente escoando por fora do tubo capilar e por dentro do tubo de aço inox com diâmetro interno de $1,587 \text{ mm}$;

CP – Câmara de Precipitação. Foi utilizada uma câmara cilíndrica de aço inox 316L encamisada, com volume útil de aproximadamente 600 mL (diâmetro interno de 8 cm e altura de 12 cm). Com pressão e temperatura máxima de trabalho, respectivamente, 100 bar e $313,15 \text{ K}$ para a câmara. Possuindo cinco entradas na tampa, uma central para a adição da solução orgânica e do antissolvente e quatro periféricas, três para a inserção do sensor de temperatura, sensor de pressão e saída do antissolvente e solvente orgânico e a quarta conexão periférica fica vedada para uma possível modificação do sistema de

precipitação.

TC – Tubo Capilar de Sílica Fundida. Responsável pela dispersão do jato da solução dentro da câmara de precipitação. 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 180 μm . Na Figura 4.2 pode ser visualizado o capilar conectado ao *PEEK Tubing*.

Figura 4.2 - Tubos capilares conectados aos *PEEK Tubing*.



IT – Indicador de Temperatura (Indicador Universal, Marca NOVUS, Modelo N1500). 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.

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.

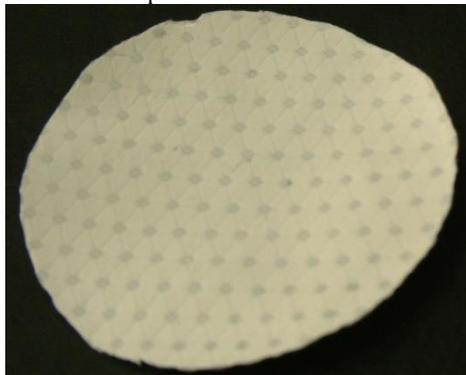
A Figura 4.3 apresenta a câmara de coprecipitação conectada a todas as linhas citadas.

Figura 4.3 – Câmara de precipitação conectada a todas as linhas da unidade de coprecipitação.



FR – Filtro de Retenção. Composto por dois filtros de politetrafluoretileno (PTFE), um com porosidade superficial de aproximadamente $1\ \mu\text{m}$, diâmetro de 8 mm e espessura de 1 mm com função suporte para o outro filtro membrana de politetrafluoretileno ligado a um suporte de polietileno de alta densidade (Marca Millipore, Modelo FGLP) (Figura 4.4). Este segundo filtro possui um porosidade de $0,22\ \mu\text{m}$, diâmetro de 8 mm e espessura de $150\ \mu\text{m}$, permitindo um temperatura de operação de até 403,15 K. Os filtros estão localizados na saída da câmara de coprecipitação com a finalidade de reter as partículas coprecipitadas permitindo apenas o fluxo do antissolvente e do solvente orgânico.

Figura 4.4 - Filtro membrana de politetrafluoretileno.



V6 e linha pontilhada – Válvula métrica tipo agulha (marca HOKE, Modelo 1315G2Y, Pressão de operação até 345 bar) com sistema de aquecimento. Controla o fluxo na saída da câmara juntamente com a válvula **V5**. A válvula **V6** possui uma abertura um pouco maior do que a válvula **V5** para compensar o fluxo de entrada da solução, mantendo assim a pressão constante na câmara de coprecipitação.

O antissolvente sofre uma expansão após sair pela válvula e conseqüentemente congela devido ao efeito Joule-Thompson ser pronunciado, existe a necessidade de um sistema de aquecimento que permite o fluxo de saída constante. Para esta finalidade, utilizou-se uma fita de aquecimento (Marca FISATOM, Modelo 5, 200 W de potência) acoplada a um controlador PID – **CT** – (Marca COEL, Modelo HW1450), onde a válvula **V6** foi envolvida, onde um termopar tipo J foi inserido entre o corpo da válvula e a fita de aquecimento, servindo como um controlador de temperatura. Mantendo uma temperatura alta na fita de aquecimento (373,15 K) impede o congelamento da válvula **V6** permitindo um maior controle do fluxo na válvula.

CS - Trap de segurança. Dispositivo pelo qual o antissolvente e o solvente orgânico se deslicam para saída do sistema, além de ser utilizado para observar a ocorrência de arraste do princípio ativo pelo antissolvente.

As Figuras 4.5 e 4.6 apresentam uma vista mais detalhada da câmara de coprecipitação descrita anteriormente.

Figura 4.5 - Vista da unidade experimental de precipitação.



Figura 4.6 – Vista geral da unidade experimental de precipitação.



4.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DE COPRECIPITAÇÃO

O procedimento experimental adotado neste trabalho utilizado para coprecipitação e encapsulamento em PHBV da bixina, foi realizado seguindo o mesmo procedimento experimental descrito em Franceschi *et al.* (2008), Franceschi *et al.* (2009) e Priamo (2010).

A solução orgânica preparada contendo a bixina pura e o polímero PHBV utilizando diclorometano como solvente orgânico nas proporções desejadas. Após a preparação da solução que seria utilizada, o próximo passo é carregar as bombas de alta pressão (BS1 e BS2) com CO₂ proveniente do cilindro de estocagem.

Esta etapa de carga de CO₂ 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 eram mantidas abertas. Como uma quantidade relativamente grande de CO₂ é utilizada em cada condição experimental, 2000 mL dependendo da condição experimental, é necessário liquefazer a maior quantidade possível deste na câmara das bombas. Apesar da pressão de vapor do CO₂ ser alta a 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.

A temperatura da camisa do cilindro das bombas ajustada em 230,15 K com o auxílio do banho de recirculação BR1 e o cilindro deixado aberto por um tempo, de 30 minutos a uma hora dependendo da quantidade de CO₂ disponível no cilindro de estocagem. Nestas condições, geralmente é possível armazenar cerca de 490 mL de CO₂ no estado líquido dentro da câmara das bombas.

Durante este tempo de liquefação do CO₂ nas bombas, se realiza a montagem da câmara de precipitação. Os filtros de retenção são cuidadosamente colocados na câmara, de forma a evitar que durante o experimento ocorresse algum deslocamento destes e consequentemente arraste do material coprecipitado pelo fluxo de saída. Primeiramente, era colocado o filtro de politetrafluoretileno com maior porosidade servindo de suporte para o filtro membrana que vinha logo a seguir. Posteriormente eram conectados o sensor de temperatura e a linha de saída da câmara de precipitação. Após isto, a câmara era fechada sendo então conectada ao banho termostático.

Durante a liquefação de CO₂ era realizado o ajuste da vazão da solução na bomba de HPLC e da pressão nesta através da manipulação da BPR. Nesta etapa não era utilizada solução, mas diclorometano puro

para evitar gasto desnecessário da solução, já que eram utilizados cerca de 100 mL de líquido durante este procedimento. O ajuste da vazão da solução era feito diretamente na bomba. A pressão na bomba de HPLC era ajustada manipulando-se a BPR de modo a restringir a passagem do fluxo aumentando a pressão até o valor de 2900 Psi (200 bar) para evitar qualquer possibilidade de refluxo do antissolvente pela linha da solução. Após a pressão ter sido alcançada, o diclorometano era deixado fluir por um determinado tempo de modo a estabilizar a pressão.

Após a estabilização da pressão no valor desejado, a vazão era interrompida e diclorometano era substituído pela solução de maneira a retirar todo o diclorometano presente na linha desde a bomba até a saída do tubo capilar. A solução era permitida fluir por cerca de 10 minutos para minimizar a quantidade de diclorometano na linha. A pressão era mantida no valor desejado por intermédio da regulagem da BPR.

Realizada esta etapa, o próximo passo era efetuar a conexão da linha de entrada de CO₂ 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 CO₂, mantendo-se ainda toda a linha aberta desde o cilindro de armazenagem até a câmara.

Estando a câmara de precipitação preenchida com CO₂ na sua pressão de vapor, a válvula V5 era fechada e o sistema de aquecimento, controlado pelo banho de recirculação BR2 era acionado. A temperatura no interior da câmara era 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).

Durante o período de estabilização da temperatura no valor estipulado, a válvula do cilindro e as válvulas V1 a V4 eram fechadas e a pressão era 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 200 bar entre as bombas e a câmara de coprecipitação. Este valor de pressão nas bombas de seringa foi estipulado para manter um alto diferencial de pressão entre as bombas e a câmara de coprecipitação (80 e 100 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 da bixina ou polímero nas linhas e também para fazer com que o CO₂ entrasse com alta velocidade na câmara de precipitação intensificando a dispersão do

jato de solução durante os experimentos de precipitação (Franceschi, 2009).

Quando a temperatura do experimento atingia o valor estipulado, a válvula V5 era novamente aberta gradualmente de modo a permitir o fluxo de CO₂ 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 o fluxo de antissolvente na câmara de precipitação, mantendo-se a pressão constante. O fluxo era controlado principalmente pela válvula V6 e monitorado no visor da bomba de seringa que estava sendo utilizada no momento.

Para evitar o congelamento da válvula V6, a mesma 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 110°C para evitar o bloqueio do fluxo neste ponto e, conseqüentemente, por em risco o andamento do experimento e a integridade física do experimentalista. .

Como auxílio, a válvula V7 também era aberta de tal maneira que a mistura de antissolvente e solvente orgânico que deixava a câmara de precipitação era mantida em duas fases dentro da câmara de separação (CS) evitando uma expansão muito pronunciada do antissolvente na linha.

A temperatura e pressão eram mantidas constantes e o CO₂ era deixado fluir 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 o fluxo de CO₂ não mais variava, era iniciada então a injeção da solução para dentro da câmara de precipitação. Em cada experimento o volume de solução adicionado à câmara foi de exatamente 50 mL. O volume foi fixado neste valor assumindo que a quantidade de sólido (bixina) a ser precipitado era suficiente para a realização das análises.

Após ter sido injetado o volume especificado da solução, o fluxo desta era interrompido e o fluxo de CO₂ eram mantidos por mais um tempo no sentido de efetuar a “secagem” das partículas precipitadas no interior da câmara para retirar o solvente residual ainda presente no meio. O tempo de secagem estabelecido foi de 120 minutos, baseado em trabalhos na literatura que reportam tempos de secagem variando entre 30 e 120 minutos (Kim *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009).

Um aspecto que merece maior detalhamento diz respeito ao

modo com que as bombas de seringa eram operadas. Elas nunca foram utilizadas simultaneamente. Enquanto uma bomba estava sendo utilizada, a outra era carregada com CO₂ para garantir a disponibilidade de antissolvente durante todo o experimento.

Depois de proceder à secagem das partículas, o próximo passo era a despressurização da câmara de precipitação. Para a despressurização, a válvula V5 era fechada e a válvula V6 era mantida com uma abertura tal que permita uma despressurização controlada. Para reduzir a pressão experimental até a pressão atmosférica, o tempo utilizado foi de cerca de 40 minutos, promovendo uma queda de pressão nem muito rápida nem muito lenta de maneira a manter a temperatura constante no valor estipulado.

Terminada a despressurização, o banho BR2 era desconectado da câmara de precipitação, todas as linhas eram desconectadas e a câmara era então aberta para a retirada do material precipitado. Depois de aberta a câmara de precipitação, as partículas precipitadas eram retiradas e colocadas em frascos âmbar de 5 mL. A retirada do precipitado era feita cuidadosamente para evitar que as partículas sofressem qualquer dano. A retirada era feita rapidamente para evitar ao máximo que as partículas absorvessem umidade. As amostras foram coletadas na parede e no fundo da câmara de precipitação. As amostras coletadas foram armazenadas em geladeira devidamente vedadas para proteção contra luz e umidade.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTICULAS

4.4.1 Morfologia e Distribuição do Tamanho das Micropartículas

A morfologia das partículas de bixina encapsuladas em PHBV foi avaliada por observação visual das micrografias de FEG obtidas para as condições experimentais de formação de partículas testadas. A morfologia foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, com um Microscópio Eletrônico de Varredura marca JEOL, modelo JSM-6701F (FEG). Foi utilizada a análise de FEG para bixina devido à degradação das partículas quando utilizando o equipamento de MEV. As amostras coprecipitadas foram dispersas manualmente sobre uma fita condutora dupla-face e disposta em porta-amostra de alumínio, recoberta com uma fina camada de ouro utilizando um aparelho metalizador e posteriormente analisada.

A partir das micrografias de FEG, determinou o tamanho das partículas coprecipitadas utilizando o *software Size Meter* versão 1.1,

desenvolvido por Luiz Henrique Castelan Carlson sob a orientação de Ariovaldo Bolzan (CARLSON; BOLZAN, 2001). A determinação consistiu na avaliação da medida do comprimento em média 500 partículas em cada condição experimental.

4.4.2 Determinação do Percentual de Encapsulamento

Nesta seção é apresentada a metodologia para a quantificação da bixina encapsulada, a qual foi realizada por espectrometria 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.

4.4.2 - Quantificação de Bixina Encapsulado Através do Método de Espectrometria na Região de UV-VIS

Na determinação do percentual e eficiência de encapsulamento se deu através de uma suspensão de determinada massa do coprecipitado em um solvente capaz de dissolver tanto o polímero quanto o princípio ativo encapsulado, e posteriormente sua quantificação através de leituras no espectrofotômetro UV-VIS.

Uma determinada massa de cada amostra obtida nos experimentos de co-precipitação (entre 10 e 40 mg aproximadamente) foi pesada em uma balança analítica com precisão de $\pm 0,100\text{g}$ (Mettler Toledo, modelo XS205 DualRange) e adicionada a diferentes volumes de acetona para remover o excesso de bixina 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 bixina 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 bixina apresentar uma solubilidade menor neste solvente com relação a outros. Sendo assim, o uso deste promove uma retirada mais lenta do bixina não-encapsulado, presente na superfície das partículas de polímero ou livre, evitando ou retardando a retirada do material encapsulado. O procedimento adotado na retirada do bixina não-encapsulado consistiu em suspender as partículas em acetona sem agitação (tempo aproximado de 20 segundos).

Após as amostras terem sido adicionadas ao solvente e suspensas, filtrou-se a suspensão resultante utilizando um filtro membrana de politetrafluoretileno, ligado a um suporte de polietileno de alta densidade (Marca FilterPro, Modelo FGLP) com porosidade de 0,22 μm . Após a filtração, o material retido no filtro foi seco em estufa a 30°C por 3 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 bixina) e a solução resultante analisada em um espectrometro de UV-VIS (Shimadzu, modelo UVMini 1240) na faixa de comprimento de onda de 520 nm.

Como a quantificação de bixina encapsulada nas partículas de PHBV foram realizadas por análises de espectrometria, foi necessário primeiramente construir duas curvas padrão, relacionando a concentração de bixina na solução com sua absorbância máxima em um comprimento de onda específico. Para a construção das curvas padrão, o diclorometano foi utilizado como solvente orgânico por ser o solvente capaz de dissolver o polímero e a bixina. Para a construção da primeira curva padrão, foram preparadas soluções com diferentes concentrações de bixina em diclorometano, enquanto que a construção da segunda curva padrão, foi fixado uma concentração fixa de 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de PHBV dissolvida em diclorometano em cada solução padrão com diferentes concentrações de bixina.

Estas soluções foram então analisadas no espectrometro de UV-VIS na faixa de comprimento de onda de 300 a 700 nm a fim de verificar em qual comprimento de onda ocorria a absorbância máxima da bixina. O objetivo de construir as curvas padrão com bixina puro e com mistura de bixina e PHBV foi verificar se a presença de PHBV na solução leva a uma alteração na absorbância máxima da bixina.

A partir da absorbância da bixina, obtida em espectrofotômetro de UV-VIS, para cada condição experimental, foram determinadas as concentrações destes componentes em diclorometano a partir da curva padrão. Com posse dos valores de concentrações, foi possível obter a massa de bixina 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 bixina encapsulado em cada uma das diferentes amostras analisadas e da massa conhecida do coprecipitado após a filtração e secagem em estufa, determinou-se o percentual real de encapsulamento(PRE%) e a eficiência de encapsulamento

(EE%)(KALOGIANNIS et al., 2006), para cada uma das condições experimentais, através das Equações 4.1 e 4.2, respectivamente:

$$\text{PRE\%} = \frac{\text{Massa de bixina encapsulada}}{\text{Massa de partículas}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4.1})$$

$$\text{EE\%} = \frac{\text{Massa de bixina encapsulada}}{\text{Massa total de bixina}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4.2})$$

onde o percentual teórico de encapsulamento é a razão entre a massa de bixina e a massa de partículas (soma das massas de bixina e PHBV) utilizadas nos experimentos de coprecipitação. A massa total de bixina corresponde ao percentual máximo de encapsulamento de bixina em PHBV.

4.4.3. Liberação *In Vitro* de Bixina Encapsulada em PHBV

Para a determinação dos comportamentos de liberação *in vitro* da bixina encapsulada 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 da bixina 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, etanol anidro, acetona e éter etílico a fim de se obterem os comportamentos de liberação e 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.

As amostras foram adicionadas individualmente nos meios de dissolução (acetato de etila, etanol anidro, cetona e éter etílico) sendo adotado um volume de 10 % em excesso, considerando a solubilidade do soluto no referido solvente (OLIEIRA, 2005; PRIAMO, 2010). As cinéticas foram realizadas em erlenmeyers de 125 mL, onde o material coprecipitado foi colocado em contato direto com o meio de liberação. Os recipientes foram então tampados com suas respectivas tampas, a fim de evitar perdas de solvente por evaporação e envolvidos com papel alumínio a fim de se isolar a solução de qualquer irradiação luminosa,

evitando desta forma a degradação da bixina. Após serem preparados, os erlenmeyers foram colocados em uma incubadora refrigeradora com agitação (Tecnal, modelo TE-424) com temperatura controlada de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitação com movimento orbital circular de 120 rpm.

As cinéticas de liberações foram realizadas por meio de amostras destrutivas, onde em tempos específicos 3 mL da solução contendo o princípio ativo eram retirados 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 as análises partículas suspensas de bixina. Depois da filtração da alíquota a solução resultante era analisada através de um espectroscópio de UV-VIS (Shimadzu, modelo UVMini 1240) na faixa de comprimento de onda de 520 nm a 350 nm, dependendo do solvente utilizado, a fim de determinar a concentração de bixina no meio de liberação em função do tempo. Ainda, para o cálculo das concentrações, utilizou-se a média (obtidas através de triplicatas de observação) dos valores de absorvância juntamente com a curva padrão (calibração) respectiva de cada meio de liberação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos e suas discussões, tanto da produção das partículas coprecipitadas, como da avaliação na liberação *in vitro* da bixina.

5.1. ENCAPSULAMENTO

Os experimentos de coprecipitação de bixina e PHBV, apresentados na Tabela 5.1 foram baseados a partir de planejamentos já realizados anteriormente por Franceschi (2009) e Priamo (2010), tendo como variáveis: concentração de bixina (0,4 mg.mL⁻¹, 0,6 mg.mL⁻¹, 0,8 mg.mL⁻¹ e 1,0 mg.mL⁻¹), concentração de PHBV (1,0 mg.mL⁻¹, 2,0 mg.mL⁻¹, 5,0 mg.mL⁻¹ e 20,0 mg.mL⁻¹), pressão(80 bar e 100 bar) e temperatura (35°C e 40°C). Duas variáveis foram mantidas fixas: a vazão de antissolvente (CO₂) de 20,0 mL.min⁻¹ e vazão da solução(bixina e PHBV) de 1,0 mL.min⁻¹.

Tabela 5.1– Planejamento dos experimentos de encapsulamento

EXP.	T (°C)	P (bar)	[BIXINA] (mg.mL ⁻¹)	[PHBV] (mg.mL ⁻¹)	Massa de bixina (mg)	Massa PHBV (mg)
B1	35	80	0,6	20	31,0	901,0
B2	35	100	0,6	20	34,0	895,0
B3	40	80	0,6	20	38,0	939,5
B4	40	100	0,6	20	29,9	890,5
B5	35	80	0,8	20	41,9	910,8
B6	35	100	0,8	20	40,2	902,1
B7	40	80	0,8	20	43,0	908,3
B8	40	100	0,8	20	42,0	905,9
B9	35	80	1	20	50,2	902,2
B10	40	80	1	20	52,0	904,2
B11	35	80	0,4	20	20,6	901,2
B12	35	80	0,6	5	30,4	225,4
B13	35	80	0,6	2,0	48,7	162,7
B14	40	80	0,6	2,0	48,7	165,1
B15	35	80	0,6	1	49,0	80,3

5.1.1 Quantificação da Bixina por UV-Visível

Em geral todos os carotenóides absorvem luz em comprimentos de onda entre 400 e 500 nm, tendo em seus espectros na região do visível não somente um único pico de absorção, mas sim três picos. Estes três picos estão relacionados às transições dos níveis vibracionais mais baixos dos estados eletrônicos das moléculas aos níveis vibracionais dos estados eletrônicos excitados (Britton et al., 1995).

Para que a quantificação da bixina pudesse ser realizada através de espectrometria de UV-visível, foram realizadas varreduras na faixa de 300 a 700 nm nos diferentes sistemas de solventes propostos, com o propósito da identificação do comprimento de onda que apresentaria o valor de absorbância mais adequado para a metodologia de análise. Os espectros apresentaram uma pequena diferença de comportamento, conforme se variava o solvente. De forma que os comprimentos de onda mais adequados estiveram nas faixas de 520 a 452 nm (Tabela 5.2). Essas mudanças nos valores dos comprimentos de onda máximos esta relacionado com o solvatocromismo (capacidade de uma substância para alterar a sua cor por alteração da polaridade do solvente). Um solvente polar tem maior interação com a molécula em seu estado fundamental, com isso necessita de uma maior energia de transição eletrônica, e consequentemente absorverá em um comprimento de onda inferior. Enquanto que os solvente apolares, apresentam uma maior interação com a molécula em seu estado excitado, necessitando de uma menor energia de transição eletrônica, assim absorvem em valores de comprimentos de onda maiores (REICHARDT, 1994). Os gráficos de absorbância versus comprimento de onda estão localizados no apêndice A.

Tabela 5.2 – Absorbância máxima da bixina nos diferentes solventes

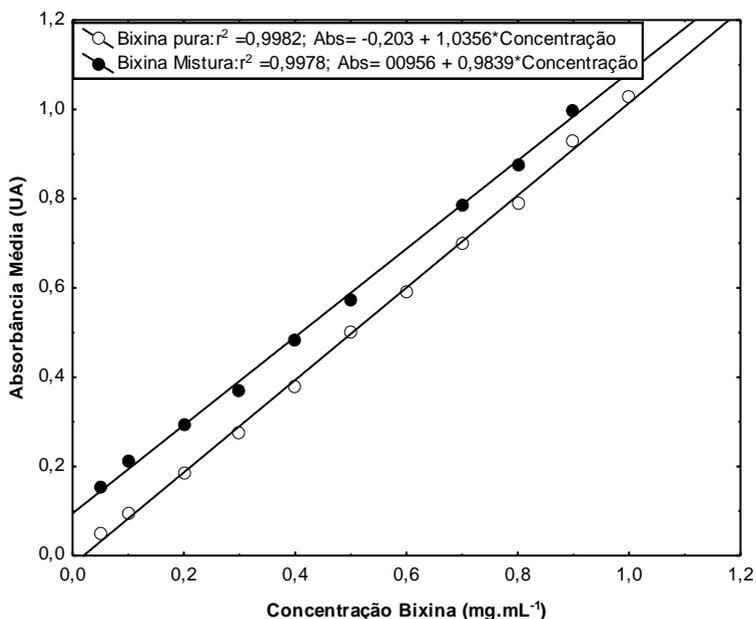
Solvente	Absorbância da Bixina [UA]
Diclorometano	520.0
Acetona	458.0
Etanol anidro	455.5
Acetato de etila	453.5
Éter etílico	452.0

Na etapa de quantificação da bixina encapsulada através de espectrofotometria de UV-visível, foram realizadas a construção de duas curvas padrões uma com a bixina pura e outra para mistura de bixina e 0,1 mg.mL⁻¹ de PHBV, a fim de verificar uma possível influência do

polímero na absorvância máxima da bixina, conforme descrito no item 3.4. O comprimento de onda de 520 nm foi escolhido por ser verificado, que neste comprimento de onda ocorre um dos picos de absorvância máxima da bixina (Apêndice A). As informações destas curvas encontram-se no apêndice B.

Os resultados apresentados na Figura 5.1 mostram que houve uma diferença entre 6 e 67% nos valores encontrados de absorvância da bixina na solução preparada pura e da mistura.

Figura 5.1 – Curva padrão da absorvância média de bixina pura e de bixina e PHBV em 520 nm em função da concentração em diclorometano.



É perceptível nos pontos experimentais que representam a concentração de bixina pura em diclorometano (○) e os pontos que representam a concentração de bixina em diclorometano com PHBV (●) em função da absorvância em 520 nm que diferem mais quanto menor é a concentração da solução.

O grau de relação entre as variáveis, de como as trocas de uma produzem efeitos diretos sobre a outra é o coeficiente de correlação (r^2). Neste caso, uma das variáveis é a concentração de bixina na mistura e a outra, a resposta instrumental, a absorvância. Como o coeficiente de

correlação da curva padrão bixina na mistura e diclorometano foi superior a 0,99, estando dentro dos padrões recomendados pela ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - (RE nº 899/03) e INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - (DOQ-CGCRE-008, 2003), foi possível determinar a concentração de bixina em cada uma das amostras coprecipitadas de forma mais segura e exata pela equação da reta resultante da curva padrão bixina e PHBV.

5.1.2 Eficiência de Encapsulamento

A partir da curva de calibração determinada (bixina e 0,1 mg.mL⁻¹ de PHBV) e as Equações 4.1 e 4.2 anteriormente descritas no Capítulo 4 da metodologia, determinou-se os percentuais reais (PRE%) e as eficiências de encapsulamento (EE%) para as amostras coprecipitadas, como demonstrado na Tabela 5.5. Nesta mesma tabela também estão contidos os valores do percentual teórico de encapsulamento (PTE%), definido como a razão percentual entre as massas de bixina e o somatório das massas (bixina + PHBV) utilizadas em cada condição experimental de coprecipitação.

Tabela 5.5 - Resultados do percentual teórico de encapsulamento (PTE), do percentual real de encapsulamento (PRE), eficiência de encapsulamento (EE) da co-precipitação de bixina e PHBV.

EXP.	PTE%	PRE %	EE (%)
B1	3,3	0,9	27,1
B2	3,7	2,7	74,2
B3	3,9	1,1	29,4
B4	3,2	0,7	21,0
B5	4,4	0,5	10,6
B6	4,3	0,3	6,4
B7	4,5	0,4	9,1
B8	4,4	0,8	18,6
B9	5,3	2,1	40,2
B10	5,4	3,0	54,4
B11	2,2	1,1	48,9
B12	11,9	2,2	18,2
B13	23,0	4,0	17,2
B14	22,8	18,4	80,7
B15	37,9	34,9	92,0

Como pode ser observado a condição experimental B15 foi a que se apresentou com o maior percentual de encapsulamento, 34,9% de bixina encapsulada, representando uma eficiência de encapsulamento de 92,0%. Seguida do experimento B14 que resultou em um percentual de encapsulamento de 18,4% e uma eficiência de encapsulamento de 80,7%. Em contrapartida, os dois experimentos que demonstraram piores resultados com relação ao percentual de encapsulamento e consequentemente de eficiência de encapsulamento foram os B6 e B7, com 0,3 e 0,4% de percentual de encapsulamento, e 6,4 e 9,1% de eficiência de encapsulamento, respectivamente. Segundo Jafari et al. (2008), um processo de encapsulação para ser considerado uma sucesso, deve resultar em um pó, tendo mínimo teor de superfície nas microcápsulas e uma retenção máxima no interior do núcleo (partícula) das capsulas.

Alguns autores mencionam que quanto maior a afinidade entre o principio ativo e o polímero utilizado, mais forte a tendência que o

composto se incorpore no polímero e aumente consideravelmente a eficiência de encapsulamento (Priamo, 2010).

A justificativa destes maiores PRE% seria a relação do percentual em massa de bixina, uma das relações mais importante no processo de encapsulamento quando utilizado CO₂ como antissolvente é a relação entre as concentrações do material a ser encapsulado e o agente encapsulante, parâmetro principal na eficiência de encapsulamento e na morfologia das micropartículas formadas (Yeo e Kiran, 2005; Mattea et al., 2008). O PTE% variou entre 3,33 e 37,91 % em relação à massa total de bixina e PHBV na solução. As amostras que apresentaram maiores percentuais de encapsulamento e também maiores eficiências de encapsulamento (B14 e B15) foram os experimentos em que as massas escolhidas inicialmente, tanto do agente encapsulante como do agente encapsulado, apresentaram uma maior relação de percentual em massa de bixina de 37,9 e 22,8% respectivamente. Enquanto as duas com menores valores de PRE % (B6 e B7) obtiveram 4,3 e 4,5% respectivamente de PTE %.

A Figura 5.2, representa o produto da coprecipitação das partículas de bixina e PHBV.

Figura 5.2 – Partículas coprecipitadas de bixina e PHBV referentes ao experimento B5.



Foram realizadas as medidas das dimensões das partículas, com os valores de tamanho mínimo ($X_{\text{mínimo}}$), tamanho máximo ($X_{\text{máximo}}$) e tamanho médio ($X_{\text{médio}}$) bem como os respectivos desvios padrão (σ) e coeficiente de variação (CV %) para cada ensaio realizado através das micrografias, os resultados estão representados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Valores do tamanho de partículas nas diferentes condições experimentais.

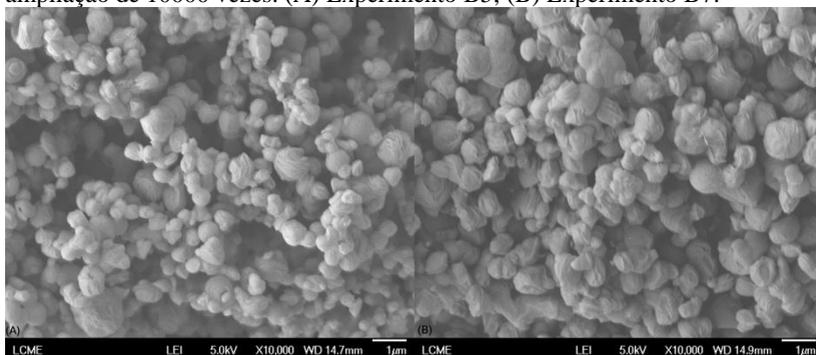
Amostra	$X_{\text{mínimo}}$ [nm]	$X_{\text{máximo}}$ [nm]	$X_{\text{médio}}$ [nm]	σ	CV (%)
B1	103,4	518,7	248,9	84,8	34,0
B2	86,2	775,4	276,0	137,7	49,9
B3	161,7	1040,5	491,9	166,3	33,8
B4	71,0	1001,0	341,9	157,8	46,2
B5	86,9	981,1	363,8	142,1	39,1
B6	16,9	931,2	308,0	191,2	62,1
B7	17,0	311,4	532,4	205,2	38,6
B8	65,6	1246,7	319,4	161,8	50,7
B9	75,8	589,3	248,6	96,4	38,8
B10	137,9	1658,0	546,8	179,5	32,8
B11	35,7	820,6	291,8	120,8	41,4
B12	46,4	578,9	197,2	102,9	52,1
B13	86,2	724,1	291,9	122,5	42,0
B14	135,6	796,6	410,5	119,8	29,2

5.1.2.1 Efeito da temperatura

Subra et al.,(2005) reporta a existência do efeito inversamente proporcional com relação ao tamanho e da distribuição do tamanho de partículas com relação a temperatura do sistema. Conforme a temperatura de encapsulamento é aumentada, existe uma tendência estatística do tamanho e distribuição das partículas diminuírem.

Comparando dois experimentos, o B5 e B7 realizados a mesma pressão (80 bar), concentração de bixina ($0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$) e concentração de PHBV (20 mg.mL^{-1}), alterando somente a sua temperatura de 35°C e 40°C respectivamente, é possível notar na Figura 5.3 um maior tamanho de partículas a 35°C que a 40°C , enquanto a primeira teve sua faixa de comprimento em $86,9 - 981 \text{ nm}$ a segunda obteve a faixa em apenas $17,0 - 311,4 \text{ nm}$ de comprimento.

Figura 5.3 – Micrografias de MEV da bixina encapsulada a 35 e 40°C com ampliação de 10000 vezes. (A) Experimento B5; (B) Experimento B7.



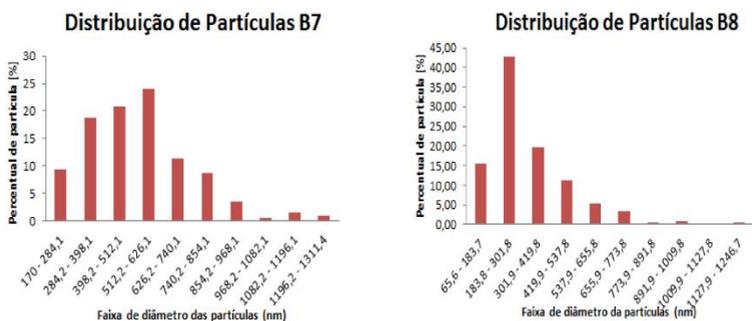
Desta forma os processos de coprecipitação possui um efeito relacionado diretamente com o aumento da temperatura, quando se aumenta a temperatura do sistema, as micropartículas apresentam uma maior tendência de se aglomerarem (Suo et al., 2005).

5.1.2.2 Efeito da pressão

Apesar do aumento da taxa de pressão ser um parâmetro importante no controle do dimensionamento das partículas e de sua morfologia, resultados contraditórios têm sido relatados e obtidos por diferentes autores, sobre a influência da pressão no tamanho de partícula (Yeo, 1993; Randolph, 1993; Dixon, 1993; Robertson, 1997; Schimtt, 1995; Johnston, 1994; Gao, 1998). Autores como Randolph (1993) e Gao (1998) reportam que a ocorrência de uma redução no tamanho de partículas, outros como Yeo (1993) e Schimtt (1995) acharam que o processo é insensível a este parâmetro e outros como Robertson (1997) afirmam um aumento de tamanho de partícula.

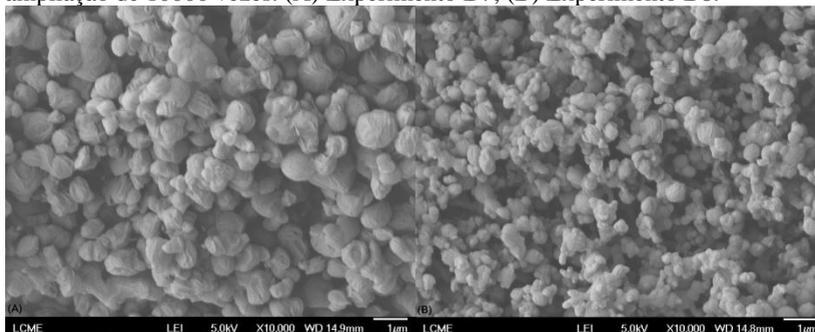
Nos experimentos B7 e B8, as concentrações de bixina ($0,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), concentrações de PHBV ($20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) e temperatura foram mantidas constantes, variando apenas a pressão do sistema de 80 bar para 100 bar respectivamente, se observou uma diminuição da distribuição do tamanho médio de partículas, como é demonstrado na Figura 5.4. No diagrama da partícula B7 a distribuição média das partículas ficaram na da faixa de 512,2 - 626,1 nm, enquanto que no diagrama B8 tomou proporções menores, na faixa de 183,8 - 301,8 nm. Estes resultados entram em acordo com o reportado por Randolph (1993) e Gao (1998).

Figura 5.4 – Diagrama de distribuição do tamanho de partículas B7e B8.



Na Figura 5.5 é demonstrado que visivelmente os tamanhos de partículas do experimento B7 são maiores que no experimento B8, seguindo a explicação da maioria dos autores mencionados anteriormente, com o aumento da pressão, ocorre uma diminuição do tamanho de partículas; o aumento da pressão leva a um aumento da densidade do fluido supercrítico., melhorando a dispersão da solução no antissolvente, diminuindo desta forma o tamanho das partículas (CHEN ET al., 2007).

Figura 5.5 – Micrografias de MEV da bixina encapsulada a 80 e 100 bar com ampliação de 10000 vezes. (A) Experimento B7; (B) Experimento B8.



5.1.2.3 Efeito da concentração do encapsulado

Suo et al. (2005) realizaram vários experimentos no intervalo de 0,6 g/L a 1,0 g/L de bixina, a fim de explorarem o efeito da concentração do soluto na solução, concluindo que existe uma influência bem pronunciada da concentração sobre o tamanho médio de partícula.

Reverchon et al. (2008) reportam a explicação do aumento do tamanho da partícula com a concentração da solução, podendo ser explicada em termos de processos de nucleação e de crescimento. Quando soluções diluídas são injetadas, a saturação e a precipitação do soluto ocorrem tardiamente durante o processo de expansão das gotículas. Desta forma, a nucleação é o mecanismo predominante nestas condições e partículas menores são formadas. Quando são utilizadas soluções mais concentradas, a precipitação do soluto é obtida mais rapidamente durante o processo de expansão e o mecanismo de crescimento das partículas intercepta com o da nucleação, produzindo partículas de maiores dimensões.

Foi exatamente o mesmo perfil observado nos experimentos realizados a temperatura de 40°C, 80 bar e concentração de PHBV de 20 mg.mL⁻¹. A Figura 5.6 mostra a diferença de tamanho entre as partículas do experimento B3, B7 e B10 com concentrações de bixina na solução de 0,6 mg.mL⁻¹, 0,8 mg.mL⁻¹ e de 1,0 mg.mL⁻¹, respectivamente. As micrografias possuem uma magnificação de tamanho da ordem de 1000 vezes o tamanho original.

Figura 5.6 – Micrografias de MEV da bixina encapsulada a 40°C, 80 bar com ampliação de 10000 vezes. (A) Experimento B3; (B) Experimento B7; (C) Experimento B10.

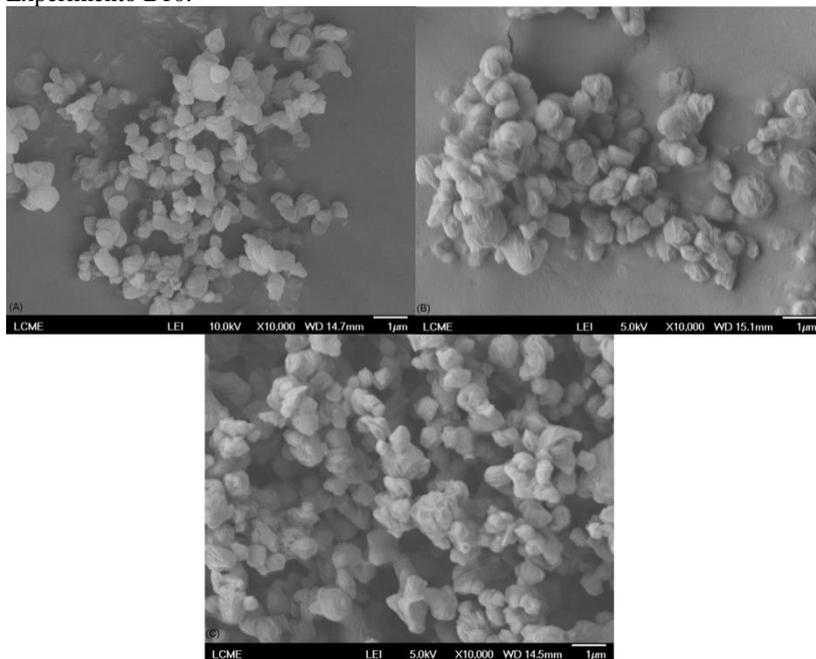
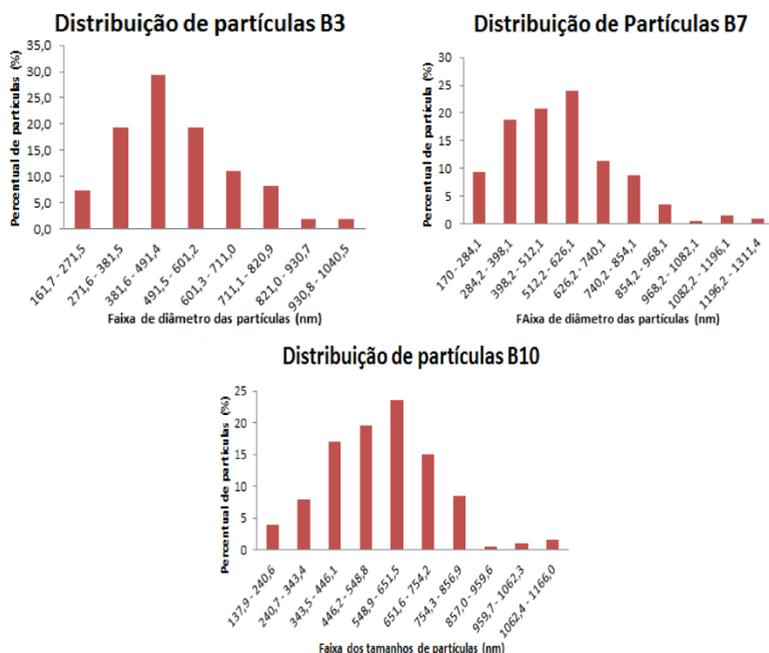


Figura 5.7 são apresentadas as distribuições do tamanho de partículas dos mesmos experimentos, sendo notável que a distribuição média das partículas B3 ficaram na da faixa de 381,6 – 491,4 nm de comprimento, enquanto no experimento B7 a faixa foi de 512,2 – 626,1 nm e por último as partículas B10 obtiveram uma distribuição média na faixa de 548,9 – 651,5 nm.

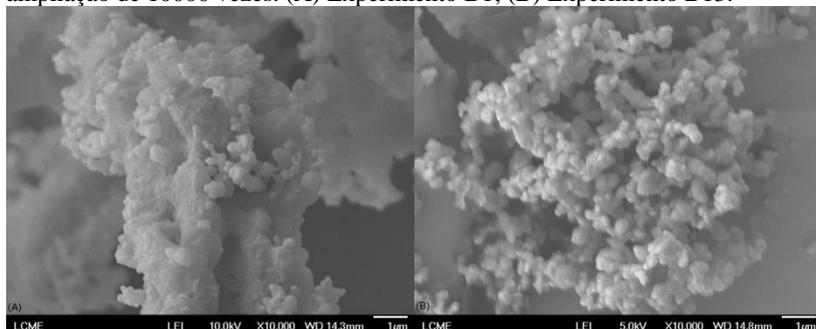
Figura 5.7 – Diagrama de distribuição do tamanho de partículas B3, B7 e B10.



5.1.2.4 Efeito da concentração do encapsulante

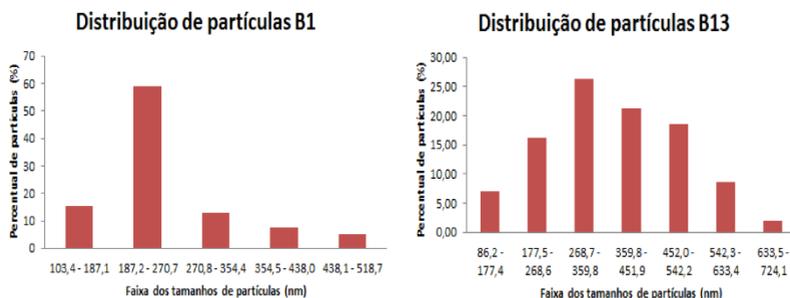
Como já foi mencionado anteriormente, segundo Yeo e Kiran (2005), alterando-se a relação entre o encapsulante e o encapsulado tende a se alterar tanto as propriedades de eficiência como a de morfologia. Comparando desta forma dois experimentos em que foram mantidas todas as outras condições, como a temperatura 35°C, pressão 80 bar, concentração de bixina 0,6 mg.mL⁻¹, e variando apenas a concentração do material encapsulante (PHBV) de 20 a 2 mgmL⁻¹ pode ser observado pela da Figura 5.8, as micrografias dos dois experimentos, B1 e B13, que conforme se diminuiu a concentração de PHBV as partículas se tornaram maior e mais aglomeradas. Aumentando desta forma, o tamanho médio das partículas.

Figura 5.8 – Micrografias de MEV da bixina encapsulada a 35°C, 80 bar com ampliação de 10000 vezes. (A) Experimento B1; (B) Experimento B13.



Na Figura 5.9 a distribuição do tamanho de partículas dos mesmos experimentos, demonstram que a distribuição média das partículas B1 estão na faixa de 187,2 – 270,7 nm enquanto que no experimento B13 a faixa de distribuição média é 268,7 – 359,8 nm.

Figura 5.9 – Diagrama de distribuição do tamanho de partículas B1 e B13



5.2 LIBERAÇÃO *IN VITRO* DAS PARTÍCULAS DE BIXINA ENCAPSULADAS EM PHBV

A seguir são apresentados os resultados obtidos referentes aos comportamentos de liberação *in vitro* das partículas de bixina encapsuladas em PHBV e submetidas a diferentes meios de dissolução, como etanol anidro, acetato de etila, acetona e éter etílico na temperatura de 28°C e 120 rpm conforme procedimento experimental citado no item 4.4.3 do Capítulo 4. Foram estudados os comportamentos de dissolução para os experimentos B12, B13 e B14 mencionados na

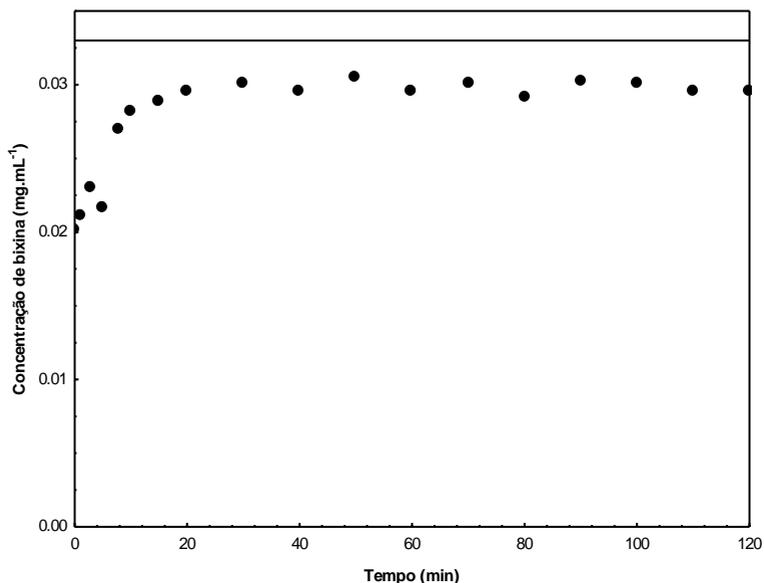
Tabela 5.1, uma vez que estes apresentaram os maiores de PRE% e EE%, e pelas disponibilidade de massas dos produtos obtidas.

Em Apêndice (Apêndice B) encontram-se as tabelas e figuras utilizadas na construção das curvas de calibrações, contendo suas respectivas absorbâncias médias para os meios de dissolução propostos (acetona, acetato de etila, etanol e éter etílico). Ainda, na mesma seção são apresentadas as tabelas que contemplam os ensaios de dissolução, contendo as absorbâncias médias e desvios padrões, as concentrações liberadas nos intervalos de tempo e os percentuais de liberações (em relação às respectivas massas iniciais de bixina encapsulada utilizada em cada ensaio).

O mecanismo de liberação de princípios ativos em sistemas de blendas é resultado do processo de difusão, onde o princípio ativo (bixina) é transportada de dentro das blendas de PHBV para o solvente (meio de dissolução), resultando desta forma em movimentos moleculares aleatórios que percorrem pequenas distâncias. Em muitos polímeros esta difusão não é adequadamente descrita através da lei de Fick ou por quaisquer expressões dela derivada. Estas expressões são dependentes da concentração e condições de fronteiras constantes. Isto se verifica principalmente quando a substância penetrante provoca no polímero grande aumento de volume, como é o caso dos plastômeros ("glassy polymers"), que apresentam comportamento não-Fickiano ou anômalo. Nos elastômeros ("rubbery polymers"), como é o caso do polímero PHBV a difusão geralmente é regida pela lei de Fick (Costa e Lobo, 1999).

A Figura 5.10 apresenta o perfil de liberação *in vitro* da bixina encapsuladas em PHBV e submetidas ao meio contendo acetona na temperatura de 28 °C e 120 rpm.

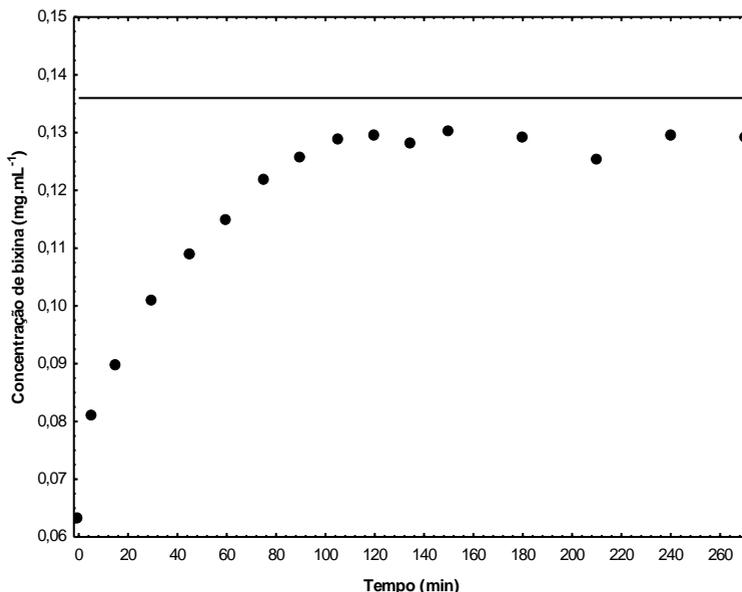
Figura 5.10– Perfis de liberação *in vitro* das partículas de bixina encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução na temperatura de 28 °C e 120 rpm para o experimento B13 em acetona.



Pela Figura 5.10 constatou-se que o comportamento da dissolução da bixina no sistema atinge um patamar de liberação máximo em aproximadamente 30 minutos, com uma variação na liberação de 61,00 a 91,08 % da massa total de bixina inicialmente encapsulada. O efeito *burst*, onde uma alta carga do princípio ativo encapsulado é rapidamente liberado, foi observado nos primeiros minutos do ensaio de liberação. Esta rápida liberação pode ser explicada pela alta solubilidade do sistema composto pela bixina e PHBV em acetona.

A Figura 5.11 apresenta o perfil de liberação *in vitro* das partículas de bixina encapsulada em PHBV submetidas à dissolução em acetato de etila na temperatura de 28 °C e 120 rpm.

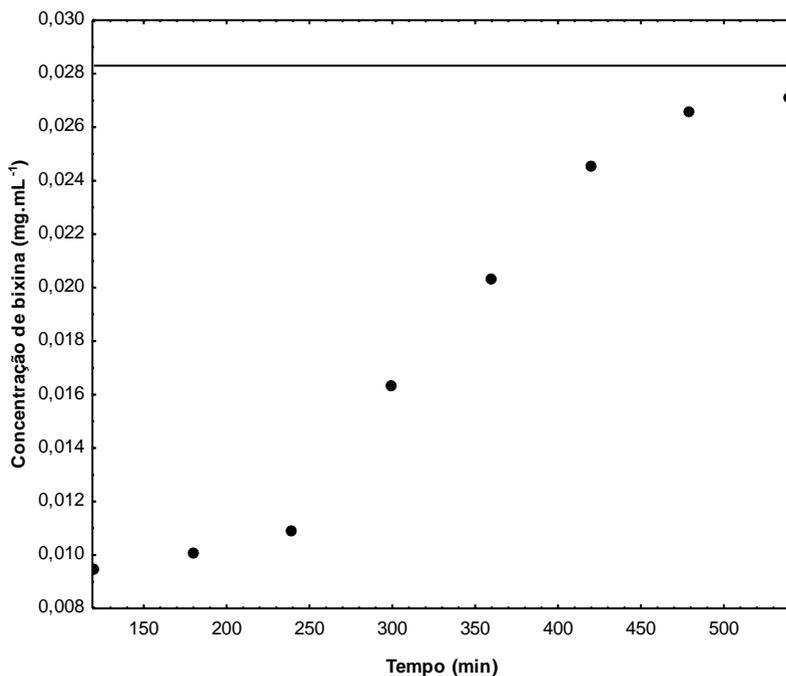
Figura 5.11 – Perfis de liberação *in vitro* das partículas de bixina encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução na temperatura de 28 °C e 120 rpm para o experimento B14 em acetato de etila.



Com base na Figura 5.11 constatou-se que em acetato de etila a liberação ocorreu de forma menos pronunciada do que a ocorrida em acetona, não sendo evidenciado desta forma o efeito burst. A liberação alcançou o patamar de liberação máxima após 100 minutos do início da dissolução. Por sua vez a dissolução da bixina no sistema se propagou com uma variação na liberação de 45,84 a 94,28 % da massa inicialmente encapsulada de bixina.

Na Figura 5.12 é apresentado o perfil de liberação *in vitro* das partículas de bixina encapsulada em PHBV submetidas à dissolução em éter etílico na temperatura de 28 °C e 120 rpm.

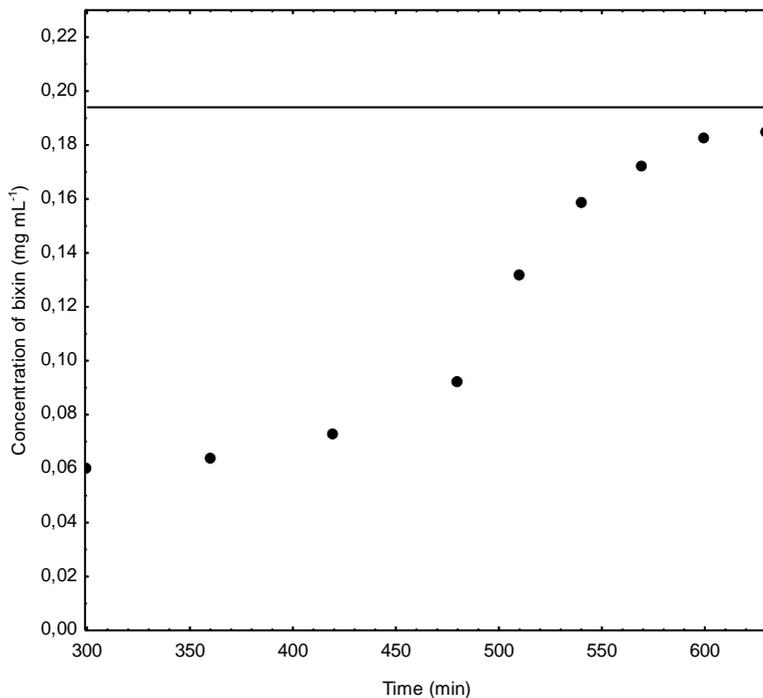
Figura 5.12 – Perfis de liberação *in vitro* das partículas de bixina encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução na temperatura de 28 °C e 120 rpm para o experimento B13 em éter etílico.



Na cinética de liberação do éter etílico, foi observado um retardo no processo de liberação da bixina, com início somente após 120 minutos. O efeito *burst* aqui não foi detectado, não ocorreu a liberação rápida de uma alta carga de bixina do sistema. Durante o processo, a variação na liberação foi de 33,47 a 95,78 % da carga total inicial de bixina. 94,28 % 95,78 %

Foi realizada a liberação da bixina em um meio onde ela fosse pouco solúvel, 10 vezes menos solúvel que a acetona. A Figura 5.13 apresenta o perfil de liberação *in vitro* das partículas de bixina encapsulada em PHBV submetidas à dissolução em etanol anidro na temperatura de 28 °C e 120 rpm.

Figura 5.12 – Perfis de liberação *in vitro* das partículas de bixina encapsuladas em PHBV submetidas à dissolução na temperatura de 28 °C e 120 rpm para o experimento B15 em etanol.



Comparando os perfis de liberação dos outros solventes utilizados (acetona, acetato de etila e éter etílico) o etanol anidro foi o que apresentou o maior tempo para dar início a liberação, somente a partir dos 300 minutos houve uma liberação significativa. Neste sistema a liberação apresentou uma variação de 30,86 a 95,23 % de carga total da bixina encapsulada.

Conforme se alterava o meio de dissolução, se alterava os tempos para início da liberação de bixina. Esta variação de tempos para o alcance da carga máxima de liberação é uma função da polaridade dos solventes utilizados. Como os carotenoides são apolares, nos processos de liberação que foram utilizados solventes apolares, ocorreu de maneira mais rápida o processo de difusão da bixina através das blends poliméricas.

As moléculas constituintes de solventes polares apresentam

regiões eletronicamente densas, maiores momentos dipolos e constantes dielétricas, tendo uma maior facilidade no processo de solvatação de qualquer substância com características polares. Os solventes em questão seguem uma ordem crescente quanto a polaridade: Etanol anidro < éter etílico < acetato de etila < acetona. Os dois extremos em termos da polaridade dos solventes aqui mencionados são, a acetona (polar) e o etanol anidro (apolar), respectivamente como o menor e o maior tempo para o início da liberação de bixina.

A tabela 5.6 apresenta os valores de solubilidade da bixina a 25°C. Observa que quanto mais solúvel, acetona 1,5 mg.mL⁻¹, o princípio ativo for a um determinado solvente, menor será o tempo para o início da liberação e conseqüentemente o inverso também se faz verdadeiro.

Tabela 5.6 – Solubilidade da bixina em diferentes solventes a 25°C

Solvente	Bixina (mg mL ⁻¹)
Acetona	1,5
Acetato de etila	0,89
Etanol Anidro	0,18
Diclorometano	1,1
Éter etílico	0,37

FONTE: Adaptado de Oliveira, (2005) e Suo et al.,(2005)

Com relação à carga total de bixina encapsulada que deveria ser liberada durante os processos de liberações, pode-se verificar que as nano partículas não as liberaram durante os ensaios, podendo indicar que estas partículas devem apresentar maiores tempos de liberação que os estudados.

A questão mais importante durante o desenvolvimento de tecnologias utilizadas em liberações controladas está em conhecer as formas que estas ocorrem, como por exemplo, o tempo com que a carga máxima do princípio ativo encapsulado é liberada ao meio de interesse (AZEVEDO, 2005). Empresas de alimentos estão buscando estas tecnologias de revestimento a fim de proteger sabores e aromas, durante o processo de estocagem além de ter uma rápida liberação durante o consumo do produto final.

6. CONCLUSÕES

6.1 CONCLUSÕES GERAIS

Observou-se neste trabalho de produção de micro e nanopartículas de bixina e PHBV bons percentuais de encapsulamento, indicando eficiência da técnica SEDS para o sistema proposto.

As micropartículas de bixina e PHBV preparadas por SEDS, resultaram em materiais esféricos ou quase esféricos, apresentando um tamanho de partícula mínimo de 17,0 nm e máximo de 1658 nm, caracterizando assim o domínio de nanopartículas. Uma eficiência de encapsulação de até 92,0 % pode ser obtida para o sistema em questão.

A análise dos resultados permite afirmar que a relação encapsulante/encapsulado tem grande influência na eficiência de encapsulamento como na morfologia das partículas.

A temperatura e a pressão possuem uma relação inversamente proporcional com a distribuição no tamanho de partículas. Enquanto que a temperatura apresenta uma relação diretamente proporcional à aglomeração das mesmas.

Observou-se também que soluções mais concentradas do agente encapsulado, ocasionam a produção de partículas com dimensões maiores.

Já no estudo da liberação *in vitro* do corante natural cis-bixina, quando realizado em acetona resultou em uma liberação rápida da carga total de bixina anteriormente encapsulada, porém não gradual. Nos outros solventes, acetato de etila, éter etílico e etanol, solventes com características mais polares, a bixina não apresentou uma liberação tão rápida da carga total de bixina encapsulada, demonstrando que o composto apresenta característica apolar. Desta forma para que os compostos bioativos apolares apresentem uma liberação mais gradual e lenta são indicados meios com características mais polares.

Estes sistemas de microencapsulamento e liberações podem oferecer vantagens com relação aos sistemas de liberação convencionais, principalmente na área da saúde, onde pode ser permitido o desenvolvimento dos sistemas de liberação com pequenas quantidades de princípios ativos a serem liberados em momentos e locais apropriados.

6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Trabalhar com outros biopolímeros e outras metodologias de microencapsulação e nanoencapsulação para a bixina;
- ✓ Testar a estabilidade das partículas produzidas, estudando a influência da temperatura e da radiação luminosa, assim como a degradação in vitro das partículas;
- ✓ Avaliar a estabilidade oxidativa da bixina encapsulada;
- ✓ Estudar o comportamento da metodologia e técnica com outros princípios ativos;
- ✓ Realizar estudos com outros solventes na etapa de liberação, da mesma forma que as variações de temperatura e agitações;

7. REFERÊNCIAS

- AGNER, A. R.; BARBISAN, L. F.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D. M. F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annato in the rat liver medium-term assay. **Food and chemical toxicology**. v. 42(10), p. 1687-1693, 2004.
- ALBINI, L. T. Solubilidade do biopolímero PCL em solventes para aplicação no processo de microencapsulação. **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR** – Brasil, abril de 2012.
- ALMEIDA, V. C. Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação e extração de corantes têxteis em efluentes industriais. **Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR** – Brasil, 2006.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). “**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**”. *Resolução RE n^o 899*, de 29/05/2003 – ANVISA.
- ANTUNES, S. Micronização Supercrítica do β -Caroteno. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica). Instituto Superior de Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa**, 2007.
- AUGUSTIN, M.A.; Sanguansri, L.; Margetts, C.; Young, B. Microencapsulation of food ingredients. **Food Australia**, v. 53(6), p. 220-223, 2001.
- AZEVEDO, H. M. C. ENCAPSULAÇÃO: APLICAÇÃO À TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Brazilian Journal of Food and Nutrition – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista – Araraquara, SP**. v. 16(1), p. 89-97, 2005.
- BAGCHI K, PURI S. Free radicals and antioxidants in health and disease. **Journal Eastern Mediterranean Health**. v. 14, p. 350-360, 1998.

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

BANSODE, S. S.; BANARJEE, S. K.; GAIKWAD, D. D.; JADHAV, S. L.; THORAT, R. M. Microencapsulation : A review . **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 1, p. 38-43, 2001.

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

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

BAUTISTA, A. R. P. L, et al. Avaliação da toxicidade oral subcrônica da bixina para ratos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40(2), p. 229-233, 2004.

BERSET, C. État des recherches sur les colorants alimentaires naturels. **Industries Alimentaires et Agricoles**, v. 107, p. 1163-1166, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Legislação. Portaria n.540, Regulamento técnico: aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia de fabricação. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA), BRASIL: 27 de outubro de 1997.

BRAZEL, C.S. Microencapsulation: offering solutions for the food industry. **Cereal Foods World**, v. 44(6), p. 388-393, 1999.

BIRD, R. Byron; STEWART, Warren E.; LIGHTFOOT, Edwin N. **Transport Phenomena**. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1960

BRUNEL, D. G. Influência da incorporação de aditivos nas propriedades do poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) – PHBV.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais), Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP – Brasil, 2008.

CHEN, A.Z.; PU, X.M.; KANG, Y.Q.; LIAO, L.; YAO, Y.D.; YIN, G.F. Study of poly(L-lactide) microparticles based on supercritical CO₂. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, p. 2339 – 2345, 2007.

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

CORLETT, F. M. F. Qualidade fisiológica de sementes de urucum (*Bixa Orellana* L.) armazenadas em diferentes ambientes e embalagens. **Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS – Brasil, 2004.**

DASHEVSKY, A.; ZESSIN, G. The effect of ethylcellulose molecular weight on the properties of theophylline microspheres. **Journal Microencapsulation**. v. 4(3), p. 273–280, 1997.

DE ROOS, K.B. Physicochemical models of flavour release from foods. In: Roberts DD, Taylor AJ, eds. **Flavour release. Washington, DC: American Chemical Society**, p. 126–41, 2000.

DIXON, D.J., Johnston, K.P., Bodmeier, R.A. Polymeric materials formed by precipitation with a compressed fluid antisolvent. **Journal AIChE**, v. 39(1), p. 127–139, 1993.

EMBLETON, J. K.; TIGUE, B. J. Polymers for Biodegradable Medical Devices XI. Microencapsulation studies: characterization of hydrocortisone-loaded poly-(hydroxybutyratehydroxyvalerate) microspheres. **Journal of Microencapsulation**. v. 19(6), p. 737-752, 2002.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, p. 485-494, 2002.

FÁVARO-TRINDADE C. S.; P;inho, S. C. ; ROCHA, G. A. . Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**. Preprint Serie, v. 11, p. 103-112, 2008.

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

FRANCESCHI, E.; CESARO, A. M.; FEITEN, M.; FERREIRA, S. R. S.; DARIVA, C.; KUNITA, M. H.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 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**, v. 95, p. 656-663, 2009b.

FRANCO, C.O.F. Corantes naturais de urucum (*Bixa orellana* L.) no tratamento da hiperlipidemia e câncer em animais. **Tese (Pós-Doutorado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG - Brasil**, 2008.

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**, v. 102(2), p. 313-332, 2005.

GANDER, B.; JOHANSEN, P.; NAMTRÂN, H.; MERKLE, H. P. Thermodynamic approach to protein microencapsulation into poly(D,L-lactide) by spraydrying. **International Journal of Pharmaceutics**, v.129, p.51–61, 1996.

GHARSALLAOURI, A.; ROUDART, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GIBBS, B.F. et al., Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 50, p. 213-224, 1999.

GIESE, J. Packaging, storage, and delivery of ingredients. **Food Technology**, v. 47(8), p. 54-63, 1993.

Goodwin, T.W., Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. **Academic Press, London**, v. 1, 2nd, p. 533-549, 1965.

HASSEMER, M. E. N. Oxidação Fotoquímica - UV/H₂O₂ – Para Degradação de Poluentes em Efluentes da Indústria Têxtil. Tese de Doutorado, **Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC** – Brasil, 2006.

JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation and the food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 24(4), p. 289-297, 1991.

JAIN, R.; SHAH, N.H.; MALICK, A.W.; RHODES, C.T. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 24, p. 703-727, 1998.

JONDIKO, I. J.; PATTENDEN, G. Terpenoids and an apocarotenoid from seeds of *Bixa orellana*. **Phytochemistry**, v. 28(11), p. 3159-3162, 1989.

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

JUNIOR, A. A. S.; Micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada intraocular de fármacos. **Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado de São Paulo. Araraquara, SP** – Brasil, 2005.

LIONZO, M.I.Z., RÉ, M.I., GUTERRES, S. S.; 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**, v. 24, p. 175-186, 2007.

LOBATO, K. B. S. Produção e avaliação da estabilidade de nanocápsulas de bixina em sistemas modelo de fotossensitização e aquecimento. **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS – Brasil, 2013.**

Martins, C, MCTI prepara lançamento do programa Iniciativa Brasileira em Nanotecnologia. **Boletim Eletrônico de Notícias da Sociedade Brasileira de Química de 19 de julho de 2012 - Nº 1034.** [Capturado 03 março de 2013] Disponível em: <http://boletim.s bq.org.br/noticias/n464.php>

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Campinas, v. 23, p. 102-105, 2003.

McKEOWN, G. G., Composition of oil-soluble annatto food colors: Thermal degradation of bixin. **Journal Association of Official Analytical Chemists International**, v. 46, p.791-796, 1963.

MCKEOWN, G. G., Composition of oil-soluble annatto food colors: Structure of the yellow pigment formed by the thermal degradation of bixin. **Journal Association of Official Analytical Chemists International** , v. 48, p. 835-837, 1965.

NAJAR, S. V.; BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Effects to light, air, anti-oxidants and pro-oxidants on annatto extracts (*Bixa orellana*). **Food Chemistry**, v. 29, p. 283-289, 1998.

OLIVEIRA, J. S. Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.). **Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC – Brasil, 2005.**

OLIVEIRA, J. V. Phase behavior and process parameters effects on the characteristics of precipitated theophylline using carbon dioxide as antisolvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 44, p. 8-20, 2008.

PACHEKOSKI, W. M. Desenvolvimento de blendas biodegradáveis constituídas de poli-hidroxibutirato (PHB) e poli(acido láctico) – PLA. **Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP - Brasil, 2005.**

PAUMGARTTEN, F. J. R.; DE CARVALHO, R. R.; ARAUJO, I. B.; PINTO, F. M.; BORGES, O. O.; SOUZA, C. A. M.; KUTIYAMA, S. N. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40(11), p. 1595-1601, 2002.

PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**, v. 18(6), p. 608-615, 1995.

POTHAKAMURY, U.R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Fundamental aspects of controlled release in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 397-406, 1995.

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

PRIAMO, W. L., DE CEZARO, A. M., BENETTI, S. C., OLIVEIRA, J. V., FERREIRA, S. R. S., In vitro release profiles of B-carotene encapsulated in PHBV by means of supercritical carbon dioxide micronization technique. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 137-143, 2011.

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

RANDOLPH, T. W.; RANDOLPH, A. D.; MEBES, M.; YEUNG, S. Sub-micrometer-sized biodegradable particles of poly-(l-lactic acid) via the gas antisolvent spray precipitation process. **Biotechnology Progress**, v. 9(4), p. 429–435, 1993.

REICHARDT, C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. **Chemistry Research**, v. 94, p. 2319-2358, 1994.

REINECCIUS, G. A. Flavor encapsulation. **Food Review International**, v. 5(2), p. 146-176, 1989.

REVERCHON, E.; ADAMI, R.; CAPUTO, G.; DE MARCO, I. Spherical microparticles production by supercritical antisolvent

precipitation: Interpretation of results. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 70–84, 2008.

RIOS, A. Proteção de carotenoides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. **Alimentos e Nutrição**. v. 20(2). p. 343-350, 2009.

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

ROSENBERG, M.; TALMON, Y.; KOPELMAN, I. J. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, p. 1288-1294, 1990.

SATO, G. S.; CHABARIBERY, D.; MAIA, M. L.; DE CARVALHO, F. C.; NEGRINETO, A.; MARQUES, S. A. Tendência de mercado para corantes na indústria de alimentos. *Agricultura em São Paulo*, v. 39, p. 1-50, 1992.

SCHWARTS, S.H., QTIN, X. and ZEEVAART, A.D. Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. **Journal of Biological Chemistry**. v.276, p. 25208–25211, 2003.

SCOTTER, M. J. Characterization of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. **Food Chemistry**. v. 53, p. 117-185, 1995.

SERRANO E.; CORNU A.; KONDOYAN N. et al. Terpene Accumulation in muscle and fatty tissues of calves supplemented with essential oils. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 16, p. 168-179, 2007.

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

SILVA, N. I.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**. v. 17, p. 227-236, 2001.

SILVA, P. I. Métodos de extração e caracterização de bixina e norbixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). **Dissertação de Mestrado**

em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG – Brasil, 2007.

SILVEIRA, V.A.S.; PEREIRA, A.C.; AMADEI, S.U. Aspecto interdisciplinar na pesquisa da biocompatibilidade dos materiais dentários. **Revista de Biociência**. v. 10(4), p. 209-213, 2004.

SOARES, L. V S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxms, achratoxin, zearalenone and stengmatocystm in some Brazilian foods by using multitoxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the association of official analytical chemists**. v. 72(1), p. 22-26. 1989.

SUAVE, J., DALL'AGNOL, E. C., PEZZIN, A. P. T., SILVA, D. A. K., MEIER, M. M. e SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes areas. **Health and environment Journal**, v. 7(2), p. 12-20, 2006.

SUBRA, P.; LAUDANI, C.; VEGA-GONZÁLEZ, A.; REVERCHON, E.. Precipitation and phase behavior of theophylline in solvent–supercritical CO₂ mixtures. **Journal supercritical fluids**. v. 35(2), p. 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.

THRESIAMMA, K.C., GEORGE, J., KUTTAN, R. Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. **Journal of Experimental Clinic Cancer RES**, v. 17(4), p. 431-434, 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**, v. 27, p. 787–792, 2007.

VIEGAS, C. J.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**. v. 29(2), p. 326-337, 2006.

VILLELA, G. G. **Pigmentos animais**: Zoocromos. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1976.

WHORTON, C. Factors influencing volatile release from encapsulation matrices. *In Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*; Risch, S. J., Reineccius, G. A., Eds.; American Chemical Society; Washintong, DC, p. 134-144. 1995.

YEO, S. D.; LIM, G. B.; DEBENEDETTI, P. G.; BERNSTEIN, H. Formation of microparticulate protein powders using a supercritical fluid antisolvent, **Biotechnology & Bioengineering**, v. 41(3), p. 341–346, 1993.

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

ZINUTTI, C.; KEDZIEEWICZ, F.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Preparation and characterisation of ethylcellulose microspheres containing 5-fluorouracil. **Journal Microencapsultion**, v. 11(5), p. 555–563, 1994.

APÊNDICE A

A – Espectros de varredura da bixina pura em diferentes solventes.

As figuras a seguir, ilustram os espectros de varredura de UV-Visível da bixina, em diferentes solventes utilizados durante os processos de quantificação e da liberação *in vitro*.

Figura A1 – Espectro de varredura de bixina em diclorometano.

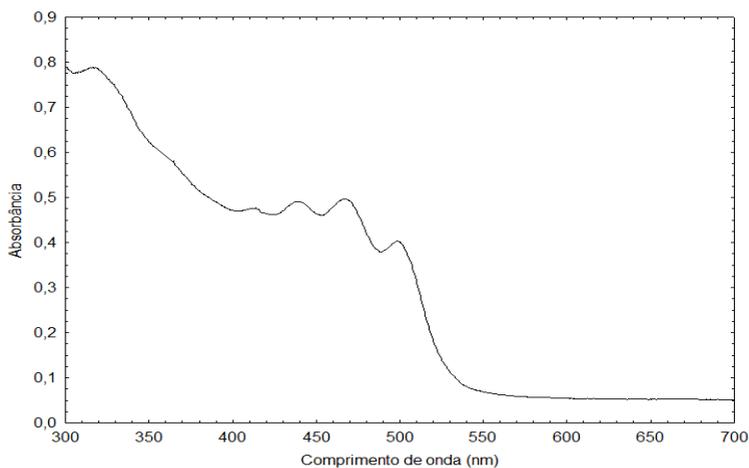


Figura A2 – Espectro de varredura de bixina em acetona.

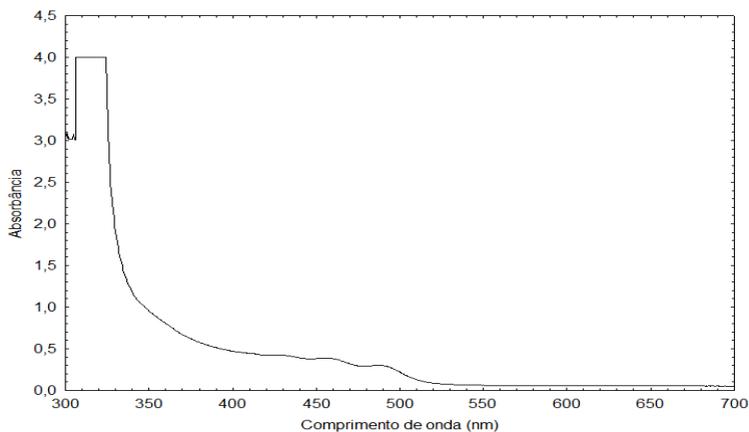


Figura A3 – Espectro de varredura de bixina em acetato de etila.

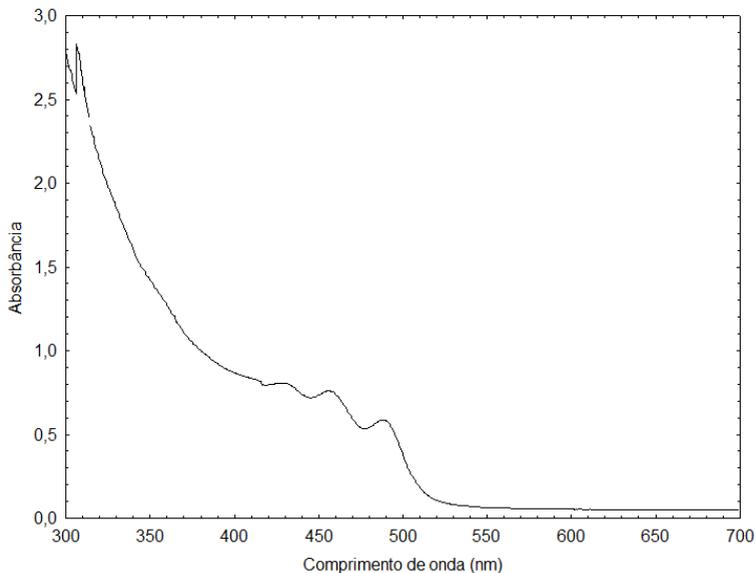
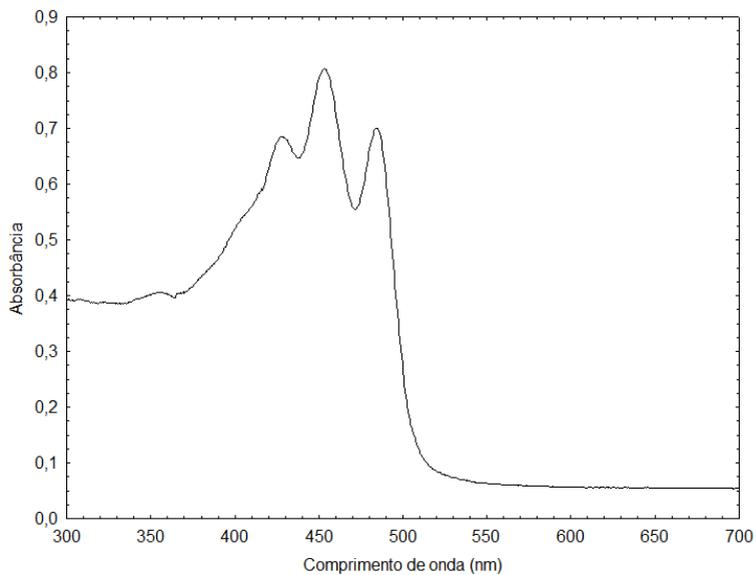
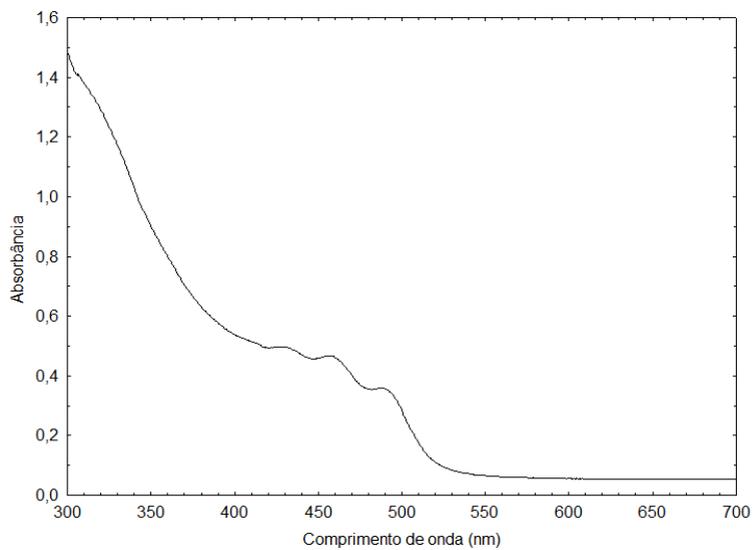
Figura A4 – Espectro de varredura de α -bixina em éter etílico.

Figura A5 – Espectro de varredura de bixina em etanol.



APÊNDICE B

Este apêndice contém os valores das concentrações e absorvâncias médias utilizado na construção das curvas padrões de bixina em diclorometano.

Tabela B1 – Valores de concentração de bixina pura em diclorometano e absorvância média (obtida por triplicatas de medida) em espectro de UV-VIS a 520 nm.

Concentração de bixina (mg.mL ⁻¹)	Absorvância média (UA)	Desvio padrão (UA)
0,05	0,05	0,001
0,10	0,09	0,001
0,20	0,19	0,001
0,30	0,28	0,000
0,40	0,38	0,002
0,50	0,50	0,000
0,60	0,60	0,001
0,70	0,70	0,005
0,80	0,79	0,003
0,90	0,93	0,001
1,00	1,03	0,001

Figura B1 – Curva padrão de absorvância de bixina pura em 520 nm em função da sua concentração em diclorometano.

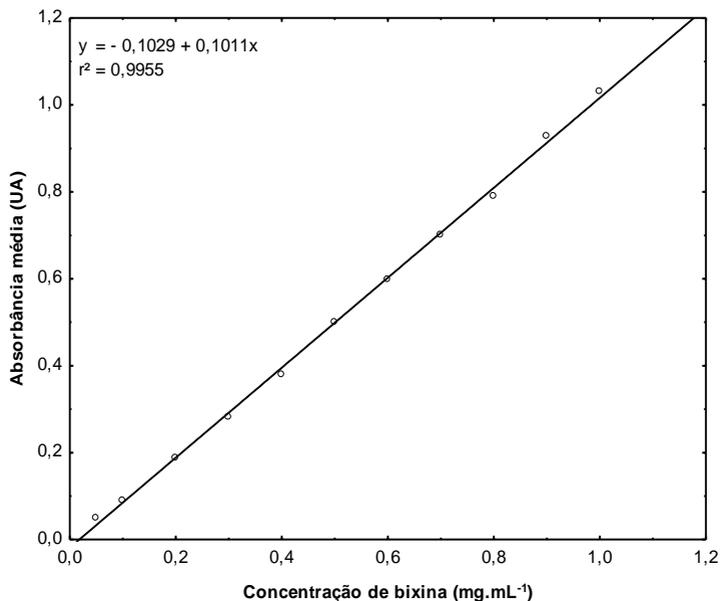
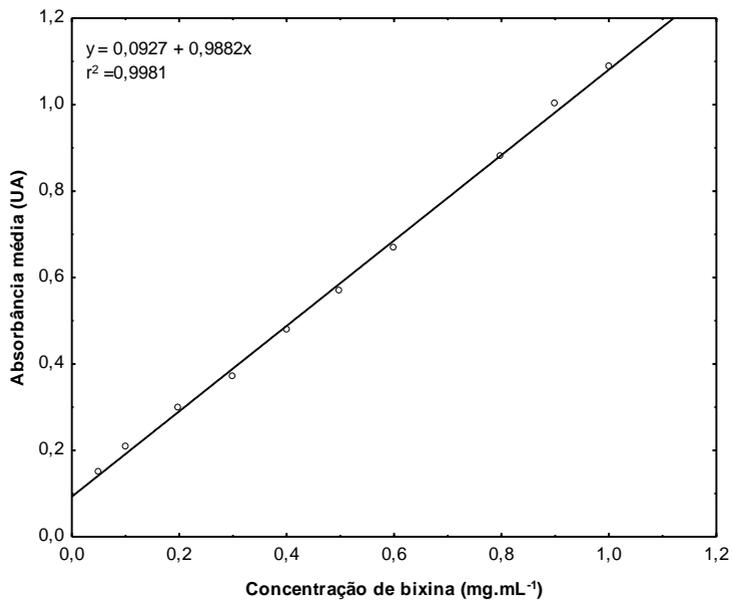


Tabela B2 – Valores de concentração de bixina e 0,1 mg.mL⁻¹ de PHBV em diclorometano e absorvância média (obtida por triplicatas de medida) em espectro de UV-VIS a 520 nm, utilizados para a construção da curva de calibração.

Concentração de bixina + PHBV (mg.mL ⁻¹)	Absorvância média (UA)	Desvio padrão (UA)
0,05	0,15	0,004
0,10	0,21	0,002
0,20	0,30	0,003
0,30	0,37	0,002
0,40	0,48	0,002
0,50	0,57	0,001
0,60	0,67	0,002
0,80	0,88	0,001
0,90	1,00	0,004
1,00	1,09	0,003

Figura B2 – Curva padrão de absorvância de bixina e PHBV em 520 nm em função da sua concentração em diclorometano.



APÊNDICE C

C.1 – Micrografias de FEGs das partículas

Este apêndice tem por objetivo apresentar as micrografias de FEGs das partículas coprecipitadas através da técnica SEDS empregando CO₂ pressurizado em diferentes condições experimentais conforme já descrito no capítulo 4 os resultados na Tabela 4.1.

Figura C1 – FEGs dos experimentos BB1(A), B2(B), B(C), B4(D), B5(E) e B6(F).

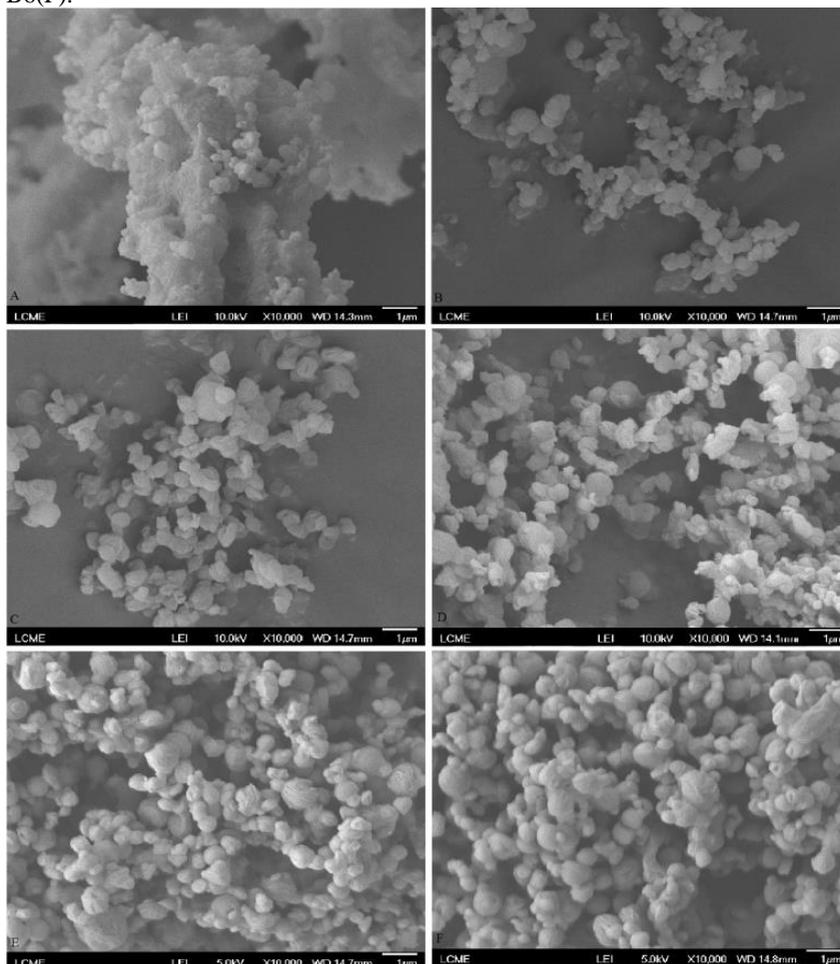


Figura C2 – FEGs dos experimentos B7(G), B8(H), B9(I), B10(J), B11(K) e B12(L).

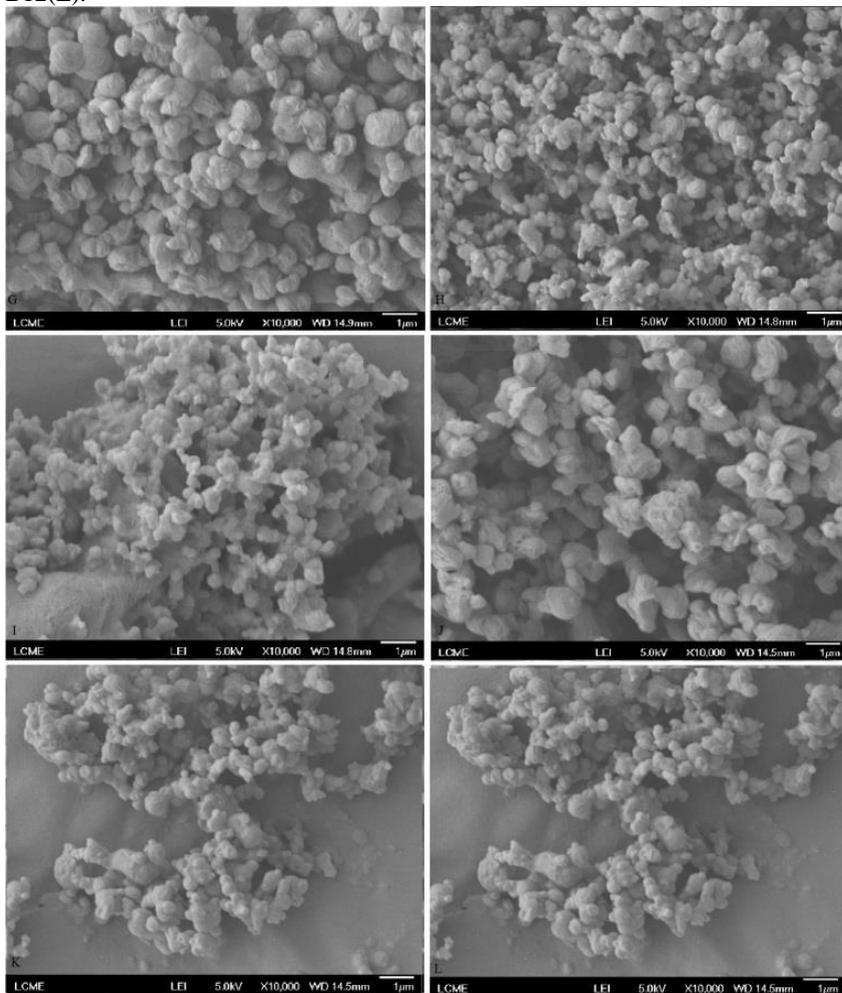
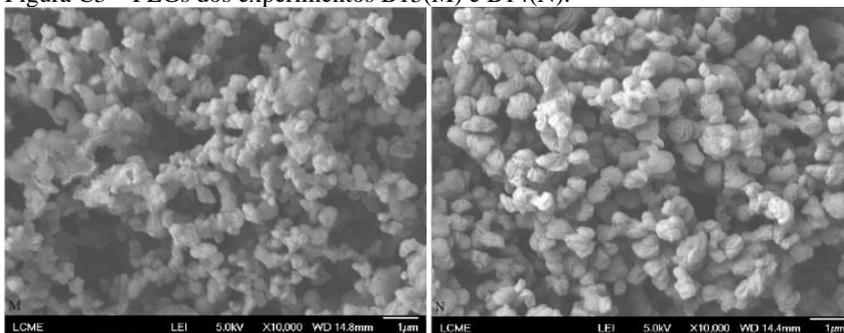


Figura C3 – FEGs dos experimentos B13(M) e B14(N).



APÊNDICE D

O apêndice tem como função demonstrar os valores de concentração e absorvância média das curvas padrões realizada para cada solvente, além das cinéticas de liberações.

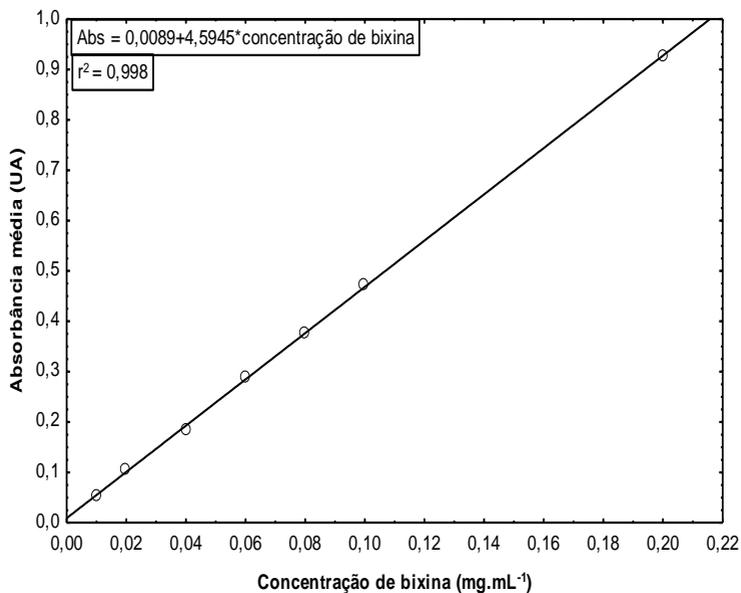
D – Comportamentos de Liberação *in vitro* das Partículas de bixina Encapsuladas em PHBV

A Tabela D1 e a Figura D1 apresentam os valores das concentrações de bixina utilizadas para a construção da curva de calibração bem como suas respectivas absorvâncias médias (obtida por triplicata de medida) em acetona. Já na Tabela D2, são apresentados os valores de absorvância média, concentrações liberadas em intervalos de tempo determinados e seus respectivos percentuais de bixina liberados com relação a massa inicial de bixina encapsulada.

Tabela D1 – Valores de concentração de bixina o em acetona absorvância média (obtida por triplicata de medida) em espectro de UV-VIS a 458,0 nm utilizados para a construção da curva de calibração.

Concentração de Bixina (mg.mL ⁻¹)	Absorvância média (UA)	Desvio padrão (UA)
0,01	0,052	0,001
0,02	0,104	0,001
0,04	0,185	0,001
0,06	0,288	0,002
0,08	0,378	0,003
0,1	0,473	0,006
0,2	0,925	0,001

Figura D1 – Curva de calibração de bixina em Acetona.

Tabela D2 – Ensaio B15 de liberação *in vitro* das partículas de α -bixina encapsuladas em PHBV e submetidas à dissolução em acetona na temperatura de 28 °C e 120 rpm.

Exp	Tempo (min)	Abs média (UA)	Concentração liberada (mg. mL ⁻¹)	Concentração máxima (mg.mL ⁻¹)	Liberação (%)
B14	0	0,108	0,020	0,033	61,00
	1	0,113	0,021		63,87
	3	0,123	0,023		70,00
	5	0,116	0,022		65,77
	8	0,142	0,027		81,56
	10	0,149	0,028		85,64
	15	0,152	0,029		87,68
	20	0,155	0,030		89,72
	30	0,158	0,030		91,08
	40	0,155	0,030		89,72
	50	0,160	0,031		92,44
	60	0,155	0,030		89,72
	70	0,158	0,030		91,08

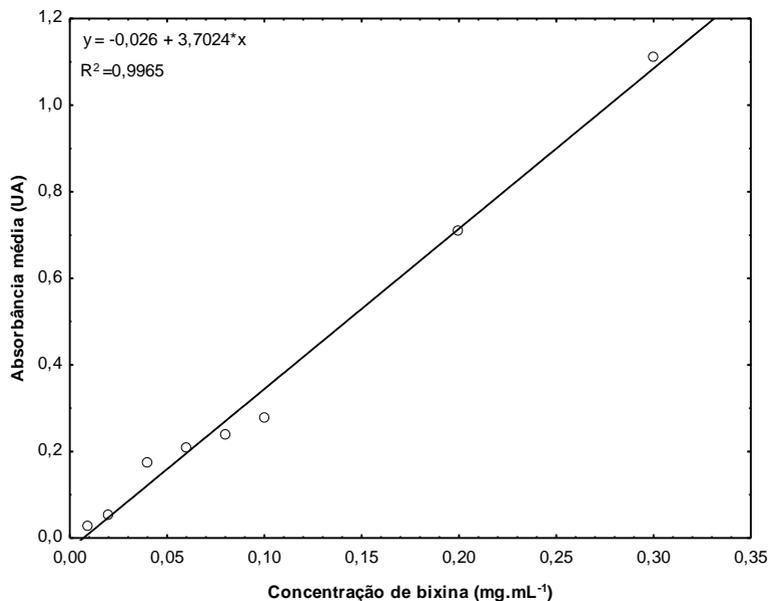
80	0,153	0,030	88,36
90	0,159	0,030	91,76
100	0,158	0,030	91,08
110	0,155	0,030	89,72

A Tabela D3 e a Figura D2 apresentam os valores das concentrações de bixina utilizadas para a construção da curva de calibração bem como suas respectivas absorbâncias médias (obtida por triplicata de medida) em éter etílico. Já na Tabela D4, são apresentados os valores de absorbância média, concentrações liberadas em intervalos de tempo determinados e seus respectivos percentuais de bixina liberados com relação a massa inicial de bixina encapsulada.

Tabela D3 - Valores de concentração de bixina o em éter etílico absorbância média (obtida por triplicata de medida) em espectro de UV-VIS a 483,0 nm utilizados para a construção da curva de calibração.

Concentração de Bixina (mg.mL ⁻¹)	Absorbância média (UA)	Desvio padrão (UA)
0,01	0,026	0,005
0,02	0,052	0,001
0,04	0,173	0,001
0,06	0,208	0,000
0,08	0,236	0,001
0,10	0,278	0,002
0,20	0,707	0,001
0,30	1,111	0,005

Figura D2 – Curva de calibração de bixina em éter etílico.

Tabela D4 – Ensaio B13 de liberação *in vitro* das partículas de α -bixina encapsuladas em PHBV e submetidas à dissolução em éter etílico a temperatura de 28 °C e 120 rpm

Exp	Tempo (min)	Abs média (UA)	Concentração liberada (mg.mL ⁻¹)	Concentração máxima (mg. mL ⁻¹)	Liberação [%]
B13	120	0,006	0,009		33,47
	180	0,008	0,010		35,48
	240	0,011	0,011		38,49
	300	0,028	0,016		57,59
	360	0,040	0,020	0,028	71,66
	420	0,054	0,024		86,73
	480	0,060	0,027		93,77
	540	0,062	0,027		95,78

A Tabela D5 e a Figura D3 apresentam os valores das concentrações de bixina utilizadas para a construção da curva de calibração bem como suas respectivas absorbâncias médias (obtida por triplicata de medida) em acetato de etila. Já na Tabela C6, são apresentados os valores de absorbância média, concentrações liberadas

em intervalos de tempo determinados e seus respectivos percentuais de bixina liberados com relação a massa inicial de bixina encapsulada.

Tabela D5 - Valores de concentração de bixina o em acetato de etila absorvância média (obtida por triplicata de medida) em espectro de UV-VIS a 453,5 nm utilizados para a construção da curva de calibração.

Concentração de Bixina (mg.mL ⁻¹)	Absorvância média (UA)	Desvio padrão (UA)
0,01	0,024	0,001
0,02	0,060	0,001
0,04	0,123	0,001
0,06	0,190	0,001
0,08	0,219	0,003
0,10	0,326	0,003
0,20	0,656	0,004
0,30	0,979	0,003
0,50	1,541	0,001

Figura D2 – Curva de calibração de bixina em acetato de etila..

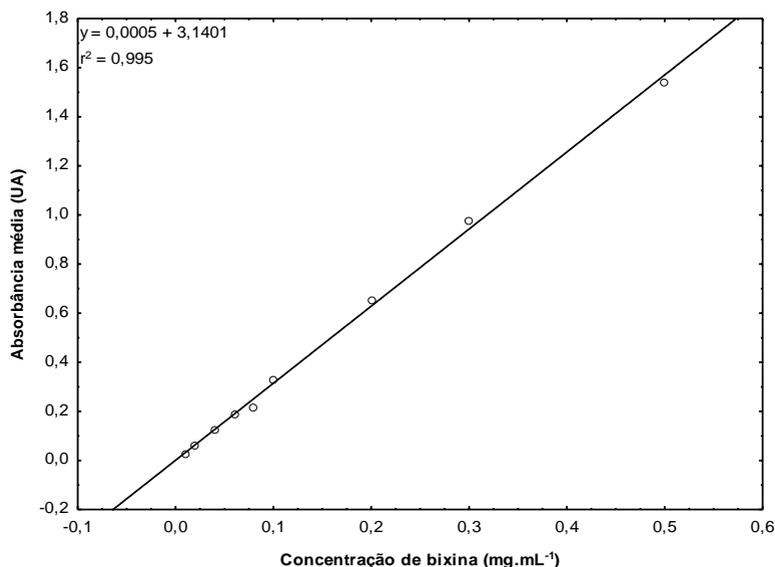


Tabela D6 – Ensaio B14 de liberação *in vitro* das partículas de α -bixina encapsuladas em PHBV e submetidas à dissolução em acetato de etila a temperatura de 28 °C e 120 rpm.

Exp	Tempo (min)	Abs média (UA)	Concentração liberada ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Concentração máxima ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Liberação (%)
B13	0	0,199	0,064	0,138	45,84
	5	0,255	0,081		58,76
	15	0,282	0,090		64,98
	30	0,317	0,101		73,06
	45	0,342	0,101		78,83
	60	0,361	0,115		83,21
	75	0,383	0,122		88,28
	90	0,395	0,126		91,05
	105	0,405	0,129		93,36
	120	0,407	0,130		93,82
	135	0,402	0,128		92,67
	150	0,409	0,130		94,28
	180	0,406	0,130		93,59
	210	0,394	0,126		90,82
	240	0,407	0,130		93,82
270	0,406	0,130	93,59		

A Tabela D7 e a Figura D4 apresentam os valores das concentrações de bixina utilizadas para a construção da curva de calibração bem como suas respectivas absorbâncias médias (obtida por triplicata de medida) em acetona. Já na Tabela D8, são apresentados os valores de absorbância média, concentrações liberadas em intervalos de tempo determinados e seus respectivos percentuais de bixina liberados com relação a massa inicial de bixina encapsulada.

Tabela D3 - Valores de concentração de bixina o em etanol absorvância média (obtida por triplicata de medida) em espectro de UV-VIS a 455,5 nm utilizados para a construção da curva de calibração.

Concentração de Bixina (mg.mL ⁻¹)	Absorbância média (UA)	Desvio padrão (UA)
0,01	0,048	0,000
0,02	0,090	0,001
0,04	0,183	0,003
0,06	0,265	0,002
0,08	0,356	0,001
0,10	0,480	0,002
0,20	0,856	0,002
0,30	1,251	0,005
0,50	1,883	0,005

Figura D4 – Curva de calibração de bixina em etanol.

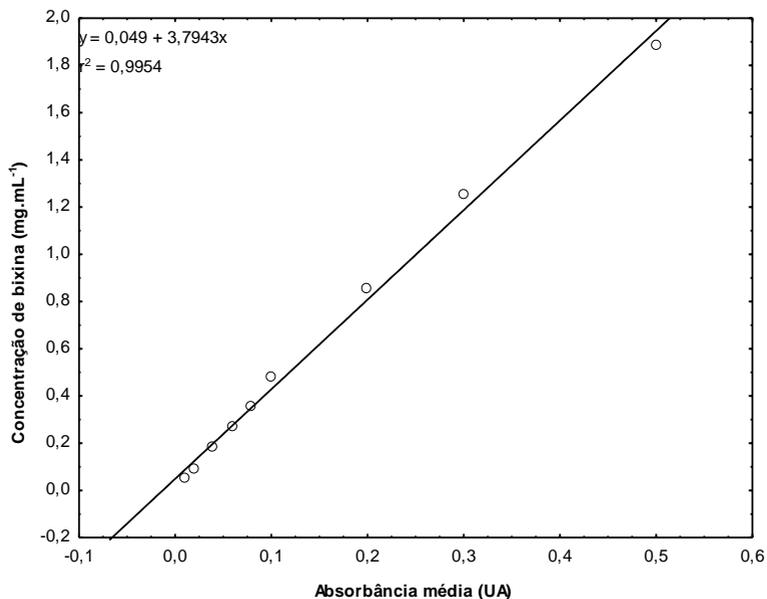


Tabela D8 – Ensaio E14 de liberação *in vitro* das partículas de bixina encapsuladas em PHBV e submetidas à dissolução em etanol a temperatura de 28 °C e 120 rpm.

Exp	Tempo (min)	Abs média (UA)	Concentração liberada (mg.mL ⁻¹)	Concentração máxima (mg.mL ⁻¹)	Liberação (%)
B15	300	0,276	0,059865	0,194	30,86
	360	0,290	0,063644		32,81
	420	0,325	0,072754		37,50
	480	0,400	0,09253		47,70
	510	0,547	0,131252		67,66
	540	0,650	0,158393		81,65
	570	0,700	0,171568		88,44
	600	0,744	0,183108		94,39
	630	0,750	0,184743		95,23