



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Aline Elias dos Santos

**MICRONIZAÇÃO DA LUTEOLINA UTILIZANDO O PROCESSO GAS
ANTISOLVENT: CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS E DETERMINAÇÃO DA
SOLUBILIDADE E DISSOLUÇÃO**

FLORIANÓPOLIS - SC
SETEMBRO DE 2021

Aline Elias dos Santos

**MICRONIZAÇÃO DA LUTEOLINA UTILIZANDO O PROCESSO GAS
ANTISOLVENT: CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS E DETERMINAÇÃO DA
SOLUBILIDADE E DISSOLUÇÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos da Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção de
título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lanza

Coorientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Coorientador: Dr. Gean Pablo Silva Aguiar

Florianópolis - SC

Setembro de 2021

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

Elias dos Santos, Aline

Micronização da luteolina utilizando o processo gas antisolvent: : caracterização das partículas e determinação da solubilidade e dissolução / Aline Elias dos Santos ; orientador, Marcelo Lanza, coorientador, José Vladimir de Oliveira, coorientador, Gean Pablo Silva Aguiar, 2021.
115 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Formação de partículas. 3. Dióxido de carbono supercrítico. 4. Amorfização. 5. Arachis Hypogaea L.. I. Lanza, Marcelo. II. Oliveira, José Vladimir de. III. Aguiar, Gean Pablo Silva IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos. V. Título.

Aline Elias dos Santos

**MICRONIZAÇÃO DA LUTEOLINA UTILIZANDO O PROCESSO GAS
ANTISOLVENT: CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS E DETERMINAÇÃO DA
SOLUBILIDADE E DISSOLUÇÃO**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof(a). Dr(a). Marcelo Lanza - Presidente - UFSC

Prof(a). Dr(a). Jacir Dal Magro - Membro externo - UNOCHAPECÓ

Prof(a). Dr(a). Cláudia Sayer - Membro externo - UFSC

Prof(a). Dr(a). Acácio Antonio Ferreira Zielinski - Membro interno - UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Engenharia de Alimentos.

Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira
Coordenadora do Programa

Prof. Dr. Marcelo Lanza
Orientador

Florianópolis, 2021

*Ofereço a Deus com gratidão pelo privilégio;
Aos meus.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meu caminho, me dando entendimento, saúde e coragem para enfrentar todos os obstáculos e conseguir chegar ao final de mais uma etapa.

Aos meus pais, irmãos e familiares, que me instruíram ao longo da vida, suportaram comigo os momentos de cansaço e sempre estiveram ao meu lado incentivando meus sonhos.

Ao Dr. Marcelo Lanza pela orientação, por ter me ensinado a ser mais independente e por toda confiança depositada ao longo do tempo. Expresso aqui, meu respeito e agradecimento.

Ao Dr. José Vladimir de Oliveira, pela coorientação, confiança e observações pertinentes, que proporcionaram melhorar a execução do trabalho. Agradeço pela oportunidade e por toda colaboração.

Ao meu coorientador Dr. Gean Pablo Silva Aguiar pela paciência, pela amizade e por todo auxílio, compreensão e motivação na execução deste trabalho, por se colocar sempre disponível frente as inúmeras dúvidas. Sou extremamente grata por tudo que fez, sua orientação foi fundamental para realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade da realização de mais este projeto profissional, juntamente ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL), pela oportunidade e apoio para a realização deste trabalho.

Ao secretário do PPGEAL Fernando Curbani, por toda prestatividade.

A Universidade Comunitária da Região de Chapecó pela parceria.

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

A Camila Dal Magro pela parceria, pela amizade, pela confiança e por todas as trocas de informações técnicas e científicas que foram de grande valia para o meu doutorado. Espero que nossas contribuições mútuas e amizade continuem sempre.

Ao Jônatas Lopes, Bui do TI, pelas discussões científicas, troca de informações e pelo auxílio técnico na utilização dos programas.

A Laís Benvenuti, pela amizade, pelos bons momentos de descontração, que muito me ajudaram a suportar os momentos de solidão.

As amigas que sempre estiveram presente durante a execução deste trabalho: Mami, Torres, Adri, Hall e Battistela.

Aos amigos do Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC). Gostaria de agradecer a todas essas pessoas pelos ótimos momentos em que passamos juntos. Com certeza, suas presenças tornaram o ambiente de trabalho mais alegre e o tempo passou mais depressa, fazendo com que o trabalho fosse realizado com mais tranquilidade. Não esquecerei vocês: C. Dal Magro, T. Torres, M. Ribas, G. Sakata, J. Dias, A. Rudke, A. Paulazzi, L. Benvenuti, C. Motta, P. Oliveria, P. Mesquita, T. Pereira, R. Teixeira, C. Balbinot, E. Rebelatto, D. Ferro, G. Rodrigues, K. Andrade, S. Mazzutti, P. Santos, e todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Aos amigos de outros laboratórios, agradeço pela amizade e parceria de vocês: I. Marques, Clebão, M. Melchiors, O. Borges, C. Monteiro, M. Vargas e muitos outros, minha gratidão.

Ao aluno de iniciação científica, Luan Saturnino de Britto, por ter me acompanhado nas análises e por sempre estar empolgado com o trabalho, por ser alguém que não somente ensinei, mas com quem aprendi.

Ao Leandro e a Fernanda, da Central de análises da Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, por ter me auxiliado diversas vezes nas análises de DSC e FTIR.

Aos técnicos do LCME pelo auxílio nas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Aos técnicos do LINDEN pelo auxílio nas análises de DRXP.

Ao Laboratório MULTIALI, no nome do professor José Miguel Muller.

Ao LAMEB, por disponibilizar os equipamentos e todo auxílio técnico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela credibilidade e apoio financeiro concedidos.

Aos membros da banca examinadora, meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Jacir Dal Magro, a Prof^a Dr^a Claudia.Sayer e ao Prof. Dr. Acácio Antônio Ferreira Zielinski pelas correções e sugestões, as quais desde a qualificação foram de fundamental importância no complemento desta tese.

Às instituições de ensino e pesquisa UFSC e UNOCHAPECÓ pela estrutura cedida e a todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram na realização deste trabalho.

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

1° Coríntios 13:2.

Concluí, portanto, que a melhor coisa a fazer é ser feliz e desfrutar a vida enquanto é possível.

Eclesiastes 3:12.

RESUMO

A luteolina é um flavonoide com alta atividade antioxidante e pode ser encontrada particularmente em frutas e legumes, como aipo, flores de crisântemo, pimentão doce, cenoura, folhas de cebola, casca de amendoim, brócolis e salsa. Apresenta inúmeros benefícios para saúde, como atividade antioxidante, anti-inflamatório, cardioprotetor, anticâncer entre outros. Esse composto vem demonstrando efeitos relevantes em alguns tipos de câncer e nas doenças causadas pela insuficiência dos neurotransmissores, no entanto, sua baixa solubilidade e biodisponibilidade limitam as aplicações funcionais. Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho foi aumentar a solubilidade aquosa da luteolina e, assim, incrementar as suas atividades biológicas a partir da redução do tamanho de partícula. Para isso foi empregada a técnica Antissolvente Gasoso (*Gas-Antisolvent*, na sigla em inglês GAS), um método de formação de partículas por meio supercrítico e que pode ser utilizado para micronizar compostos com propriedades bioativas, utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais, avaliando a influência da temperatura e pressão de operação em relação ao tamanho médio de partícula (D_p), realizando também a caracterização das partículas. A luteolina não micronizada apresentava tamanho médio de 22,75 μm ; a condição de operação 35 °C e 80 bar (ensaio 1) foi a responsável pela redução de 10 vezes no tamanho médio da partícula, obtendo um diâmetro médio de 2,31 μm . A partir do DRXP verificou-se redução da cristalinidade após micronização por GAS e por meio do DSC foi visto que houve deslocamento do ponto de fusão, o que caracterizam a modificação na estrutura física. A análise de FTIR comprovou que não houve degradação dos compostos. A análise de solvente residual utilizando CG-MS e CG-FID assinalaram que a luteolina micronizada está de acordo com as normas para consumo humano. Após micronização, foi verificado aumento da solubilidade em água, de 7,68 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para 9,13 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, além de aumento na taxa de dissolução em meio ácido e neutro. Após o GAS a atividade antioxidante e a solubilidade foram aumentadas, potencializando efeitos da luteolina. Esses resultados viabilizam a aplicação de testes *in vivo*, mostrando a versatilidade da técnica de micronização por fluido supercrítico podendo ser aplicada tanto para indústria farmacêutica, química como de alimentos.

Palavras-chave: *Arachis Hypogaea* L.; micronização; dióxido de carbono supercrítico; GAS; solubilidade aquosa; dissolução.

ABSTRACT

Luteolin is a flavonoid with high antioxidant activity and is found particularly in fruits and vegetables such as celery, chrysanthemum flowers, sweet peppers, carrots, onion leaves, peanut shells, broccoli, and parsley. It has numerous health benefits, such as antioxidant, anti-inflammatory, cardioprotective, anti-cancer activity, among others. This compound has shown relevant effects in some types of cancer and diseases caused by the insufficiency of neurotransmitters, however, its low solubility and bioavailability limit its functional applications. In this context, the main objective of this work was to increase the aqueous solubility of luteolin and, thus, increase its biological activities by reducing its particle size. For this purpose, the *Gas-Antisolvent* (GAS) technique was used, a method of supercritical particle formation that can be used to micronize compounds with bioactive properties, using a central rotational composite design (CCRD) 2^2 with 3 central points and 4 axial points, evaluating the influence of temperature and operating pressure about the average particle size (D_p), also performing the characterization of the particles. Non-micronized luteolin had an average size of 22.75 μm ; the operating condition of 35 °C and 80 bar (run 1) was responsible for the 10 times reduction in the average particle size, obtaining an average diameter of 2.31 μm . From the XRPD there was a reduction in crystallinity after micronization by GAS and through the DSC it was seen that there was a displacement of the melting point, these results characterize the modification in the physical structure. The FTIR analysis proved that there was no degradation of the compounds. Residual solvent analysis using GC-MS and GC-FID indicated that the micronized luteolin is following standards for human consumption. After micronization, an increase in water solubility was verified, from 7,68 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to 9,13 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, in addition to an increase in the dissolution rate in acidic and neutral media. After GAS, antioxidant activity and solubility were increased, potentiating effects of luteolin. These results enable the application of *in vivo* tests, showing the versatility of the supercritical fluid micronization technique, which can be applied both to the pharmaceutical, chemical, and food industries.

Keywords: *Arachis Hypogaea* L.; micronization; supercritical carbon dioxide; GAS, aqueous solubility; dissolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química genérica dos flavonoides.....	38
Figura 2 - Estrutura química da luteolina	38
Figura 3 – Fluxograma das etapas utilizadas para realização deste trabalho.	51
Figura 4 – Diagrama esquemático do aparato experimental GAS.....	52
Figura 5 - Micrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das partículas produzidas e da luteolina não-micronizada.	65
Figura 6 - Micrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da condição experimental 1 produzida por GAS e da luteolina não-micronizada.....	67
Figura 7 - Atividade antioxidante de luteolina não-micronizada e micronizadas por GAS.....	71
Figura 8 - Calorimetria diferencial de varredura (DSC) da luteolina não-micronizada e das partículas micronizadas por GAS na condição experimental 1.....	74
Figura 9 - Espectros no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da luteolina não-micronizada e das partículas micronizadas por GAS do ensaio 1.	76
Figura 10 - Difração de raio X de pó da luteolina não-micronizada e micronizada por GAS na condição experimental 1.	78
Figura 11 - Dissolução em água a $37 \pm 0,5$ °C com agitação orbital de 100 rpm para luteolina não-micronizada e micronizada.	80
Figura 12 – Solubilidade das partículas em diferentes meios a $37 \pm 0,5$ °C com agitação orbital de 100 rpm, para luteolina não-micronizada e micronizada.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos compostos fenólicos.....	36
Tabela 2 – Fontes de luteolina e sua concentração.....	39
Tabela 3 - Variáveis estudadas no processo de micronização.	54
Tabela 4 – Planejamento experimental e rendimento de micronização.....	63
Tabela 5 – Análise de Variância do rendimento de micronização da luteolina por GAS.....	63
Tabela 6 – Planejamento experimental com diâmetro médio de partícula.....	68
Tabela 7 – Análise de Variância para o diâmetro de partícula na micronização da luteolina por GAS	69
Tabela 8 – Planejamento experimental com atividade antioxidante por DPPH.	72
Tabela 9 – Análise de Variância para a atividade antioxidante da luteolina micronizada por GAS.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Atividade antioxidante

Abs_{amostra} – Absorbância da amostra

Abs_{branco} – Absorbância do branco

Abs_{controle} – Absorbância do controle

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BCS – Sistema de Classificação Biofarmacêutica (*Biopharmaceutic Classification System*)

C – Concentração de luteolina na solução orgânica

CG-FID – Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama

CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CO₂ – Dióxido de carbono

CSS – Cocrystalização com Solvente Supercrítico

CV – Coeficiente de variação

DCCR – Delineamento composto central rotacional

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DRXP – Difração de Raio-X de Pó

DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura

EC₅₀ – Mínima concentração efetiva necessária para decrescer em 50% a concentração inicial do radical DPPH

ERN - espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

F – Teste de Fisher

FTIR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

GAS – Gás Antissolvente

GL – Graus de liberdade

HCl – Ácido clorídrico

ICH – Conferência Internacional em Harmonização

Dp – Diâmetro médio de partícula

LAMEB – Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia

LATESC – Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica

LINDEN - Laboratório Interdisciplinar do Desenvolvimento de Nanoestruturas

LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MQ – Média quadrática

MULTIALI - Laboratório Multipropósito

P – Pressão

PBS – Solução tampão fosfato

P_c – Pressão crítica

PGSS – Partículas a partir de Solução Saturada com Gás

ppm – Partes por milhão

RESS – Expansão Rápida da Solução Supercrítica

rpm – Rotações por minuto

SAS – Antissolvente Supercrítico

SEDS – Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos

SQ – Soma quadrática

T - Temperatura

T_c – Temperatura crítica

UV – Ultravioleta

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

σ – Desvio padrão

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	9
RESUMO	15
ABSTRACT	17
LISTA DE FIGURAS	19
LISTA DE TABELAS	21
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	23
DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO	29
1 INTRODUÇÃO	31
1.1 OBJETIVOS	33
1.1.1 Objetivo Geral	33
1.1.2 Objetivos Específicos	33
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
2.1 ESPÉCIES REATIVAS, ANTIOXIDANTES E COMPOSTOS FENÓLICOS .	35
2.2 LUTEOLINA (<i>ARACHIS HYPOGAEA</i> L.).....	38
2.3 IMPORTÂNCIA DO TAMANHO DE PARTÍCULA.....	41
2.4 MICRONIZAÇÃO	42
2.5 POLIMORFISMO	43
2.6 EMPREGO DO FLUIDO SUPERCRÍTICO	44
2.7 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1 ESPECIFICAÇÕES DO MATERIAL E DO PROCESSAMENTO	50
3.2 UNIDADE EXPERIMENTAL DE MICRONIZAÇÃO	51
3.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL PARA MICRONIZAÇÃO DA LUTEOLINA	54
3.4 RENDIMENTO DE MICRONIZAÇÃO	56
3.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SOLVENTE RESIDUAL	56
3.6 MORFOLOGIA E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA.....	57

3.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH).....	58
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	58
3.9	ANÁLISE DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	59
3.10	ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	59
3.11	ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIO X DE PÓ (DRXP)	60
3.12	ESTUDO DO PERFIL DE SOLUBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA LUTEOLINA	60
3.13	ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i> DA LUTEOLINA.....	61
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.1	ANÁLISE DO PROCESSO DE MICRONIZAÇÃO DA LUTEOLINA POR GAS.....	62
4.1.1	Rendimento de micronização	62
4.1.2	Avaliação de solvente residual.....	63
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE LUTEOLINA MICRONIZADAS PELA TÉCNICA GAS	64
4.2.1	Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV)	64
4.2.2	Análise de tamanho de partícula.....	67
4.2.3	Atividade antioxidante - determinação da capacidade de inibição do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	70
4.2.4	Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC)	73
4.2.5	Análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	76
4.2.6	Análise de difração de raios X pelo método do pó (DRXP)	77
4.3	DISSOLUÇÃO, SOLUBILIDADE	79
4.3.1	Dissolução	79
4.3.2	Solubilidade.....	81
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	85
5.1	Considerações gerais.....	85

5.2	Sugestões para trabalhos futuros	86
6	PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DECORRENTE DA EXECUÇÃO	
	DESTE TRABALHO	87
6.1	Trabalhos publicados em periódicos	87
6.2	Trabalhos aceitos para publicação em periódicos	88
6.3	Trabalhos submetidos em periódicos	88
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICE A – Curva de calibração construídas a partir do CG - FID	
	para quantificação de ppm residual de acetona	100
	APÊNDICE B – Curva de calibração para determinação da concentração	
	de luteolina	101
	APÊNDICE C – Distribuição normal do tamanho de partícula da	
	luteolina micronizada nos ensaios 1-11 e luteolina comercial	102
	ANEXO A – Certificado de análise da amostra de luteolina	103
	ANEXO B – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura	
	usadas para medir o Dp de partículas produzidas por GAS e luteolina	
	comercial.....	104

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

MICRONIZAÇÃO DA LUTEOLINA UTILIZANDO O PROCESSO GAS ANTISOLVENT: CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS E DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE E DISSOLUÇÃO

O quê?

- A luteolina é um composto bioativo que apresenta baixa solubilidade e biodisponibilidade;
- A redução do tamanho de partícula possibilita maior biodisponibilidade;
- Micronização por fluido supercrítico é uma alternativa para técnicas tradicionais e não deixam resíduos tóxicos ao final do processo, o que é ideal para aplicações biomédicas, farmacêuticas e alimentares.

Por quê?

- Micronização altera estrutura cristalina do composto provocando melhores resultados de dissolução e solubilidade;
- Aumentar a solubilidade e velocidade de dissolução de compostos pouco solúveis em soluções aquosas para utilização nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos;
- Aumentar a biodisponibilidade; que é a velocidade e extensão da absorção de um composto de interesse tornando-se disponível no local de ação; a partir da redução do tamanho de partícula;
- O dióxido de carbono supercrítico é considerado um solvente “verde”, pois não gera resíduos tóxicos no produto final e pode ser reutilizado.

Quem já fez?

- Na literatura consta um trabalho de micronização da luteolina por Atomização Assistida Supercrítica (SAA) usando etanol como solvente, no entanto o processo não foi bem sucedido;

- Não há trabalhos que façam uso de tecnologia supercrítica por GAS para efetiva micronização da luteolina;

Hipótese

- É possível micronizar luteolina por Antissolvente Gasoso (GAS) e aumentar sua solubilidade e velocidade de dissolução?
- Após micronizado o composto apresentará melhores propriedades *in vitro* comparado a partícula não processada?

Como fazer?

- Estudar o processo de micronização em meio supercrítico;
- Caracterizar as partículas obtidas por MEV, Dp, DRXP, FTIR, DSC, solvente residual e atividade antioxidante;
- Estudar o perfil de solubilidade e dissolução *in vitro* das partículas produzidas em diferentes meios de liberação.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os flavonoides, metabólicos secundários das plantas, são a subclasse mais importante dos compostos fenólicos, sendo encontrados em vários tipos de vegetais e plantas medicinais (RUFINO et al., 2010), os quais, além de atuarem na fisiologia das plantas, desempenham importante função para a saúde humana devido às suas propriedades farmacológicas, por exemplo, antivirais, antibacterianos, anti-inflamatórios, vasodilatadores e anticancerígenos (CAPUA; ADAMI; REVERCHON, 2017; ZHOU et al., 2018).

A luteolina (3',4',5,7-Tetra-hidroxi-flavona) é um flavonoide natural, abundantemente presente em muitas espécies de plantas, particularmente em frutas e legumes como aipo, flores de crisântemo, pimentão doce, cenoura, folhas de cebola, casca de amendoim, brócolis e salsa (FRÉMONT, 2000; IMRAN et al., 2019; PAUL; SAHA, 2004). Este flavonoide tem sido investigado por suas propriedades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatório e também é conhecida por sua atividade antitumoral e multiplicidade e mecanismos antitumorais complexos (AZIZ; KIM; CHO, 2018; CHOWDHURY et al., 2002; LIU et al., 2009; MADHESH; VAIYAPURI, 2012; SHIMOI et al., 1998; XU et al., 2009). No entanto, sua baixa solubilidade e baixa biodisponibilidade limitam as aplicações funcionais (LUO et al., 2019; SHAKEEL et al., 2018).

O tamanho e a forma da partícula influenciam diretamente os processos de reação que envolvem absorção, dissolução; biodisponibilidade, cor e atividade antioxidante; isso está diretamente ligado à estrutura cristalina, área de superfície de contato, morfologia e uniformidade do tamanho de partícula (DANG et al., 2014; MAJUMDAR et al., 2014; WANG et al., 2019a). Diante disso, a produção de pequenas partículas com distribuição de tamanho controlada tem despertado o interesse da comunidade científica e industrial, principalmente nas áreas farmacêutica, alimentícia e química (DUHAN et al., 2017; RASENACK; MÜLLER, 2004; TEMELLI, 2018).

A micronização é caracterizada pela redução do tamanho médio da partícula fornecendo mudanças na estrutura física, modificando o tamanho da partícula, a porosidade e a densidade, podendo ser aplicada em materiais de diferentes áreas, desde a indústria química e farmacêutica até a indústria de alimentos (DURÁN et al., 2010; ZHAO et al., 2019). No contexto de micronização, as técnicas que utilizam fluido supercrítico (FSC) apresentam vantagens frente às técnicas convencionais, visto a redução ou não utilização de solvente, possível eliminação da degradação térmica, ausência de solvente residual e principalmente controle do tamanho de partícula durante o processo (CHENG et al., 2016; DUHAN et al., 2017; RASENACK; MÜLLER, 2004; TENORIO et al., 2007).

O *Gas Antisolvent* (GAS) é uma técnica supercrítica que baseia-se em extrair o solvente orgânico utilizado na solução que contém o soluto de interesse, que será micronizado pelo CO₂ supercrítico (FUENTE; PETERS; ARONS, 2000). Um dos fluidos mais utilizados em estado supercrítico é o dióxido de carbono (CO₂), destacando-se por ser relativamente inerte, não inflamável, abundante e barato (FUENTE; PETERS; ARONS, 2000). A utilização do fluido supercrítico como antissolvente no processo de micronização vem ganhando espaço visto à formação de polimorfos dos compostos após o processo.

O polimorfismo é a capacidade de uma substância se estruturar em diferentes formas cristalinas, com diferentes arranjos ou conformações (GIRON, 1995) e tem impacto direto no ponto de fusão, na solubilidade aparente e na velocidade de dissolução dos compostos, podendo afetar sua estabilidade e biodisponibilidade (GALEGO, 2014; NARBONA et al., 2014).

A luteolina tem sido amplamente pesquisada por sua alta atividade antioxidante, estudos comprovam sua ação anticâncer e em doenças degenerativas (ALI; SIDDIQUE, 2019; CHOWDHURY et al., 2002; LIU et al., 2015a). No entanto, a baixa solubilidade aquosa e a baixa biodisponibilidade limitam sua aplicação. Buscando melhorar a solubilidade, estudos têm promovido encapsulação da luteolina utilizando diferentes técnicas e agentes encapsulantes (LIU et al., 2014), outros estudos têm verificado seu potencial quelante para eliminação de metais tóxicos no organismo (ROY et al., 2015; WANG et al., 2019a) e, embora o uso de tecnologia supercrítica na encapsulação da luteolina já tenha sido utilizada avaliando a modificação da velocidade de dissolução e solubilidade (CAPUA et al., 2017;

CAPUA; ADAMI; REVERCHON, 2017), nenhum trabalho valida a micronização por tecnologia supercrítica.

Devido as potenciais aplicações da luteolina, o objetivo deste trabalho foi estudar o processo de micronização supercrítica por Gás Antissolvente visando a redução do tamanho de partícula, por consequência aumentando sua biodisponibilidade. Assim, este estudo combina de forma inovadora o aumento da razão área superficial/volume da luteolina com o uso da tecnologia supercrítica, visando a obtenção de micropartículas livres de resíduos tóxicos para posterior aplicação biomédica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Estudar o processo de micronização da luteolina pela técnica de Antissolvente Gasoso (GAS) empregando CO₂ como fluido supercrítico.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência das variáveis do processo de micronização (temperatura e pressão) em relação ao tamanho de partícula por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR);
- Quantificar possíveis resíduos de solvente nas partículas micronizadas;
- Analisar a morfologia das partículas de luteolina;
- Determinar o tamanho e distribuição de tamanho das partículas;
- Comparar a atividade antioxidante das partículas de luteolina micronizada e não-micronizada;
- Verificar possíveis degradações dos compostos após o processo de micronização por fluido supercrítico;
- Avaliar se o processo GAS causou a amorfização da luteolina;
- Avaliação da taxa de dissolução da luteolina micronizada comparando com a luteolina não-micronizada.

- Avaliação da solubilidade da luteolina micronizada comparando com a luteolina não-micronizada

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No capítulo em questão, será apresentada uma breve revisão de literatura sobre os assuntos relevantes para a compreensão e contextualização deste trabalho.

2.1 ESPÉCIES REATIVAS, ANTIOXIDANTES E COMPOSTOS FENÓLICOS

Espécies reativas, também conhecidos como radicais livres, são átomos ou moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita externa, quimicamente muito reativos e instáveis (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Esses radicais livres constituem um processo fisiológico e contínuo com funções nos processos metabólicos, onde são capazes de oxidar aleatoriamente moléculas biológicas essenciais como lipídios, proteínas, glicosídeos e ácidos nucleicos, o que resulta na perda de suas funções fisiológicas e indução de efeitos deletérios (VASANTHA RUPASINGHE; NAIR; ROBINSON, 2014). Os radicais livres de maior importância biológica compreendem as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN).

Quanto a ação dos radicais livres, muitas pesquisas têm mostrado que o consumir alimentos com propriedades antioxidantes resultam uma ação protetora efetiva contra esses processos oxidativos naturalmente ocorrentes no organismo (MINATEL et al., 2017). Estudos indicaram que doenças dentre as quais diabetes, câncer e problemas cardiovasculares, estão diretamente ligadas aos danos causados por formas de oxigênio muito reativos relacionadas aos processos de envelhecimento do organismo (ALI; SIDDIQUE, 2019; MINATEL et al., 2017). Assim, antioxidantes são definidos como quaisquer substâncias que, presentes em baixas concentrações frente a um substrato oxidável, previnem, reparam ou retardam a oxidação das moléculas, protegendo as células e inibindo reações associadas à formação de radicais livres, impedindo a perda da integridade celular reparando os danos causados por esses radicais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985; VASANTHA

RUPASINGHE; NAIR; ROBINSON, 2014). Dentre os antioxidantes naturais, destacam-se as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos, que são os antioxidantes mais abundantes na alimentação humana (VASANTHA RUPASINGHE; NAIR; ROBINSON, 2014).

Os compostos fenólicos apresentam em sua estrutura, vários grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas que são classificados em dois grupos: os flavonoides e os não flavonoides, sendo que ambos são metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais. Os grupos dos compostos fenólicos de maior importância são os ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, e antocianinas (VASANTHA RUPASINGHE; NAIR; ROBINSON, 2014). Os compostos fenólicos e suas classes são brevemente descritos a seguir na **Tabela 1**.

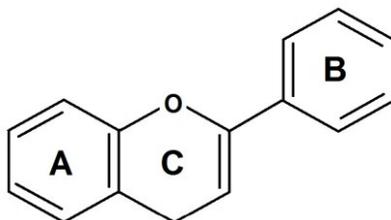
Tabela 1 – Classificação dos compostos fenólicos.

Grupo	Classe	Composto
Ácidos Fenólicos	Ácidos hidroxicinâmicos	Ácido cafeico
		Ácido clorogênico
		Ácido ferúlico
		Ácido sinápico
		Ácidos caftáricos
		Ácido neoclorogênico
	Ácidos hidroxibenzoicos	ácido p-cumarico
		Ácido elágico
		ácido gálico
	Estilbenos	Resveratrol
Taninos	Polímeros de catequina	
	Polímeros de epicatequina	
	Elagitaninos	
	Proantocianidinas	
	Ácidos tânicos	
Ligninas	Secoisolariciresinol	
	Matairesinol	
Flavonoides	Flavonóis	Miricetina
		Quercetina
		Kempferol
	Flavanones	Naringenina
		Hesperetina

Flavonas	Apigenina
	Luteolina
	Tangeretina
	Nobiletina
Flavan-3-ols	(+) -Catequian
	(-) -Epicatequina
	(-) -Epicatequina-3-galato
	(-) -Epigallocatequina-3- galato
	(+) -Galocatequina
	(-) -Epigallocatequina
	Procianidinas
Prodelfinidinas	
Antocianinas	Cianidina 3- galactosídeo
	Cianidina 3-glucosídeo
	Cianidina 3-arabinósido
	Cianidina 3-xilosídeo
	Malvidina
	Delfinidina
Dihidrocalcona	Pelargonidina
	Floretina
	Flordizina

Fonte: adaptado de (VASANTHA RUPASINGHE; NAIR; ROBINSON, 2014).

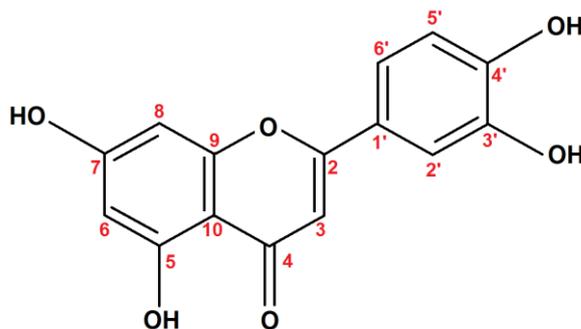
Os flavonoides são a subclasse mais importante dos compostos fenólicos, que são metabólicos secundários dos vegetais (RUFINO et al., 2010), e além de atuarem na parte fisiológica das plantas desempenham importante função para a saúde humana (CAPUA; ADAMI; REVERCHON, 2017; ZHOU et al., 2018). São divididos em classes de acordo com sua estrutura molecular, sua estrutura química básica consiste de 15 carbonos distribuídos em dois anéis aromáticos (anel A e B) unidos por carbono heterocíclico do pirano (anel C) (**Figura 1**), os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila adjacentes, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação da função oxo (-C=O) de algumas das moléculas de flavonoides garantem uma alta atividade antioxidante (MINATEL et al., 2017).

Figura 1 - Estrutura química genérica dos flavonoides

Fonte: elaborado pela autora.

2.2 LUTEOLINA (*ARACHIS HYPOGAEA* L.)

A luteolina é um flavonoide natural da subclasse das flavonas, abundantemente presente em frutas e legumes (FRÉMONT, 2000; IMRAN et al., 2019; PAUL; SAHA, 2004). Dentro da classificação dos flavonoides a luteolina é uma tetra-hidroxiflavona na qual os quatro grupos hidroxí estão localizados nas posições 3', 4', 5 e 7, (**Figura 2**).

Figura 2 - Estrutura química da luteolina

Fonte: elaborado pela autora.

Tem fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_6$, apresenta uma aparência cristalina amarela, ponto de fusão entre 220 e 330°C e massa molecular $286,24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2019). Na **Tabela 2** estão algumas das diferentes fontes de luteolina com sua concentração ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

Tabela 2 – Fontes de luteolina e sua concentração

	Fonte	Conteúdo (mg · 100 g⁻¹)
Legumes	Radicchio	37,96 ± 0,10
	Aipo chinês cru	34,87 ± 0,04
	Salsa seca	19,75 ± 0,06
	Hortelã fresca	11,33 ± 0,02
	Pimenta verde crua (malagueta)	5,11 ± 0,01
	Pimenta crua (Serrana)	4,14 ± 0,02
	Pimentas cruas (jalapeño)	1,34 ± 0,01
	Aipo cru	1,31 ± 0,03
	Couve-rábano cru	1,30 ± 0,05
	Salsa crua	1,24 ± 0,06
	Espinafre cru	1,11 ± 0,01
	Pimentos doces verdes crus	0,69 ± 0,01
	Pimentos doces vermelhos crus	0,63 ± 0,02
	Beterraba crua	0,37 ± 0,03
	Couve de Bruxelas crua	0,34 ± 0,03
	Ervas	Orégano
Bagas de zimbro		69,05 ± 2,3
Tomilho fresco		51,00 ± 3,4
Orégano mexicano fresco		25,10 ± 1,25
Sálvia fresca		16,70 ± 0,7
Alecrim fresco		4,00 ± 0,2
Frutas	Cebolinha crua	0,15 ± 0,07
	Limões crus sem casca	1,50 ± 0,03
	Folhas de batata-doce crua	0,20 ± 0,01

Fonte: adaptado de (MANZOOR et al., 2019).

A atividade antioxidante da luteolina é amplamente reportada e de grande interesse para a indústria de alimentos, desenvolvendo um importante papel na redução da oxidação lipídica dos tecidos (IMRAN et al., 2019; KHAN; SARAF; SARAF, 2015; KHAN et al., 2016). Assim, quando incorporado em produtos alimentícios, ajuda a conservar a qualidade do alimento, além de reduzir o risco de desenvolvimento de algumas doenças (RAMACHANDRAIAH; CHIN, 2021).

Este composto vem sendo estudado extensivamente frente a evidências de suas propriedades bioativas como atividade antioxidante (BOEING et al., 2020;

MADHESH; VAIYAPURI, 2012; ÖZGEN et al., 2011; ROY et al., 2015; WANG et al., 2019a), anti-inflamatória (AZIZ; KIM; CHO, 2018; BOEING et al., 2020; DANG et al., 2014; LIU et al., 2009; NABAVI et al., 2015; VILLALVA et al., 2019), anticancerígenos (AZIZ; KIM; CHO, 2018; IMRAN et al., 2019; MAJUMDAR et al., 2014), bem como seu efeito anti-amnésico (LIU et al., 2009; NABAVI et al., 2015; TAMBE et al., 2016). No entanto, as baixas solubilidade e biodisponibilidade da luteolina limitam suas aplicações funcionais (LUO et al., 2019; SHAKEEL et al., 2018).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), que diferencia as substâncias medicamentosas por sua solubilidade em água e permeabilidade dos tecidos nos fluidos gástricos e intestinais, classifica em quatro níveis, sendo compostos de classe I os com alta permeabilidade e alta solubilidade, classe II com alta permeabilidade e baixa solubilidade, classe III com baixa permeabilidade e alta solubilidade e compostos de classe IV aqueles com baixa permeabilidade e baixa solubilidade (AMIDON et al., 1995). De acordo com essa classificação, a luteolina se enquadra na classe II devido sua baixa solubilidade e alta permeabilidade (CAO et al., 2020). Dessa forma, os estudos que tem como objetivo desenvolver novos produtos ou modificação da estrutura física de compostos com essas características, tem como foco o aumento da solubilidade.

Estudos farmacocinéticos indicaram que a luteolina é rapidamente absorvida após administração oral com concentrações do fármaco detectáveis no plasma em 30 min, mas em proporções muito baixas (SHIMOJ et al., 1998) e dentro do corpo, é excretada rapidamente pelos rins (LÓPEZ-LÁZARO, 2009). Devido à baixa solubilidade aquosa, a extensão da absorção no sistêmica é pobre, além disso, a luteolina sofre extenso metabolismo pré-sistêmico (KHAN; SARAF; SARAF, 2015).

Estudos desenvolvidos por Wang et al. (2019a) mostraram um aumento da taxa de dissolução da luteolina após sua precipitação por método antissolvente, também foi observado o perfil de concentração no plasma de ratos, mostrando que as nanopartículas apresentavam concentração máxima 1,67 vezes maior que a luteolina não tratada, indicando melhoramento da biodisponibilidade após a formação das nanopartículas.

Diversas estratégias têm sido utilizadas visando aumentar a solubilidade da luteolina, como a formação de emulsões, encapsulação, obtenção de polimorfos e

formação de cocristais, técnicas que têm apresentado resultados positivos em relação à melhora da solubilidade composto (SOWA; ŚLEPOKURA; MATCZAK-JON, 2013; WANG et al., 2019a, 2021).

Assim, tornam-se necessárias alternativas capazes de aumentar a solubilidade da luteolina, garantindo seu acesso íntegro ao local de ação desejado. No que se refere à indústria de alimentos, técnicas que reduzam a cristalinidade e melhorem a solubilidade do composto, permitem sua aplicação em uma variedade de alimentos em razão de suas propriedades funcionais, possibilitando a substituição de antioxidantes sintéticos e agregando valor ao produto. Além das diversas aplicações na área biomédica devido ao potencial já explorado da ação da luteolina frente ao tratamento de diversas doenças.

2.3 IMPORTÂNCIA DO TAMANHO DE PARTÍCULA

A produção de partículas pequenas com distribuição de tamanho controlado tem atraído o interesse da comunidade científica e industrial, principalmente nas áreas farmacêutica, alimentar e química (BEVILAQUA; ROSA, 2019; DUHAN et al., 2017; RASENACK; MÜLLER, 2004; TEMELLI, 2018).

O tamanho e forma da partícula influencia diretamente nos processos de reação que envolvem absorção, dissolução; biodisponibilidade, coloração e atividade antioxidante; isto está diretamente ligado à área superficial de contato, morfologia e uniformidade do tamanho das partículas. O aumento e uniformidade da área superficial pode ser obtida pela formação de nanopartículas, a aplicação dessas propriedades é base da nanotecnologia de materiais (DURÁN et al., 2010).

Na indústria de alimentos, a nanotecnologia vem sendo utilizada para aumentar a vida de prateleira de alimentos perecíveis e também incorporar compostos nutracêuticos que possibilite ações benéficas a saúde humana como, antioxidante ou anti-inflamatória (MADHESH; VAIYAPURI, 2013; MAJUMDAR et al., 2014; WANG et al., 2019a).

Após o surgimento da nanotecnologia, diversas técnicas envolvendo processamento, fabricação e aplicação de estruturas com forma e tamanho controlados foram desenvolvidos com o objetivo de modificar o produto final, tanto

na escala micrométrica quanto na escala nanométrica (DUHAN et al., 2017; DUNCAN, 2011). Uma classificação caracteriza que, partículas menores que 0,1 μm são ditas nanopartículas, partículas com diâmetro entre 0,1 a 1 μm como submicrométricas, entre 1 e 5000 μm como micropartículas e acima de 5000 μm como sendo macropartículas (VYAS et al., 2017).

2.4 MICRONIZAÇÃO

Micronização é o processo de diminuição de tamanho de partículas ou materiais. É um processo comum em fármacos que apresentam problemas de dissolução ou solubilidade (DUNCAN, 2011). A área superficial de contato e a distribuição do tamanho das partículas afetam não apenas a etapa de fabricação como também a biodisponibilidade de um composto. Neste sentido, a micronização é utilizada a fim de aumentar a biodisponibilidade dos compostos.

Na área farmacêutica a micronização é utilizada a fim de aumentar a área superficial das partículas, aumentar a velocidade de dissolução e garantir a distribuição de tamanho das partículas (MAJUMDAR et al., 2014; WANG et al., 2019a).

Das técnicas de micronização, as convencionais como secagem por pulverização, trituração mecânica, recristalização entre outras, apresentam algumas desvantagens como: uso excessivo de solvente, por consequência altas concentrações de solvente residual, uso de temperaturas que causam degradação térmica, dificuldade de controlar a distribuição e o tamanho de partículas durante processamento (ADAMI et al., 2019; DOUROUMIS; ROSS; NOKHODCHI, 2017). Essas técnicas convencionais de micronização podem afetar a estrutura cristalina da partícula, gerando produtos com características indesejáveis (FRANCESCHI et al., 2010).

Para minimizar estes efeitos causados pelas técnicas convencionais, métodos alternativos de micronização foram desenvolvidos (FUENTE; PETERS; ARONS, 2000; GALLAGHER et al., 1989). Dentre estes métodos não convencionais tem-se a tecnologia de cristalização por fluido supercrítico (SFC - Supercritical Fluid Crystallization), que vem ganhando atenção pela sua multifuncionalidade

(GALLAGHER et al., 1989). O CO₂ supercrítico pode ser usado como soluto, solvente ou antissolvente (MARCO; REVERCHON, 2011).

Em um processo de atomização assistida supercrítica SAA (DI CAPUA; ADAMI; REVERCHON, 2017) mostrou que é possível aumentar a taxa de dissolução e a biodisponibilidade preparando partículas submicrométricas de luteolina/poly(vinylpyrrolidone), tendo dissolução 9 vezes mais rápida que o medicamento não tratado. Montes et al. (2016) preparou micropartículas por um processo antissolvente supercrítico e obteve liberação mais rápida para o coprecipitado, novas ligações químicas não foram formadas entre o polímero e o composto indicando a natureza física do processo SAS, mostrando que é favorável para aplicações farmacêuticas, visto que qualquer interação química entre o polímero e o composto de interesse pode resultar em uma alteração em suas propriedades, assim obteve condições de cristalinidade e a estabilidade inalteradas após processamento.

O uso de CO₂ supercrítico no processo de micronização conquista cada vez mais espaço, podendo produzir polimorfos que não podem ser produzidos por outras técnicas, uma vez que o polimorfismo pode induzir a mudanças nas características físico-químicas do composto, pois pode alterar o ponto de fusão, densidade aparente, solubilidade aparente e velocidade de dissolução (GALEGO, 2014; NARBONA et al., 2014), assim, o polimorfismo pode afetar a estabilidade, a manipulação e a biodisponibilidade do fármaco (RIBAS et al., 2019).

2.5 POLIMORFISMO

O polimorfismo é a capacidade de uma substância em se estruturar de diversas formas cristalinas, com arranjos ou conformações diferentes, a palavra se deriva do grego “poli” (muitas) e “morphes” (formas) (GIRON, 1995). Como se originam de diferentes arranjos, a habilidade do polimorfo cristalizar é governada por fatores termodinâmicos e cinéticos, que levam a estabilidade da estrutura química (BRITAIN, 2012).

As diferentes formas cristalinas de um fármaco podem levar a alterações nas propriedades físico-químicas, como a solubilidade, e por consequência sua

dissolução (BLAGDEN et al., 2007), além disso, podem existir alterações no tamanho da partícula, forma, dureza, ponto de fusão, densidade, higroscopicidade e estabilidade, que afetam o processo de produção do composto e sua biodisponibilidade (BLAGDEN et al., 2007; BRITAIN, 2012; GIRON, 1995).

Estudos demonstram que, compostos na forma cristalina apresentam menor solubilidade e maior estabilidade térmica, diferentemente da sua forma amorfa (BLAGDEN et al., 2007). Formulações que apresentam compostos parcialmente cristalino e amorfo são mais solúveis que compostos que apresentam apenas formas cristalina (GIRON, 1995). Como os polimorfos originam-se de diferentes arranjos das moléculas, a habilidade do polimorfo cristalizar é governada por fatores termodinâmicos e cinéticos (ANWAR; ZAHN, 2017; PINDELSKA; SOKAL; KOLODZIEJSKI, 2017), sendo que, apenas uma forma é termodinamicamente estável a determinada temperatura, assim a forma polimórfica de maior energia tende a se transformar na forma de menor energia e, portanto, mais estável, ou seja, pode ocorrer a transição polimórfica. Portanto, compostos amorfos ou parcialmente cristalinos promovem maior rapidez no efeito terapêutico, resultados da sua maior velocidade de dissolução, resultando em maior absorção do composto (BLAGDEN et al., 2007; BRITAIN, 2012; GIRON, 1995).

2.6 EMPREGO DO FLUIDO SUPERCRÍTICO

O emprego de fluidos supercríticos para a obtenção de materiais de tamanho reduzido e controlado ocorre como função dos parâmetros de operação: natureza do solvente e do reagente, pressão, temperatura, tempo de residência no reator e aditivos empregados (ADSCHIRI; YOKO, 2018; BEVILAQUA; ROSA, 2019; PROSAPIO; MARCO; REVERCHON, 2018; REVERCHON; MARCO, 2011). Além de satisfazer as necessidades industriais que necessitam de características controladas nos materiais sólidos, essas metodologias tentam sanar as deficiências encontradas nos métodos convencionais. Por isto, as tecnologias que empregam fluido supercrítico têm sido amplamente testados experimentalmente em laboratório, como as extrações, formação de partículas, esterilização e amplamente utilizada como meio de reação (DUHAN et al., 2017; FANG et al., 2020; KANKALA et al., 2018).

Fluidos supercríticos são substâncias que se encontram acima de suas condições críticas de pressão e temperatura, apresentam elevado poder de solvatação e baixa tensão superficial, com propriedades de transporte características de gases (BRUNNER, 1994). Estando o fluido acima do ponto crítico, pequenas mudanças na sua pressão resultam em significativas alterações na densidade e em propriedades relacionadas à densidade, como viscosidade e poder de solvatação (BRITTAIN, 2012; BRUNNER, 1994; REVERCHON; MARCO, 2011). As tecnologias supercríticas permitem reduzir ou eliminar o uso de solventes orgânicos durante o processo. A alta solubilidade dos solventes orgânicos nos fluidos supercríticos permite sua completa remoção obtendo-se, assim, produtos livres de solvente, sem a necessidade de uma etapa de pós-processamento, comum nos métodos convencionais (ADSCHIRI; YOKO, 2018; DUHAN et al., 2017; TEMELLI, 2018).

Os processos com fluidos supercríticos podem ser divididos em três categorias, sendo que a maioria emprega CO₂ como fluido pressurizado, seja como solvente (RESS), soluto (PGSS) ou antissolvente (SFEE, GAS, SAS, PCA, ASES e SEDS) (PRIAMO et al., 2013).

O método que utiliza o fluido supercrítico como solvente RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solutions*) consiste em dissolver o soluto de interesse em um solvente (fluido supercrítico) e, então, precipitar esse soluto por meio da rápida expansão da mistura (JUNG; PERRUT, 2001), sua aplicação se limita a compostos de baixa polaridade, que apresentam solubilidade razoável em CO₂ (PRIAMO et al., 2013).

A técnica denominada PGSS (*Particles From Gas Saturated Solutions*) utiliza o fluido sub ou supercrítico como soluto, é a técnica mais adequada para recristalização de compostos que não são solúveis em fluidos supercríticos, a técnica acontece em duas etapas, primeiro ocorre a saturação do soluto com o fluido supercrítico, depois a solução saturada é expandida por meio de um bocal, levando à formação das partículas pelo intenso resfriamento que é causado pela liberação do fluido supercrítico; nesta técnica há possibilidade de obter partículas sólidas ou líquidas (dependendo do sistema) (MARTÍN; COCERO, 2008).

Os processos que utilizam o fluido supercrítico como antissolvente são empregados para compostos que são praticamente insolúveis em fluidos

supercríticos e a principal diferença entre eles é como ocorre o contato entre a solução orgânica e o antissolvente comprimido (PROSAPIO; MARCO; REVERCHON, 2018); as técnicas dos métodos antissolvente provocam a precipitação do substrato que inicialmente é dissolvido em uma solução orgânica, e de acordo com Franceschi et al. (2010) o princípio dessas técnicas é que o soluto seja completamente miscível no solvente orgânico e imiscível ou pouco miscível no antissolvente, e o solvente orgânico precisa possuir maior afinidade com o antissolvente do que com o soluto, assim quando essa solução entra em contato com o antissolvente a solubilidade do soluto no solvente orgânico é drasticamente reduzida causado pelo decréscimo no poder de solvatação do solvente orgânico, resultando na precipitação do soluto na forma particulada. A técnica GAS (*Gas-Antisolvent*) descrito por Gallagher et al. (1989), foi o método pioneiro em empregar o fluido supercrítico como antissolvente. As vantagens da utilização da técnica GAS é sua versatilidade, pois, selecionando apropriadamente o solvente é possível micronizar muitos produtos diferentes (FUENTE; PETERS; ARONS, 2000).

Atualmente, o dióxido de carbono (CO_2) é mais empregado como fluido supercrítico nos processos de encapsulação e precipitação de compostos, devido sua elevada pureza, baixo custo, abundante disponibilidade, ser atóxico, não inflamável, inodoro, incolor e inerte, e suas condições moderadas de temperatura crítica (T_c) = 31,1 °C e pressão crítica (P_c) = 73,8 bar (BRUNNER, 1994). É um fluido potencial para se trabalhar com alimentos e produtos naturais, pois possibilita o processamento a baixas temperaturas, utilizando um meio não-oxidante, o que permite sua utilização com compostos termolábeis ou que são facilmente oxidados.

É crescente o número de trabalhos na literatura que apresentam a utilização da tecnologia supercrítica na obtenção de materiais sólidos micro ou nanoparticulados de interesse nas indústrias de alimentos, química e farmacêutica. Aguiar et al. (2018), realizaram micronização de trans-resveratrol empregando tecnologia supercrítica, eles obtiveram aumento de 2,8 vezes a sua solubilidade em água, e um aumento de 1,8 vezes na taxa de dissolução, ressaltando que a técnica é promissora, pois permite o uso do trans-resveratrol nas indústrias química, alimentícia e farmacêutica, uma vez que o processo de micronização melhorou as propriedades do composto.

2.7 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

Estudos comprovam que, o estresse oxidativo desempenha papel importante em muitas doenças (BOEING et al., 2020; DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010; MADHESH; VAIYAPURI, 2012) e os antioxidantes têm mostrado efeitos benéficos na terapia de doenças neurodegenerativas (ALI et al., 2019; ALI; SIDDIQUE, 2019), câncer (CHOWDHURY et al., 2002; LIU et al., 2015b) e doenças inflamatórias (AZIZ; KIM; CHO, 2018; VILLALVA et al., 2019). Os antioxidantes agem atrasando ou inibindo a oxidação do substrato onde os radicais livres atacam (IMRAN et al., 2019). Porém, os compostos bioativos, em sua maioria, apresentam baixa biodisponibilidade. A biodisponibilidade está diretamente relacionada ao tamanho da partícula, sua cristalinidade e morfologia, assim, técnicas que reduzam a cristalinidade e o tamanho de partícula têm sido largamente empregados (DUHAN et al., 2017; RASENACK; MÜLLER, 2004).

Considerando a necessidade de melhoria na biodisponibilidade desses compostos, as indústrias química e farmacêutica vêm buscando tecnologias que possibilitem solucionar essa carência com diferentes métodos de micronização como, por exemplo moagem, spray-drying entre outros, porém essas técnicas tradicionais apresentam desvantagens como ampla distribuição de tamanho das partículas e a degradação do composto, causados pelo uso de temperaturas elevadas e em alguns casos pelo uso excessivo de solventes. Neste sentido e pela constante busca por tecnologias ambientalmente seguras, os processos que utilizam tecnologia supercrítica atuam perfeitamente sanando essas necessidades (ADSCHIRI; YOKO, 2018; BEVILAQUA; ROSA, 2019; TEMELLI, 2018). Os processos que aplicam tecnologia supercrítica têm vantagem diante dos métodos convencionais, pois fazem uso reduzido de solventes e sua completa remoção ao final do processo, além das temperaturas serem moderadas diminuindo a degradação e aumentando a qualidade do produto final.

Estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa associados ao LATESC da UFSC comprovaram a eficiência dos processos a alta pressão para micronização de compostos bioativos de interesse para as indústrias alimentícia, química, médica e farmacêutica. O estudo de micronização de β -caroteno pela técnica SEDS

apresentou rendimento entre 71 a 94%, a temperatura e a pressão do sistema tiveram influência na morfologia das partículas, o processo promoveu diminuição no tamanho das partículas, variando de 3,2 a 96,8 μm (FRANCESCHI et al., 2009). Um estudo com a precipitação da teofilina a partir de soluções de etanol e diclorometano, utilizando CO_2 supercrítico como antissolvente pela técnica SEDS resultou em diminuição da forma cristalina do composto, bem como redução do tamanho de partícula (FRANCESCHI et al., 2008). Em estudo de micronização de resveratrol via SEDS, resultados significativos foram apresentados, com valor de solvente residual dentro dos padrões aceitáveis e diminuição de 167 vezes o tamanho da partícula (AGUIAR et al., 2016). Estas pesquisas indicaram mudança nas características do material após o processamento, contribuindo para a teoria que com a micronização é possível modificar as características dos compostos e por decorrência aumentar sua biodisponibilidade. Assegurando capacidade de aplicações antes impossíveis.

Muitos compostos bioativos têm sido extensivamente pesquisados, como o caso da luteolina, um flavonoide natural que nas últimas décadas vem despertando interesse na indústria farmacêutica e de alimentos devido sua atividade antioxidante, os estudos comprovam sua ação anticancerígena e em doenças degenerativas (ALI; SIDDIQUE, 2019; CHOWDHURY et al., 2002; LIU et al., 2015b). No entanto, a baixa solubilidade aquosa e baixa biodisponibilidade da luteolina limitam sua aplicação. Buscando melhorar a solubilidade, estudos tem promovido a encapsulação da luteolina por meio de diferentes técnicas, empregando diferentes agentes encapsulantes (LIU et al., 2014; WANG et al., 2019b), outros trabalhos verificam o potencial quelante da luteolina para eliminação de metais tóxicos no organismo (ROY et al., 2015; WANG et al., 2019c).

Embora já tenha sido empregado o uso de tecnologia supercrítica na encapsulação da luteolina (DI CAPUA et al., 2017; DI CAPUA; ADAMI; REVERCHON, 2017; PALAZZO et al., 2019), avaliando a modificação da velocidade de dissolução e solubilidade, nenhum trabalho aborda a micronização por tecnologia supercrítica e sua posterior caracterização.

Diante disto, tomando em consideração os benefícios gerados com a micronização das partículas por meio de tecnologia supercrítica descritos anteriormente, se faz evidente a necessidade do estudo da micronização da

luteolina por tecnologia supercrítica, sua caracterização e avaliação da modificação na solubilidade e dissolução. Dessa forma, este estudo alia de forma inovadora o aumento da área superficial de contato da luteolina ao uso de tecnologia supercrítica, visando obter partículas micronizadas livres de resíduos tóxicos para posterior aplicação biomédica.

CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS

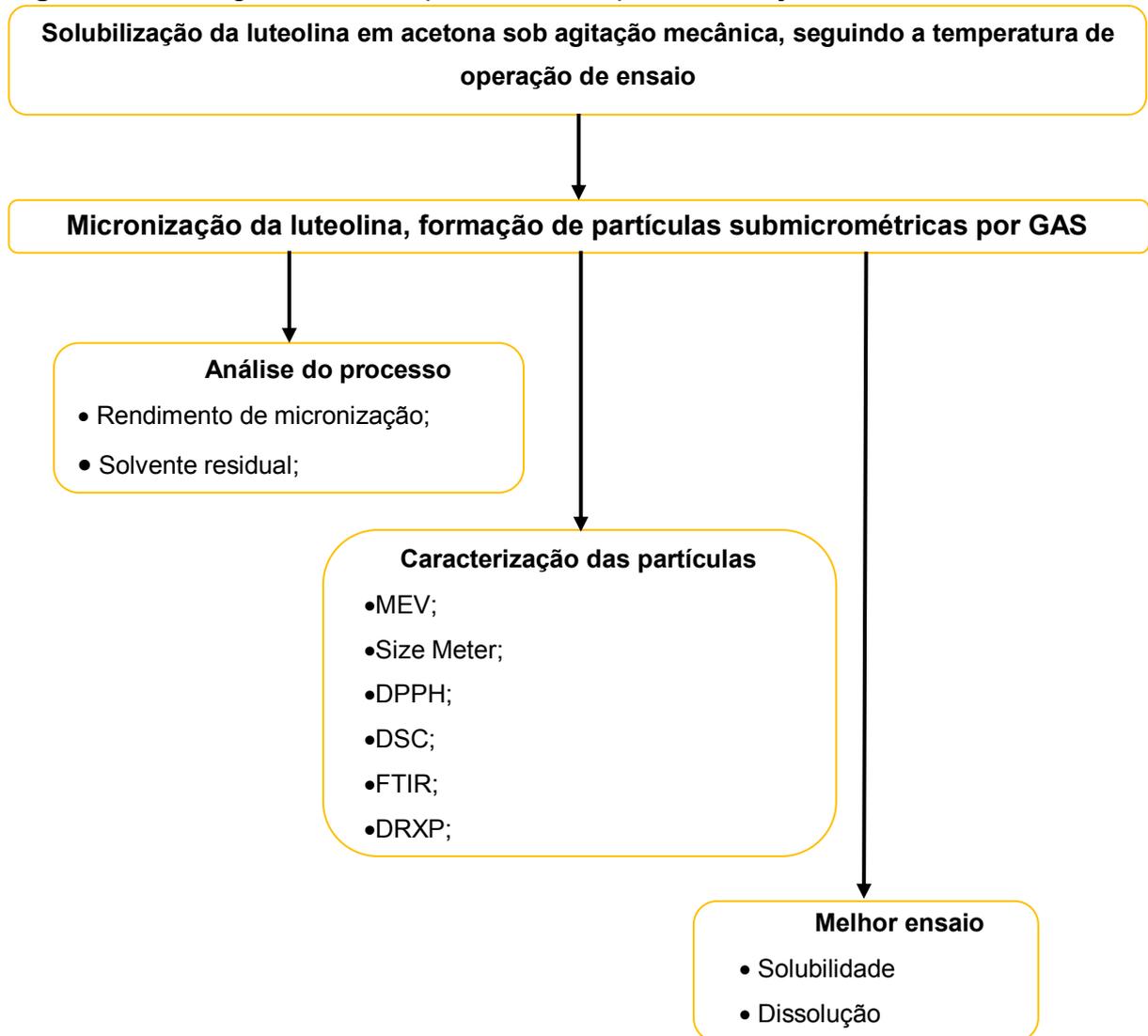
3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados detalhadamente o material, incluindo nome, fórmula, pureza e fabricante, e a metodologia utilizada para a realização dos experimentos de micronização da luteolina empregando dióxido de carbono pressurizado como antissolvente e acetona como solvente orgânico. Na sequência, as metodologias para a caracterização das partículas obtidas, determinação de solvente residual e análises *in vitro* da atividade antioxidante, taxa de dissolução e solubilidade a fim de investigar e comparar o perfil da luteolina micronizada com a luteolina não-micronizada.

3.1 ESPECIFICAÇÕES DO MATERIAL E DO PROCESSAMENTO

O composto utilizado foi a luteolina, com fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_6$ e pureza de 98%, produzido por *Kingherbs Limited* e adquirido por *Active Pharmaceutica* LTDA ME (SC - Brasil). O certificado de análise contendo informações sobre pureza e outras propriedades da amostra de luteolina encontra-se no **Anexo A**. Acetona (C_3H_6O) foi utilizada como solvente da solução a ser micronizada, com pureza de 99,5% foi adquirido da Vetec (Sigma Aldrich) e dióxido de carbono foi utilizado como antissolvente, CO_2 com 99,9% de pureza na fase líquida, foi fornecido pela White Martins S. A. Todos os produtos químicos foram utilizados como recebidos, sem purificação adicional e foram armazenados em condições e local apropriados para que não sofressem qualquer tipo de alteração por interferência de luz, calor e umidade. As etapas experimentais para realização deste trabalho são apresentadas na **Figura 3** e descritas na sequência.

Figura 3 – Fluxograma das etapas utilizadas para realização deste trabalho.

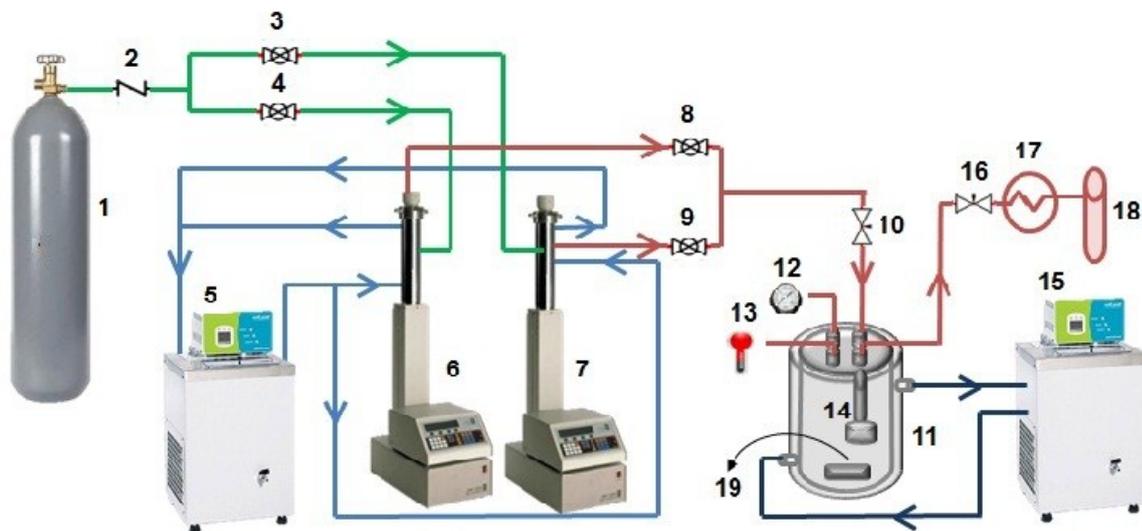


Fonte: desenvolvido pela autora.

3.2 UNIDADE EXPERIMENTAL DE MICRONIZAÇÃO

A micronização foi realizada por técnica empregando fluido pressurizado como antissolvente, pela técnica *Gas-Antisolvent* (GAS). A unidade experimental utilizada na micronização da luteolina foi a mesma utilizado por Ribas et al. (2019) na cocristalização de curcumina e por Pessoa et al. (2019) na precipitação de cocristais de resveratrol. O aparato experimental está apresentado na **Figura 4**.

Figura 4 – Diagrama esquemático do aparato experimental GAS.



Fonte: adaptado de (RIBAS et al., 2019).

Conforme a **Figura 4**, o aparato experimental é constituído dos elementos descritos a seguir:

- (1) Reservatório de armazenamento de dióxido de carbono (CO₂);
- (2) Válvula de uma via que permite a vazão em um único sentido (*Check-Valve* Marca HIP, Modelo 15-41AF1-T, Pressão de operação até 1034 bar);
- (3) e (4) Válvulas de Esfera, permitem a vazão do CO₂ para as bombas de alta pressão (Marca Swagelok, Modelo SS-83KS4, Pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);
- (5) Banho ultratermostático de recirculação, mantém constante a temperatura das bombas de alta pressão (Marca Nova Ética, Modelo 521/2D);
- (6) e (7) Bombas de alta pressão, pressurizam o antissolvente, neste caso o CO₂. São utilizadas duas bombas que possuem cilindro de armazenamento com capacidade de 506 mL (Marca ISCO, Modelo 500D, pressão de trabalho de até 258 bar e vazão máxima de 170 mL · min⁻¹), para manter constante a vazão de entrada de antissolvente durante o processo de micronização;
- (8) e (9) Válvulas de esfera, quando abertas permitem a vazão de CO₂ pressurizado das bombas para a câmara de micronização (Marca Swagelok, Modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);

- (10) Válvula métrica tipo agulha, controla a vazão de CO₂ pressurizado das bombas de alta pressão para câmara de micronização (Marca HIP, Modelo 15-11AF1, pressão de operação até 1034 bar);
- (11) Câmara de precipitação encamisada cilíndrica de aço inox 316 com capacidade de 600 mL (diâmetro interno de 8 cm e altura 12cm). Possui cinco entradas na tampa: uma central, e quatro periféricas, onde uma está fechada;
- (12) Entrada periférica para entrada de um transdutor de pressão (Transdutor absoluto – 0 a 250 bar, Marca SMAR, Modelo LD 301), para monitoramento da pressão dentro da câmara de micronização, ele está conectado à linha entre a válvula (10) e a câmara de micronização;
- (13) Entrada periférica para o sensor de temperatura (termopar) ligado à um indicador de temperatura (Universal, Marca NOVUS, Modelo N 1500);
- (14) Suporte constituído por dois filtros de politetrafluoretileno, disposto na saída da câmara, para retenção das partículas micronizadas no seu interior, permitindo apenas a vazão do antissolvente e solvente orgânico. Um suporte apresentando porosidade de 1µm, diâmetro de 8 mm e espessura de 1 mm serve de base para o filtro membrana de porosidade 0,22 µm, espessura de 150 µm e mesmo diâmetro;
- (15) Banho ultratermostático de recirculação (Marca Nova Ética, Modelo 512/2D), controla a temperatura da câmara de micronização;
- (16) Válvula métrica tipo agulha (Marca HOKE, Modelo 1315G2Y), fica na saída da câmara de precipitação. Esta válvula controla a vazão de saída da câmara de micronização, juntamente com a válvula (10);
- (17) Fita de aquecimento (Marca FISATON, Modelo 5, 200 W de potência). Utilizada devido ao efeito Joule - Tomphson (expansão do antissolvente após passar pela válvula, causando congelamento). A temperatura utilizada na fita de aquecimento é 200°C, para impedir o congelamento da válvula, permitindo o controle da vazão de saída;
- (18) *Trap* de segurança, recheado com algodão;
- (19) Agitador magnético.

3.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL PARA MICRONIZAÇÃO DA LUTEOLINA

As condições do processo de micronização foram definidas de forma a garantir boa solubilidade do CO₂ em acetona (GIACOBBE, 1992). Foram utilizados parâmetros a partir dos trabalhos de Aguiar et al. (2016); Marco Reverchon, (2011) e Taghi, Naghizadeh e Ghorbanzadeh (2018). O volume da solução adicionada na câmara de precipitação foi 35mL, equivalentes a 6% da capacidade de volume da câmara de precipitação a fim de garantir eficiência no processo GAS (FUENTE; PETERS; ARONS, 2000); a concentração da solução luteolina - acetona foi fixada em 5 mg·mL⁻¹, de acordo com a saturação da luteolina em acetona para as condições de temperatura a serem utilizadas (PENG; ZI; YAN, 2006), sendo elas 35, 40 e 45 °C e pressão de operação de 80, 100 e 120 bar mais as condições axiais, sendo apresentadas na **Tabela 3**. Para verificar a influência das variáveis temperatura e pressão na micronização da luteolina, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² com 3 pontos centrais e 4 axiais.

Tabela 3 - Variáveis estudadas no processo de micronização.

Variáveis	Níveis				
	-α	-1	0	+1	+α
Temperatura (°C)	33	35	40	45	47
Pressão (bar)	72	80	100	120	128

O procedimento inicia-se com a solubilização da luteolina em acetona. A mistura foi realizada em reator de vidro encamisado sob agitador magnético (Fisatom 753A) por 2 h até completa solubilização. Ao mesmo tempo era realizado o ajuste de temperatura no banho ultratermostático (5), após alcançar a temperatura de 3 a 5 °C era realizada a liberação do CO₂ do cilindro (1) para as bombas (6 e 7); pois, apesar da pressão de vapor do CO₂ ser alta na temperatura ambiente (64 bar em 25 °C) a abertura da válvula do cilindro (1) não é suficiente para deslocar a quantidade necessária de CO₂ para as bombas (6 e 7), assim, nessa temperatura o CO₂ passa para a fase líquida, garantindo a melhor utilização do volume de CO₂ disponível nas bombas (6 e 7); o reservatório de CO₂ permanecia aberto o tempo de solubilização da luteolina em acetona. Nestas condições, era possível armazenar cerca de 500 mL de CO₂ no estado líquido dentro da câmara das bombas (6 e 7).

Após completa solubilização da luteolina em acetona, a solução foi adicionada na câmara de micronização (11), junto com uma barra de agitação magnética. A montagem da câmara (11) foi realizada, inserindo-se os filtros de retenção (14) para evitar arraste do material micronizado pela vazão de saída. Inicialmente, foi colocado o filtro de politetrafluoretileno que tem maior porosidade servindo de suporte para o filtro membrana. A câmara (11) foi fechada e então efetuada a conexão da linha de entrada de CO₂ (10), do transdutor de pressão (12), do sensor de temperatura (13), da linha de saída (16), e em seguida a câmara (11) foi conectada ao banho ultratermostático (15) previamente aquecido na temperatura do experimento.

Após a montagem da câmara, o agitador magnético (19) foi ligado e a válvula (10) foi aberta para permitir o enchimento da câmara com CO₂, toda a linha de passagem do CO₂ foi mantida aberta, desde o cilindro (1) até a câmara (11).

Quando a câmara de micronização (11) estava preenchida com CO₂, as válvulas (2, 3 e 4) foram fechadas e as bombas de seringa (6 e 7) foram pressurizadas, mantendo toda a linha desde as bombas até a válvula métrica (10) pressurizadas a 200 bar, para assim, manter um gradiente de pressão entre a câmara (11) e as bombas (6 e 7), evitando um possível refluxo da câmara (11) para as linhas (8) e (9) podendo causar precipitação do composto e também para fazer que o CO₂ entre com alta velocidade na câmara de precipitação intensificando a dispersão do jato da solução durante o experimento (FRANCESCHI et al., 2009).

A vazão de CO₂ para a câmara foi mantido até a obtenção da pressão experimental desejada; duas bombas de alta pressão foram usadas para que o CO₂ permanecesse em vazão contínua. Uma vez que a câmara atingiu a pressão desejada, a vazão de entrada de CO₂ foi fechada mantendo durante 10 min a pressão constante sob agitação. Após esse tempo, a válvula (16) foi gradualmente aberta, em conjunto com a válvula (10), até ajustar a vazão de CO₂ na câmara, mantendo-se a pressão constante. O controle da pressão da câmara foi realizado por meio da válvula (16) sendo monitorado pelo visor do controlador de pressão (12). Por segurança, a fim de evitar o efeito Joule-Tomson da válvula (16), a mesma foi envolta por fita de aquecimento ligada a um controlador de temperatura. A temperatura da fita de aquecimento foi mantida em 200 °C.

Para remoção do solvente residual e secagem das partículas micronizadas, a vazão de CO₂ foi mantido constante por aproximadamente 60 min, passagem de aproximadamente 1 L de CO₂, seguindo as condições de pressão e temperatura de cada ensaio experimental. Depois disto, a vazão de CO₂ foi interrompido pelo fechamento da válvula (10). A agitação (19) era desligada e dava início a despressurização da câmara até a pressão atmosférica, por meio da abertura lenta da válvula (16), para evitar o arraste das partículas. Este procedimento leva em torno de 50 min, após 30 min a temperatura do banho (15) era reduzida aos poucos até temperatura ambiente, para evitar aglomeração durante a coleta das partículas, causado pela mudança drástica de temperatura com a abertura da câmara. Em seguida, desconectava-se as linhas da câmara e iniciava-se o procedimento de abertura da mesma para a coleta das partículas micronizadas, que foram cuidadosamente guardadas em eppendorf e armazenadas a 5 °C.

3.4 RENDIMENTO DE MICRONIZAÇÃO

O rendimento da micronização foi avaliado considerando a quantidade de luteolina precipitada coletada na câmara de micronização. A porcentagem de rendimento foi calculada pela razão entre a massa coletada na câmara após cada ensaio e a massa de luteolina presente na solução orgânica adicionada à câmara de precipitação em cada experimento. A massa de luteolina adicionada à solução orgânica foi de 0,175 g.

3.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SOLVENTE RESIDUAL

Para a identificação de solvente residual dos compostos micronizados foi realizada cromatografia gasosa em um CG modelo 7890A marca *Agilent Technologies*, acoplada ao detector por ionização de chama FID (CG-FID) em *headspace*, nos ensaios de 1 ao 11 e na amostra não-micronizada a fim de verificar possíveis resíduos de solvente utilizados no processo de micronização. Para quantificação no CG-FID foi construída uma curva de calibração [**Apêndice A**] para os cálculos de valores em ppm do solvente utilizando padrão de acetona.

Um amostrador automático (*headspace sampler*) e injetor *CGSampler 80* foram utilizados para as análises, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida *HP-5MS (Agilent)*, 30 m de comprimento x 250 μm i.d. x 0,25 μm de espessura de filme, composta por 5% de fenil-95% de metilpolisiloxano. O hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 0,8 mL min^{-1} . A temperatura do injetor (modo sem divisão) e o detector eram 160 °C e 250 °C, respectivamente. O programa de temperatura do forno consistia em 40 °C por 3 min, então 20 °C / min a 90 °C por 1 min e então 30 °C / min a 140 °C por 2 min. Tempo total de execução 9,91 min. Condições de espaço na cabeça: modelo (*Agilent GC auto Sampler 80*), volume de injeção (500,00 μL), tamanho da seringa (2,5 mL-HS), temperatura de incubação (85 °C), tempo de incubação (600 s), temperatura da seringa (105 °C), velocidade do agitador (250 rpm).

3.6 MORFOLOGIA E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA

A morfologia das partículas de luteolina, micronizadas e não-micronizada, foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para todas as condições experimentais realizadas. A análise foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, em microscópio eletrônico JEOL JSM6390LV (MEV), Estados Unidos. As partículas foram aderidas adequadamente nos “stubs” com fita carbono de dupla face. Após condicionamento em alto vácuo, as partículas foram recobertas com ouro (camada de 30 nm de espessura) e submetidas à análise com visualização realizada em aumentos de 50 a 3000 vezes, aplicando tensão de 10 kV

A partir das micrografias seguiu-se com as medições do tamanho das partículas empregando software Sizer Meter, versão 1.1 (desenvolvido por Luiz Henrique Castelan Carlson), analisando aproximadamente 300 partículas para cada condição experimental avaliada. A partir das médias de tamanho de partícula, foi calculado desvio padrão e coeficiente de variação (CV), ferramenta utilizada para expressar a variabilidade dos dados em relação a média.

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

As partículas da luteolina micronizada e não-micronizada foram avaliadas quanto a atividade antioxidante pelo método de inibição do radical DPPH descrita por Khan et al. (2016), que constitui na reação das partículas em uma solução etanólica de DPPH na concentração de 0,3 mM e com concentrações crescentes das partículas analisadas (10, 25, 50, 75, 90, 125 e 185 mg·mL⁻¹), por 30 min em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido o tempo de reação, fez-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (MULTILEITORA INFINITE M200 TECAN) a um comprimento de onda de 517 nm. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFSC. Quanto maior a atividade antioxidante da amostra, mais estável o radical DPPH se torna, provocando a descoloração da solução (DPPH e partículas) diminuindo sua absorvância (MENSOR et al., 2001).

O percentual de inibição das partículas testadas sobre o radical foi calculado convertendo-se a absorvância em porcentual de atividade antioxidante (AA %), segundo a **Equação 1**:

$$AA (\%) = 100 - \frac{(A_0 - A_1)}{A_c} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde, A_0 é absorvância da amostra, A_1 é absorvância da norma e A_c é absorvância do controle. A concentração da amostra necessária para captar 50% do radical livre DPPH (EC_{50} - *Effective concentration*) é calculada por análise de regressão exponencial e linear (MENSOR et al., 2001), o valor é definido como a mínima concentração efetiva necessária para decrescer em 50% a concentração inicial do radical DPPH, assim, quanto menor este valor, maior a atividade antioxidante de uma amostra.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Foram realizadas 3 medidas e os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média. Os efeitos das variáveis no processo de micronização sobre o rendimento de micronização, tamanho médio de partícula e atividade antioxidante foram avaliados estatisticamente por meio do software STATISTICA 13.5 software (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). Com o objetivo de determinar diferenças significativas entre os experimentos, os resultados foram avaliados por análise unidirecional de variância ANOVA, seguido pelo teste post hoc de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

3.9 ANÁLISE DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

As curvas de DSC foram realizadas em equipamento da Perkin Elmer (Jade-DSC) utilizando cadinhos de alumínio. As análises foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC; ciclos de aquecimento único, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio ($20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), foram realizados na faixa de temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ a $350 \text{ }^\circ\text{C}$ e razão de aquecimento de $20 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Esta análise busca estimar modificações na composição da amostra, em seu grau de cristalinidade e temperatura de fusão, que eventualmente possam ter sido causados pelo processo de micronização (AGUIAR et al., 2016).

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

A análise de FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) foi realizada na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, a fim de verificar as modificações na estrutura das partículas de luteolina, causadas pelo processo de micronização à alta pressão (CAPUA; ADAMI; REVERCHON, 2017). Os espectros de absorção foram obtidos a temperatura ambiente e realizadas em *Agilent Technologies* (Cary 600 Series FTIR Spectrometer) equipado com ATR (*attenuated total reflectance* – refletância total

atenuada) com cristal de ZnSe, as partículas foram avaliadas em uma faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} .

3.11 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE PÓ (DRXP)

A difração de raios X de pó foi realizada para avaliar a possível mudança na estrutura cristalina da luteolina após a micronização, uma vez que, esta mudança implica diretamente nas características de solubilidade do composto. Os dados de DRXP foram realizados em difratômetro Rigaku MiniFlex600 Desktop X-Ray Diffractometer equipado com fonte $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.54 \text{ \AA}$), com tubo de raios X operado a 30 kV e corrente de 15 mA. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, em porta amostra com cavidade, por meio de varredura angular a 2θ na faixa de 2 a 45° com velocidade de varredura de 5° / min e 0,02 °/s de passo angular (AGUIAR et al., 2016). A análise foi realizada no Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas, LINDEN-UFSC.

3.12 ESTUDO DO PERFIL DE SOLUBILIDADE *IN VITRO* DA LUTEOLINA

A determinação do perfil de solubilidade da luteolina foi realizada com base no trabalho de Cheng et al. (2016). As análises foram realizadas no Laboratório Multipropósito (MULTIALI) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC e analisadas em espectrofotômetro (MULTILEITORA INFINITE M200 TECAN) no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFSC, para leitura da absorbância a 348 nm.

A luteolina não-micronizada e as partículas do ensaio 1 (35 °C – 80 bar) foram selecionadas para este experimento, visto que, apresentaram a maior atividade antioxidante e menor tamanho de partícula, sendo individualmente avaliadas em três meios de liberação diferentes, sendo eles: água destilada, solução tampão de fosfato (PBS) pH 6,8, escolhido pela proximidade do pH fisiológico, e solução de HCl 0,1 M, em referência às condições do sistema gástrico (DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010). A cada 100 mL de solvente, já mencionado anteriormente, foi adicionado 100 μg de amostra. Os erlenmeyers contendo a solução foram

submetidas ao sonificador ultrasônico por cerca de 10 min e após foram incubados em *shaker* MARCONI MA410 CFT a $37,0 \pm 0,5$ °C em agitação orbital de 100 rpm, por 72 h (CHENG et al., 2016), ao final do tempo uma alíquota foi retirada e filtrada em filtro membrana de 0,45 µm (VertiClean™ PTFE) e analisadas em espectrofotômetro para leitura da absorbância a 348 nm, utilizada para determinar a concentração de luteolina a partir de uma curva padrão (como está escrito na próxima seção)

3.13 ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO* DA LUTEOLINA

A determinação da taxa de dissolução da luteolina foi realizada com base nos trabalhos de Cheng et al. (2016) e Di Capua, Adami e Reverchon (2017). Uma curva padrão foi produzida por diluições seriadas (ver **Apêndice B**) para a luteolina; leituras de absorbância a 348 nm foram utilizadas para estabelecer uma regressão linear.

As partículas selecionadas para este experimento foram as que apresentaram a maior atividade antioxidante e menor tamanho de partícula, ensaio 1 (35 °C – 80 bar) em comparação com a luteolina não-micronizada, que foram individualmente avaliadas no meio de liberação, sendo ele a água destilada (AGUIAR et al., 2017). Foram adicionados 10 mg de amostra em frascos de vidro contendo 100 mL de água destilada, os frascos foram incubados em *shaker* (MARCONI MA410 CFT) a $37,0 \pm 0,5$ °C em agitação orbital de 100 rpm. Alíquotas de 1 mL eram retiradas em pontos de 0, 10, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min, para derivar um perfil de concentração versus tempo, e a mesma quantidade de meio puro imediatamente era repostado ao sistema, mantendo o volume constante, a análise foi realizada no Laboratório Multipropósito (MULTIALI) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. A alíquota coletada foi filtrada em filtro membrana de 0,45 µm (VertiClean™ PTFE) e analisadas em espectrofotômetro (MULTILEITORA INFINITE M200 TECAN) no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFSC, para leitura da absorbância a 348 nm.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados de micronização da luteolina, com sua caracterização e o teste *in vitro* em comparação com a luteolina não-micronizada. Os resultados são apresentados em sessões.

4.1 ANÁLISE DO PROCESSO DE MICRONIZAÇÃO DA LUTEOLINA POR GAS

4.1.1 Rendimento de micronização

Foram obtidas as partículas com sucesso em todos os experimentos realizados. Todos os ensaios experimentais e seus resultados em relação ao rendimento de micronização estão na **Tabela 4**.

As partículas apresentaram tamanho médio variando de 2,31 a 5,41 μm e diferentes rendimentos de micronização, dependendo das condições experimentais. Por meio da **Tabela 4**, percebe-se que o experimento 1 resultou no maior rendimento de micronização (94,69%), para o qual adotou-se a temperatura (35 °C) e a pressão (80 bar). Já o menor rendimento de micronização foi obtido no experimento 10 (54,11%), onde empregou-se a condição de menor temperatura (33 °C) determinada pelo ponto axial do planejamento e o ponto central de pressão (100 bar). Os maiores rendimentos de micronização, resultantes dos experimentos 1 ao 8 são equivalentes aqueles encontrados por Franceschi et al. (2009) na coprecipitação de β -caroteno em diclorometano por SEDS, que obteve rendimento entre 70 e 94%, e embora tenha resultado em rendimentos semelhantes, as partículas obtidas apresentaram diâmetro médio entre 11,2 e 96,8 μm .

Para avaliação do efeito principal dos parâmetros de processamento sobre o rendimento de micronização da luteolina, foi realizada análise estatística adotando nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). No entanto, a análise estatística realizada não apresentou nenhum efeito como significativo para o resultado de rendimento de micronização, (**Tabela 5**).

Tabela 4 – Planejamento experimental e rendimento de micronização.

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Rendimento (%)
1	35 (-1)	80 (-1)	94,69
2	45 (1)	80 (-1)	93,60
3	35 (-1)	120 (1)	92,63
4	45 (1)	120 (1)	92,11
5	40 (0)	100 (0)	91,83
6	40 (0)	100 (0)	90,80
7	40 (0)	100 (0)	91,26
8	40 (0)	72 (- α)	92,34
9	40 (0)	128 (+ α)	66,74
10	33 (- α)	100 (0)	54,29
11	47 (+ α)	100 (0)	58,11

Tabela 5 – Análise de Variância do rendimento de micronização da luteolina por GAS

Variation Source	SQ	GL	MQ	F _c	F _t
Regressão	995,516	5	199,1032	0,70	5,05
Erro	1429,014	5	285,8027		
Total	2424,530	10			
R ²	41,06 %				

SQ – soma quadrática; GL - graus de liberdade; MQ – média quadrática; F – teste Fisher; F_c (F_{calculado}); F_t (F_{tabelado}). Nível de confiança - 95%.

4.1.2 Avaliação de solvente residual

A análise de solvente residual realizada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama das amostras micronizadas de luteolina permitiu a

identificação e quantificação da acetona residual, solvente utilizado no processo GAS, um teor de 158,24 ppm.

A acetona é classificada pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH) como solvente de classe 3 – baixa toxicidade e baixo perigo para a saúde humana (REVISION; COMMISSION; PHARMACOPOEIA, 1995). Considera-se que quantidades residuais de solventes da classe 3 de 50 mg por dia ou menos (correspondendo a 5000 ppm) são aceitáveis sem justificativa e que quantidades maiores também podem ser aceitas, desde que sejam realistas em relação à capacidade de fabricação e às boas práticas de fabricação (COMMITTEE OF REVISION; EUROPEAN PHARMACOPOEIA; COMMITTEE ON THE JAPANESE, 2021).

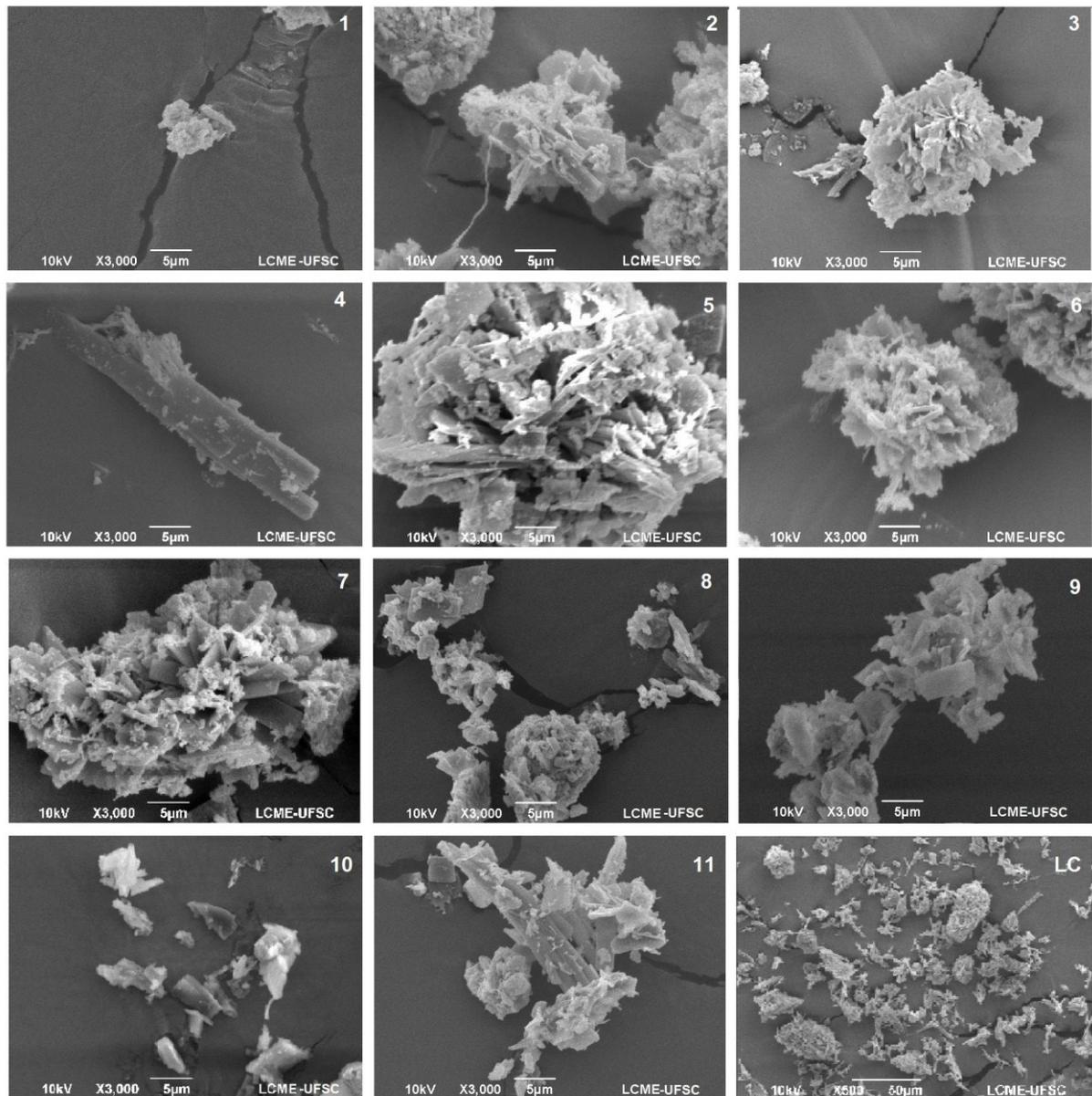
Deste modo, os resultados encontrados estão de acordo com as normas vigentes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Farmacopeia da República Popular da China, Farmacopeia Europeia e Conferência Internacional em Harmonização, documento Q3C(R8) de 2021. Assim, a aplicação da técnica GAS utilizando CO₂ supercrítico pode ser utilizada para a produção de micropartículas de luteolina dentro de padrões estabelecidos por agências reguladoras para consumo humano.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE LUTEOLINA MICRONIZADAS PELA TÉCNICA GAS

4.2.1 Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A **Figura 5** mostra as micrografias obtidas para todos os ensaios experimentais e para a luteolina não-micronizada. A luteolina não-micronizada apresenta tamanho de partícula irregular, com diâmetro variando de 1 a 27 µm, em formato de agulhas ou bastonetes e com grande aglomeração (imagem LC da **Figura 5**). Semelhante às imagens apresentadas por (WANG et al., 2019a) na caracterização de luteolina. Di Capua; Adami; Reverchon (2017); Liu et al. (2015) e Wang et al. (2019a) analisando a morfologia da luteolina, a identificaram como agregados irregulares e em formato de agulhas.

Figura 5 - Micrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das partículas produzidas e da luteolina não-micronizada.



Legenda: Partículas de luteolina micronizada e não-micronizada, com ampliação de 3000X (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) e de 500X (luteolina não-micronizada 98%). (1) luteolina micronizada por GAS a 35 °C e 80 bar, ensaio 1; (2) luteolina micronizada por GAS a 45 °C e 80 bar, ensaio 2; (3) luteolina micronizada por GAS a 35 °C e 120 bar, ensaio 3; (4) luteolina micronizada por GAS a 45 °C e 120 bar, ensaio 4; (5) luteolina micronizada por GAS a 40 °C e 100 bar, ensaio 5; (6) luteolina micronizada por GAS a 40 °C e 100 bar, ensaio 6; (7) luteolina micronizada por GAS a 40 °C e 100 bar, ensaio 7; (8) luteolina micronizada por GAS a 40 °C e 72 bar, ensaio 8; (9) luteolina micronizada por GAS a 40 °C e 128 bar, ensaio 9, (10) luteolina micronizada por GAS a 33 °C e 100 bar, ensaio 10, (11) luteolina micronizada por GAS a 47 °C e 100 bar, ensaio 11.

As partículas da maioria dos ensaios, apresentam estrutura semelhante a folhas enrugadas e algodão, imagens 2, 3, 5, 6 e 7, em condições combinando máxima temperatura e mínima pressão e vice-versa, bem como na condição central. A diferença na morfologia de partículas micronizadas em relação a partículas não micronizadas é resultado da influência dos parâmetros do processo, interferentes na taxa de transferência de massa durante a precipitação por técnicas antissolvente pressurizado (FRANCESCHI et al., 2008).

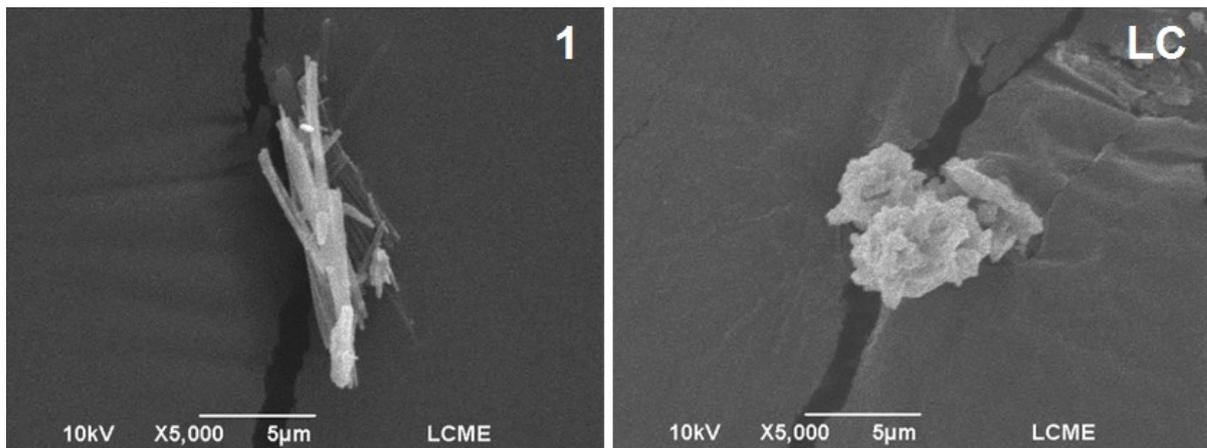
As partículas dos ensaios 8, 9 e 10 apresentaram característica semelhante a pequenas placas, mostrando que os pontos axiais dos experimentos causaram como um achatamento das agulhas visualizadas na luteolina antes do processamento, tais características também foram observadas em partículas de trans-resveratrol micronizadas por SEDS, onde obtiveram algumas partículas com formato de placas (AGUIAR et al., 2016) e no estudo de micronização do β -caroteno resultando em partículas em formato de folhas e agulhas (FRANCESCHI et al., 2009). Segundo Priamo et al. (2013) no geral, temperaturas mais elevadas resultam em maior aglomeração e formação de partículas irregulares.

As imagens 4 e 11 apresentaram estrutura de agulhas, se assemelhando à estrutura morfológica da luteolina não-micronizada, nas condições máximas de temperatura 45 e 48 °C, respectivamente. No ensaio 11, maior temperatura aplicada, foi observada uma acentuada aglomeração de partículas, indicando que a temperatura tem efeito diretamente proporcional a aglomeração. Segundo Franceschi et al. (2009) a aglomeração pode ter natureza química onde as partículas interagem com o solvente líquido orgânico e resulta na fusão das partículas, nos quais uma única partícula não mais possui uma identidade distinta. Em estudo de micronização do β -caroteno por tecnologia supercrítica Franceschi et al. (2009) obteve partículas de formato semelhante a agulhas. Segundo Reverchon (2011) os parâmetros do processo, como temperatura, pressão, concentração da solução e vazão de antissolvente podem afetar a morfologia das partículas.

Como pode ser notado, a imagem do ensaio 1 é a que apresenta menor aglomeração e menor tamanho de partícula, também apresentando morfologia completamente diferente da morfologia da luteolina comercial (**Figura 6**), esse ensaio foi realizado a 35 °C e 80 bar, combinadas as menores condições de

operação dos ensaios. Em geral, a temperatura mais baixa implica em menos aglomeração (MARTÍN; COCERO, 2008). Observando de uma maneira geral, as condições de ensaio com a pressão mais alta, ensaios 3 e 9, apresentaram tamanho de partículas maior, como também maior aglomeração de partículas.

Figura 6 - Micrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da condição experimental 1 produzida por GAS e da luteolina não-micronizada.



Legenda: Partículas de luteolina micronizada por GAS a 35 °C e 80 bar, ensaio 1 e não-micronizada 98%.

Pela luteolina ser um material com característica cristalina, os parâmetros do processo dificilmente controlam a morfologia externa das partículas formadas, mas podem influenciar o arranjo interno das partículas precipitadas, podendo gerar formação de polimorfo ou mudança no grau de cristalinidade, assim as partículas formadas após o processo de micronização podem precipitar e crescer de forma mais ordenada devido a sua estrutura ou hábito cristalino (FRANCESCHI et al., 2008).

4.2.2 Análise de tamanho de partícula

A luteolina não-micronizada consistia em partículas típicas aglomeradas em forma de agulhas. A concentração de luteolina em acetona foi mantida em 5 mg·mL⁻¹ em todas as condições experimentais, definida de acordo com a solubilidade do composto no solvente (PENG; ZI; YAN, 2006), a vazão de antissolvente em 10

mL·min⁻¹ a 200 bar e 5 °C, definidos de acordo com a seção 3.3. Imagens adicionais MEV foram utilizadas para coletar os dados de diâmetro de partícula para o cálculo de $D_p \pm \sigma$ e coeficiente de variação (**Anexo B**).

A luteolina não-micronizada apresenta tamanho médio de partícula de 22,75 μm , comparado ao resultado da micronização do ensaio 1, com tamanho médio de partícula de 2,31 μm , observa-se uma redução de 10 vezes no tamanho da partícula. O resultado das leituras das partículas está apresentado na **Tabela 6**, com os valores do diâmetro médio das partículas (D_p), desvio padrão (σ) e o coeficiente de variação.

Tabela 6 – Planejamento experimental com diâmetro médio de partícula.

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	D_p (μm)*	CV
1	35 (-1)	80 (-1)	2,31 \pm 1,04 ^f	0,45
2	45 (1)	80 (-1)	3,33 \pm 2,00 ^e	0,60
3	35 (-1)	120 (1)	2,56 \pm 1,60 ^f	0,62
4	45 (1)	120 (1)	5,41 \pm 5,39 ^a	1,00
5	40 (0)	100 (0)	4,14 \pm 3,09 ^c	0,75
6	40 (0)	100 (0)	4,18 \pm 2,57 ^c	0,61
7	40 (0)	100 (0)	4,55 \pm 3,17 ^b	0,70
8	40 (0)	72 (- α)	2,54 \pm 1,68 ^f	0,66
9	40 (0)	128 (+ α)	3,78 \pm 2,28 ^d	0,60
10	33 (- α)	100 (0)	3,05 \pm 2,05 ^e	0,67
11	47 (+ α)	100 (0)	2,48 \pm 1,73 ^f	0,70

*Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0.05$), ANOVA seguido pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

Uma análise estatística foi realizada adotando nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) para avaliação do efeito dos parâmetros de processamento sobre o tamanho médio de partícula da luteolina micronizada. Nenhum dos fatores de entrada

(temperatura e pressão) apresentou efeito significativo no diâmetro de partícula (**Tabela 7**), e embora isto tenha ocorrido pode-se considerar que o processo de micronização da luteolina por GAS foi bem sucedido, visto que Capua et al. (2017) ao investigarem um processo supercrítico de atomização na formação de partículas de luteolina não o obtiveram e descreveram o processo como insucesso pela formação irregular no tamanho das partículas.

Tabela 7 – Análise de Variância para o diâmetro de partícula na micronização da luteolina por GAS

Variation Source	SQ	GL	MQ	F _c	F _t
Regressão	8,616	5	1,7232	2,36	5,05
Erro	3,636	5	0,7273		
Total	12,253	10			
R²	70,32 %				

SQ – soma quadrática; GL - graus de liberdade; MQ – média quadrática; F – teste Fisher; F_c (F_{calculado}); F_t (F_{tabelado}). Nível de confiança - 95%.

Neste sentido, foi realizada uma caracterização da distribuição de tamanho de partículas pelo coeficiente de variação (VC), que é definido como a razão entre o desvio padrão (σ) e o tamanho médio de partícula, foi também realizado um teste de médias, Tukey, com o mesmo nível de confiança, para avaliar a diferença dos processos na leitura do diâmetro de partícula (**Tabela 6**). Os ensaios 1, 3, 8 e 11 apresentaram tamanhos de partícula parecidos entre eles e menores em relação as demais ensaios, e observando o coeficiente de variação, o ensaio 1 (35 °C e 80 bar) foi responsável pela menor variação no diâmetro médio das partículas.

Embora nenhum dos fatores, temperatura e pressão, tenha apresentado efeito significativo na leitura de diâmetro de partícula no processo de micronização, todos os ensaios possibilitaram a diminuição considerável do tamanho de partícula da luteolina não-micronizada, melhor visualizado no **Apêndice C**, pela distribuição normal do tamanho das partículas, calculado no Excel a partir dos dados de leitura D_p. Além disso, técnicas convencionais de micronização (moagem, spray, entre outros) resultam em degradação térmica do produto e alta variação na distribuição do tamanho de partículas (SEFRIN SPERONI et al., 2021), assim técnicas com uso

de fluido supercrítico apresentam boa alternativa, pois têm se mostrado excelente resultados no processamento de produtos termicamente instáveis (ADSCHIRI; YOKO, 2018; BALDINO; CARDEA; REVERCHON, 2019; BEVILAQUA; ROSA, 2019).

O critério de seleção de melhor ensaio para micronizar luteolina por GAS foi o menor diâmetro de partícula e menor desvio padrão (ensaio 1), além disto foi considerada a análise de atividade antioxidante para seleção da melhor condição na formação de micropartículas da luteolina por GAS, que será apresentado na sessão 4.2.3.

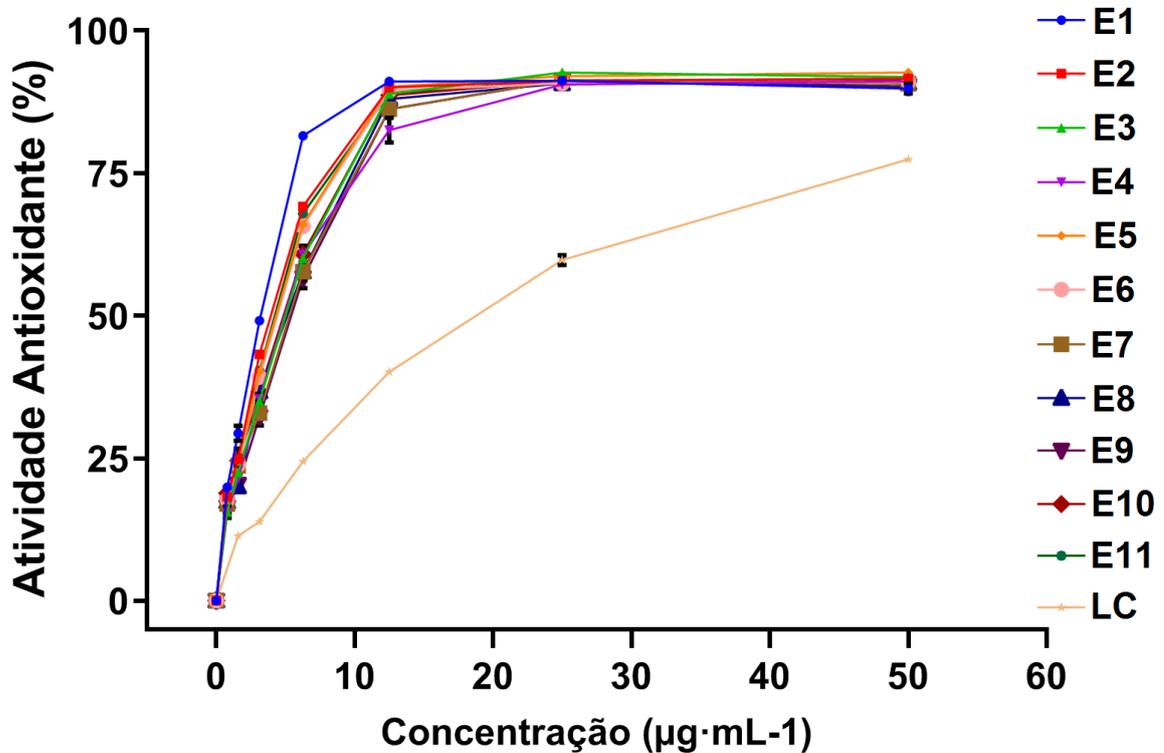
4.2.3 Atividade antioxidante - determinação da capacidade de inibição do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A **Figura 7** mostra a atividade antioxidante da luteolina não-micronizada e das partículas micronizadas por GAS seguindo o planejamento descrito no tópico 3.3. Os resultados são apresentados como atividade antioxidante em função da concentração.

Pode-se observar que todas as partículas produzidas por GAS apresentaram maior atividade antioxidante (%) que a luteolina não-micronizada ($17,93 \pm 0,26$), este fato condiz com o resultado observado na microscopia e tamanho de partícula, uma vez que a estrutura morfológica e área superficial de contato têm ligação direta com o potencial bioativo, aqui observado pela atividade antioxidante (SEFRIN SPERONI et al., 2021).

A capacidade de inibição do radical DPPH foi realizada para verificar o efeito do processo GAS de micronização sobre a atividade antioxidante da luteolina. A análise foi realizada em triplicata e os valores foram expressos por meio do EC_{50} , indicando a concentração mínima necessária para diminuir 50% da concentração inicial do radical livre DPPH, e quanto menor este valor, maior a atividade antioxidante da amostra (CHEN; BERTIN; FROLDI, 2013). A **Tabela 8** apresenta os valores de EC_{50} encontrados para as partículas obtidas em todas as condições experimentais.

Figura 7 - Atividade antioxidante de luteolina não-micronizada e micronizadas por GAS.



Legenda: (LC) luteolina não-micronizada 98% e (E1) luteolina micronizada por GAS a 35 °C e 80 bar, ensaio 1; (E2) luteolina micronizada por GAS a 45 °C e 80 bar, ensaio 2; (E3) luteolina micronizada por GAS a 35 °C e 120 bar, ensaio 3; (E4) luteolina micronizada por GAS a 45 °C e 120 bar, ensaio 4; (E5) luteolina micronizada por GAS a 40 °C e 100 bar, ensaio 5; (E6) luteolina micronizada por GAS a 40 °C e 100 bar, ensaio 6, e (E7) luteolina micronizada por GAS a 40 °C e 100 bar, ensaio 7; (8) luteolina micronizada por GAS a 40 °C e 72 bar, ensaio 8; (9) luteolina micronizada por GAS a 40 °C e 128 bar, ensaio 9, (10) luteolina micronizada por GAS a 33 °C e 100 bar, ensaio 10, (11) luteolina micronizada por GAS a 47 °C e 100 bar, ensaio 11.

A fim de selecionar a melhor condição experimental para as análises seguintes de solubilidade e dissolução, foi realizada análise estatística adotando nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) para avaliação do efeito dos parâmetros de processamento sobre a atividade antioxidante na partícula do luteolina micronizada (**Tabela 9**), foi também realizada a estatística de médias pelo teste de Tukey, com o mesmo nível de confiança, para o resultado da atividade antioxidante representada

por EC₅₀, estes resultados estão apresentados na **Tabela 8**, com os valores médio e o desvio padrão (σ).

Tabela 8 – Planejamento experimental com atividade antioxidante por DPPH.

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	EC ₅₀ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) *
1	35 (-1)	80 (-1)	2,88 ± 0,02 ^f
2	45 (1)	80 (-1)	3,51 ± 0,04 ^e
3	35 (-1)	120 (1)	4,36 ± 0,02 ^b
4	45 (1)	120 (1)	4,46 ± 0,11 ^b
5	40 (0)	100 (0)	3,75 ± 0,00 ^{de}
6	40 (0)	100 (0)	3,82 ± 0,03 ^d
7	40 (0)	100 (0)	4,62 ± 0,04 ^{ab}
8	40 (0)	72 (- α)	4,45 ± 0,11 ^b
9	40 (0)	128 (+ α)	4,80 ± 0,07 ^a
10	33 (- α)	100 (0)	4,16 ± 0,05 ^c
11	47 (+ α)	100 (0)	3,67 ± 0,01 ^{de}

*Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0.05$), ANOVA seguido pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

Novamente não foi possível identificar uma tendência de variação nos valores de atividade antioxidante das partículas de luteolina micronizadas por GAS em função da temperatura e pressão (**Tabela 9**). No entanto, os resultados encontrados indicam que não houve perda da propriedade antioxidante durante o processo de micronização, contribuindo para a afirmação que, processos de formação de partículas utilizando CO₂ como solvente supercrítico permitindo a manutenção da atividade antioxidante do composto ou classe de compostos de interesse após o processamento (DAL MAGRO et al., 2017; SEFRIN SPERONI et al., 2021; YAN et al., 2021).

Tabela 9 – Análise de Variância para a atividade antioxidante da luteolina micronizada por GAS.

Variation Source	SQ	GL	MQ	F _c	F _t
Regressão	5,043	5	1,0086	1,88	5,05
Erro	2,674	5	0,5349		
Total	7,718	10			
R ²	65,34 %				

SQ – soma quadrática; GL - graus de liberdade; MQ – média quadrática; F – teste Fisher; F_c (F_{calculado}); F_t (F_{tabelado}). Nível de confiança - 95%.

O EC₅₀ de todas os ensaios das partículas micronizadas apresentaram diferença em relação a atividade antioxidante da luteolina não-micronizada (**Tabela 8**). As partículas apresentaram EC₅₀ cerca de 80% melhor do que o EC₅₀ apresentado na luteolina não-micronizada e, conseqüentemente, uma atividade antioxidante maior. CAMPOS et al. (2008) classifica como alto potencial antioxidante por DPPH resultados de EC₅₀ abaixo de 250 µg·mL⁻¹ e de acordo com esse parâmetro tanto a luteolina não-micronizada como a micronizada apresenta alta atividade antioxidante.

A diminuição da atividade antioxidante encontrada nos ensaios 2 e 4 em relação ao ensaio 1 pode ter sido causada pela temperatura de operação utilizada no experimento (45 °C), bem como pela aglomeração das partículas (observado pelo MEV) causando diminuição da área superficial exposta ao meio reacional. De acordo com Bender et al. (2020) e Duran et al. (2010) variações na temperatura afetam os mecanismos de ação de vários antioxidantes de diferentes maneiras e, em geral, um aumento na temperatura provoca aceleração das reações de iniciação, reduzindo a atividade antioxidante.

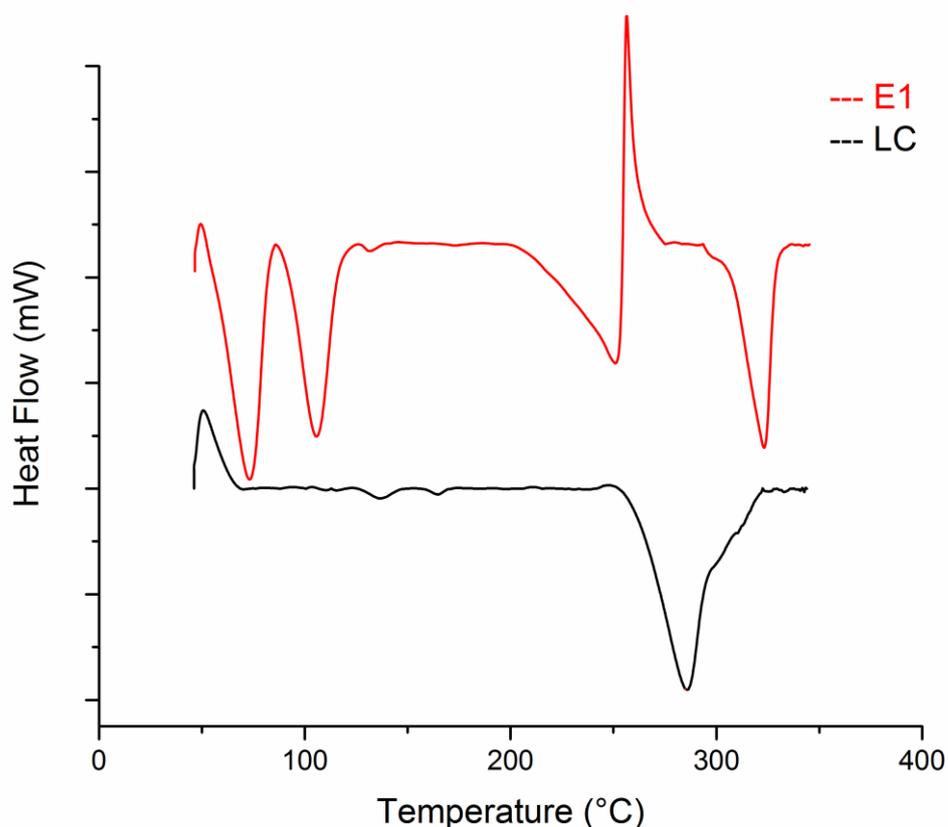
4.2.4 Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC)

O critério para selecionar a melhor condição de micronização foi o EC₅₀ juntamente com menor desvio padrão, considerando também, os resultados do tamanho de partícula. Sendo assim, o ensaio 1 foi selecionado para demais análises

de caracterização por apresentar melhor condição na formação de micropartículas da luteolina (35 °C e 80 bar), o mesmo apresentou atividade antioxidante de 2,88 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, um aumento de 622% na atividade antioxidante comparada a luteolina não-micronizada, que apresentou atividade antioxidante de 17,93 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi realizada a fim de verificar o comportamento térmico da partícula micronizada, a possível modificação no grau de cristalinidade, por meio da temperatura de fusão e variação de entalpia. A temperatura de fusão foi determinada diretamente no gráfico a partir do ponto de inflexão da linha base, estendendo-o até o eixo de temperatura do gráfico nas curvas de DSC (**Figura 8**).

Figura 8 - Calorimetria diferencial de varredura (DSC) da luteolina não-micronizada e das partículas micronizadas por GAS na condição experimental 1.



Legenda: (LC) Luteolina não-micronizada 98% e (E1) Luteolina micronizada por GAS a 35 °C e 80 bar, ensaio 1.

Uma corrida experimental foi realizada para cada amostra obtendo o histórico térmico. Analisando a figura acima observa-se uma variação com relação aos picos de fusão da luteolina micronizada em comparação a luteolina não-micronizada. A partir destas curvas de DSC, foi calculada a entalpia de fusão por meio do cálculo da área sobre o pico endotérmico, em que a entalpia é o valor de energia na forma de calor que é absorvido pela amostra a pressão constante. A luteolina não-micronizada apresentou um pico endotérmico em 286,10 °C com $\Delta H = 38,956 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ que é característico do seu ponto de fusão. Esses valores são semelhantes aos valores encontrados por (GONG et al., 2013) na determinação de pureza de luteolina, que encontraram valores variando de 280 a 360 °C, dependendo da forma de recristalização e da origem da luteolina. No gráfico de DSC (**Figura 8**), pode-se verificar uma mudança do ponto de fusão na luteolina micronizada, tendo aparecimento de dois picos endotérmicos, sendo o primeiro em 245,39 °C com $\Delta H = 3,153 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ e o segundo pico em 322,27 °C com $\Delta H = 30,774 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ (ensaio 1), o que indica uma modificação da estrutura cristalina que é a formação de um polimorfo, representado na alteração do ponto de fusão do composto.

Os valores de entalpia na luteolina micronizada sugerem uma redução na cristalinidade ou mudança parcial na forma cristalina, requerendo uma quantidade menor de energia para a fusão do material ou também pela diminuição do tamanho da partícula, ou seja, quanto menor o tamanho destas partículas menor será a energia liberada para o evento da fusão (FRANCESCHI et al., 2009). De acordo com Brittain (2012) e Giron (1995) essa mudança no ponto de fusão pode alterar suas propriedades de dissolução e solubilidade. O composto micronizado apresentou também um pico exotérmico em 255 °C, que de acordo com Cheng et al. (2016) pode ser devido a uma instabilidade na estrutura da partícula formada após o processamento. O pico próximo a 100 °C pode ser resultado da higroscopicidade da luteolina, este pico também foi observado por outros autores (CAPUA et al., 2017; DI CAPUA; ADAMI; REVERCHON, 2017).

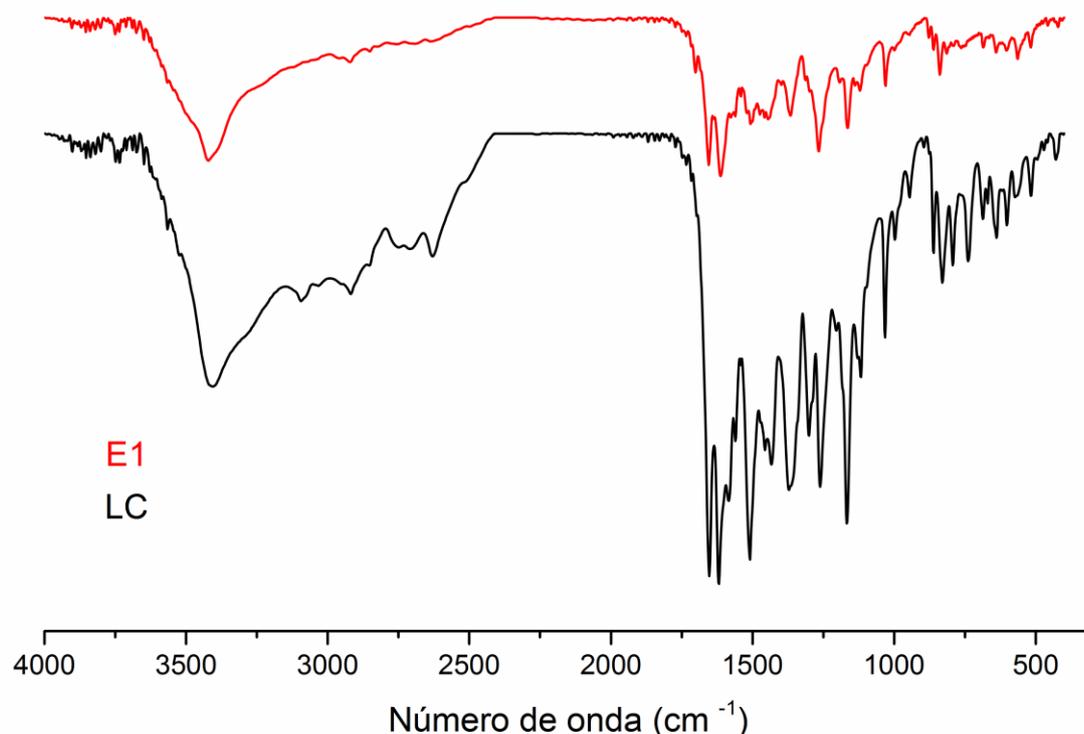
A duplicidade dos picos de fusão na partícula micronizada também pode estar relacionada a uma possível separação de contaminante na luteolina, pois de acordo com Juppo et al. (2003), fluidos supercríticos podem separar impurezas de

materiais e podem ser utilizados na purificação de materiais cristalinos. Para verificar esta hipótese, foi realizada uma análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier para verificar as linhas características de estiramento de cada componente $C_{15}H_{10}O_6$ da luteolina.

4.2.5 Análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As partículas de luteolina micronizadas foram avaliadas por FTIR para verificar possíveis alterações em sua estrutura química causadas pelo processo supercrítico e comparadas com a luteolina não-micronizada. Os resultados são apresentados na **Figura 9**.

Figura 9 - Espectros no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da luteolina não-micronizada e das partículas micronizadas por GAS do ensaio 1.



Legenda: (LC) Luteolina não-micronizada 98% e (E1) Luteolina micronizada por GAS a 35 °C e 80 bar, ensaio 1.

O espectro da luteolina não-micronizada apresentou um amplo pico em 3420 cm^{-1} , atribuído à vibração de alongamento do grupo hidroxila (-OH); bandas características de absorção relacionadas à vibração de estiramento do grupo carbonila (C=O); também foram identificados em 1656 cm^{-1} e as flexões das bandas do grupo hidroxila fenólicos em 1266 cm^{-1} . E em 1166 cm^{-1} , o pico relacionado à vibração de estiramento C-O-C. Em 1661 cm^{-1} devido à vibração de alongamento dos grupos carbonila. Durante a caracterização da luteolina outros autores encontraram as mesmas identificações nas bandas de FTIR (BENDER et al., 2020; CAPUA et al., 2017).

Os espectros das partículas micronizadas apresentaram bandas correspondentes aos mesmos números de onda apresentados no espectro da luteolina não-micronizada. Este resultado indica que o processo de micronização não degradou a luteolina durante o processo.

4.2.6 Análise de difração de raios X pelo método do pó (DRXP)

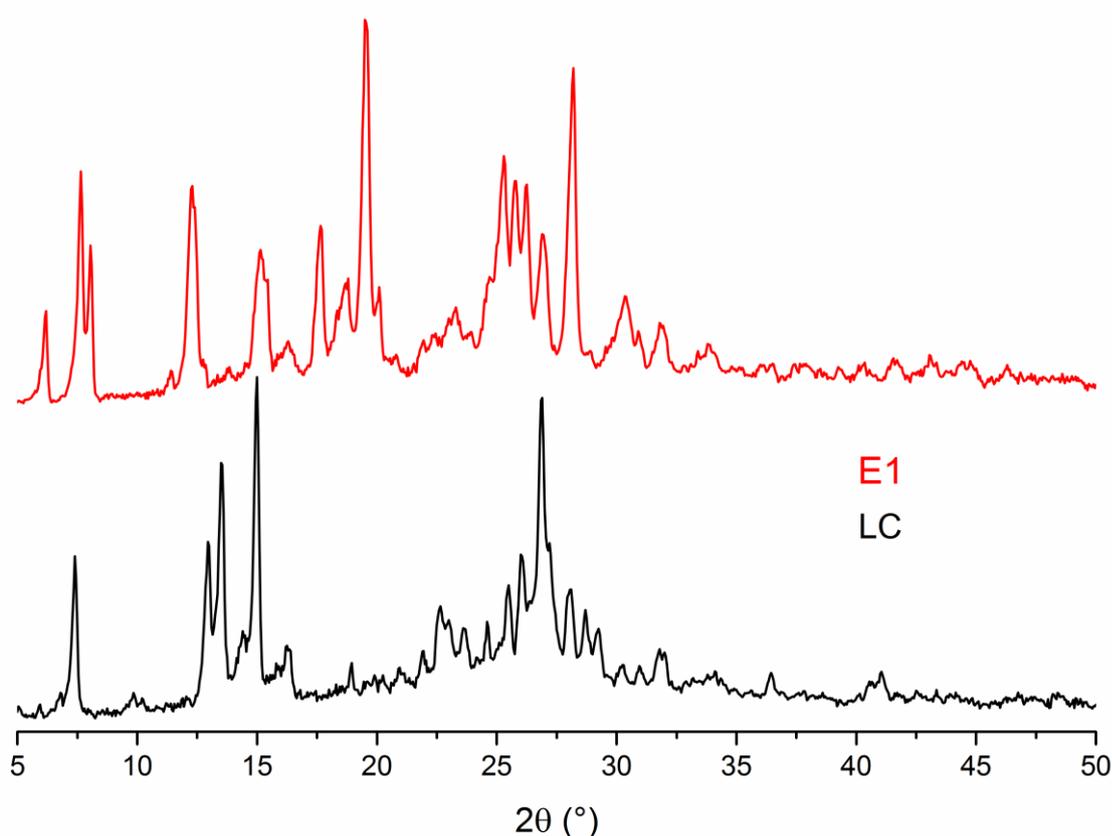
Considerando os resultados de microscopia, sessão 4.2.1, e tamanho de partícula, sessão 4.2.2, as análises de difração de raios-X (DRXP) foram realizadas nas amostras de luteolina, submetida a condição experimental 1 e também da luteolina não-micronizada, como referência para comparação na modificação da estrutura cristalina. Os difratogramas estão apresentados na **Figura 10**.

Devido a estrutura cristalina da luteolina (DI CAPUA; ADAMI; REVERCHON, 2017; SHAKEEL et al., 2018; WANG et al., 2019a) os parâmetros de processo (temperatura, pressão e vazão do antissolvente), podem não ter grande influência na morfologia externa, mas influenciam na maneira com que a partícula micronizada é rearranjada internamente, podendo haver ou não mudança no grau de cristalinidade ou na formação de um polimorfo (BLAGDEN et al., 2007; GIRON, 1995), levando a mudanças nas suas propriedades, como sua solubilidade.

Os padrões de DRXP da luteolina não-micronizada apresentaram reflexos de cristalinidade em 2θ igual a 6,88, 13,56, 13,84, 14,76 e 26,87 conforme observado por outros autores (CAPUA et al., 2017; DI CAPUA; ADAMI;

REVERCHON, 2017; WANG et al., 2019a). Observa-se mudanças no padrão de picos apresentados pelo composto não-micronizada e micronizado. O padrão DRXP das partículas micronizadas mostrou uma mudança no ângulo dos picos em comparação com a amostra não-micronizada, e também aparecimento de novo pico em um ângulo de 19,50. Além disso, houve diminuição da intensidade dos picos característicos de cristalinidade da luteolina não-micronizada em 2θ de 14,76 e 26,87, conferindo menor cristalinidade e tornando mais biodisponível (CHENG et al., 2016).

Figura 10 - Difração de raio X de pó da luteolina não-micronizada e micronizada por GAS na condição experimental 1.



Legenda: (LC) Luteolina não-micronizada 98% e (E1) Luteolina micronizada por GAS a 35 °C e 80 bar, ensaio 1.

Diferenças de deslocamento, aparecimento/desaparecimento de picos nos ângulos, representa formação polimorfo do composto, pois foram formados em

diferentes padrões de DRXP (AGUIAR et al., 2016; CHENG et al., 2016; REVERCHON; MARCO; TORINO, 2007). Os resultados dos difratogramas de raios X corroboram os resultados obtidos pelo DSC, os quais indicaram alteração na estrutura cristalina das partículas.

4.3 DISSOLUÇÃO, SOLUBILIDADE

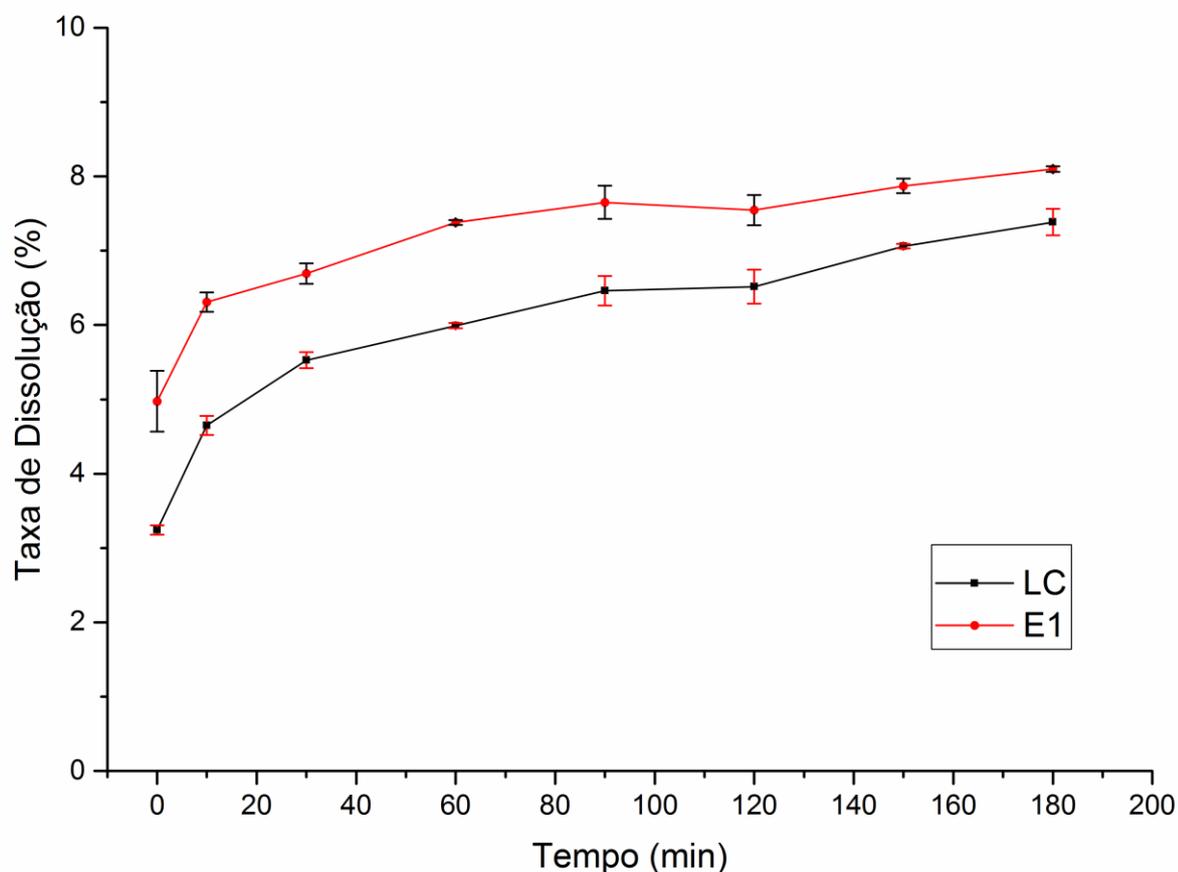
4.3.1 Dissolução

A taxa de dissolução da luteolina foi realizada utilizando a partícula não-micronizada e a micronizada na condição experimental 1, escolhida de acordo com o tamanho de partícula e sua atividade antioxidante. A **Figura 11** apresenta a taxa de dissolução da luteolina dissolvida em função do tempo

Observa-se um aumento na taxa de dissolução das partículas micronizadas em comparação a luteolina não-micronizada, desde o ponto inicial quando a luteolina micronizada dissolveu quase o dobro que a luteolina não-micronizada, 4,97 e 3,24 %, respectivamente. Verifica-se também uma taxa mais constante de liberação do ponto inicial até o 4º ponto de coleta (0 e 60 min). Aos 30 min a dissolução cumulativa da luteolina micronizada foi de 6,69%, um valor próximo a esse só foi alcançado pela luteolina não-micronizada aos 120 min (6,88%). Esses valores mostram o aumento na taxa de dissolução da luteolina após o processo de micronização.

Outros autores citam resultado semelhante, como Cheng et al. (2016) na micronização por CO₂ supercrítico constataram que as menores partículas foram responsáveis por um aumento na taxa de dissolução do etoposídeo em aproximadamente 4 vezes e Aguiar et al. (2018) na micronização por SEDS também observaram um aumento na taxa de dissolução do fármaco após passar pelo processo, obtendo dissolução do composto processado de 1,8 vezes frente ao composto bruto no tempo de 180 min.

Figura 11 - Dissolução em água a $37 \pm 0,5$ °C com agitação orbital de 100 rpm para luteolina não-micronizada e micronizada.



Legenda: (LC) Luteolina não-micronizada 98% e (E1) Luteolina micronizada por GAS a 35 °C e 80 bar, ensaio 1.

A partícula de luteolina não-micronizada após um intervalo de 180 min apresentou dissolução cumulativa de 7,38%, esse mesmo valor foi apresentado na dissolução das partículas micronizadas em 60 min. A equação de *Noyes-Whitney*, diz que, a taxa de dissolução de um fármaco é diretamente proporcional à área superficial exposta ao meio de dissolução (NOYES; WHITNEY, 1897), assim a taxa de dissolução acelerada das micropartículas de luteolina pode ser atribuída à diminuição do tamanho de partícula. Além da diminuição do tamanho de partícula, o grau de cristalinidade menor encontrado para a luteolina micronizada em comparação à não-micronizada (como demonstrado nos resultados de DSC e DRXP) pode ter grande influência na dissolução e solubilidade, visto que quanto maior o grau de cristalinidade de uma substância, maior a energia necessária para

desfazer essa rede cristalina (CERREIA VIOGLIO; CHIEROTTI; GOBETTO, 2017; DAL MAGRO et al., 2021; DOUROUMIS; ROSS; NOKHODCHI, 2017; WÜNSCHE et al., 2021). Assim, amostras com grau de cristalinidade menor, tendem a apresentar melhor dissolução. Da mesma forma, diferentes estruturas cristalinas (polimorfos) apresentam perfis de dissolução e solubilidades diferentes, que se relacionam também ao grau de estabilidade destes polimorfos (RESENDE et al., 2016).

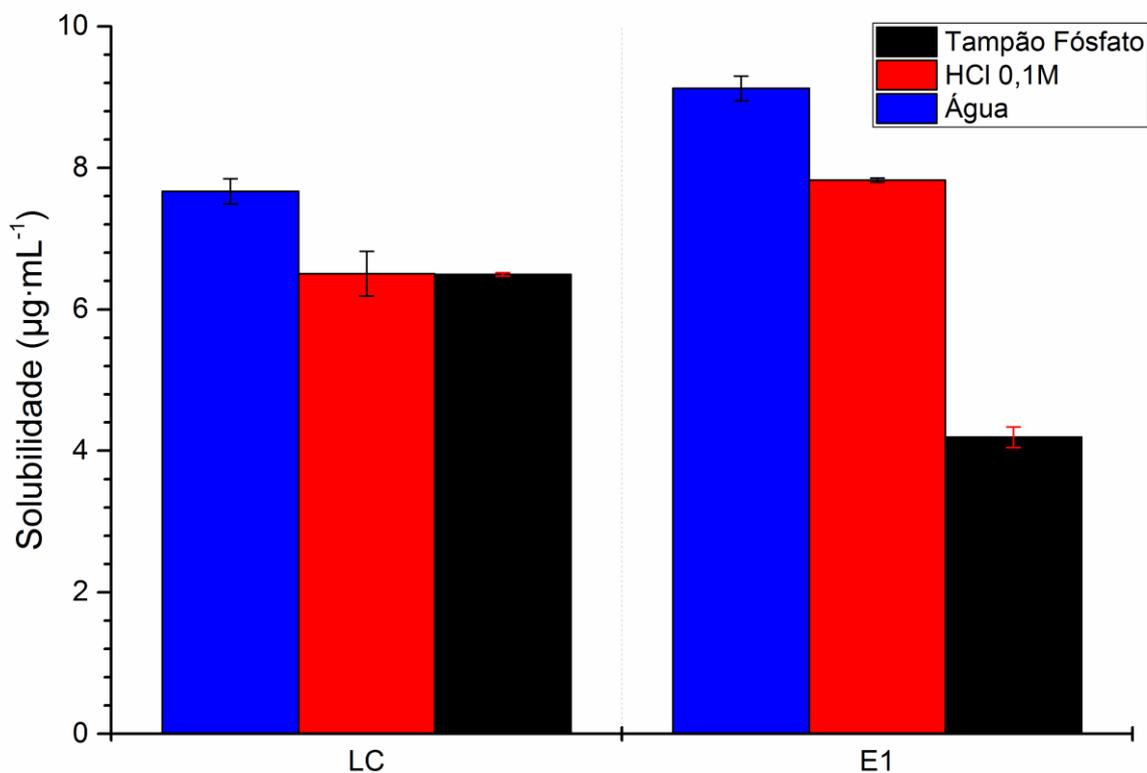
O processo de micronização por GAS produziu partículas de luteolina com perfil de dissolução semelhante ao da luteolina não-micronizada, sendo os valores da micronizada maiores para todos os pontos (mais ou menos com mesma proporção). A análise foi finalizada aos 180 min pois, foi mostrado certo equilíbrio de dissolução e considerando que compostos fenólicos são absorvidos e sintetizados pelo organismo em tempos inferiores a 2 h, sendo secretados, assim os compostos podem até ser permeados ao interior das células, no entanto sua atividade biológica já não é mais exercida, (MONACH et al., 2004).

4.3.2 Solubilidade

Os resultados de solubilidade da luteolina não-micronizada e micronizada em água, tampão fosfato e solução de HCl 0,1 M são mostrados na **Figura 12**.

A solubilidade da luteolina na água aumentou de $7,68 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para $9,13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da amostra não-micronizada para micronizada, ensaio 1, esse resultado pode ser devido à redução no tamanho da partícula e alteração na estrutura cristalina, possibilitando uma melhor solubilização no meio. Wang et al. (2019a) encontrou aumento na solubilidade da luteolina após processo de formação de nanopartículas em emulsão por precipitação antissolvente à baixa pressão, o resultado do aumento na solubilidade foi atribuído à diminuição do tamanho de partícula.

Figura 12 – Solubilidade das partículas em diferentes meios a $37 \pm 0,5$ °C com agitação orbital de 100 rpm, para luteolina não-micronizada e micronizada.



Legenda: (LC) Luteolina não-micronizada 98% e (E1) Luteolina micronizada por GAS a 35 °C e 80 bar, ensaio 1.

Observando a solubilidade na água e no meio ácido (pH 1,1) pode ser verificado aumento da solubilidade da luteolina. No meio contendo PBS (pH 6,8) a partícula micronizada apresentou menor solubilidade, como é sabido o pKa representa a relação de dissociação de um composto, estando relacionado com a tendência da substância se comportar como ácido ou base (semelhante aos valores de pH). Por apresentar pKa 7,06 (LEMAŃSKA et al., 2004) quando inserida em uma solução com pH igual ou menor que 7, a luteolina tende a se comportar como base, então ela não vai querer se dissociar, o que dificulta a solubilização, já quando está num pH maior que 7, ela vai ser mais "ácida" que o meio e vai querer dissociar, favorecendo a solubilização (RESENDE et al., 2016). No entanto, a luteolina acaba não se dissociando parcial ou completamente, pois a interferência dos íons das soluções simuladas e ácidos interagem no processo causando interferência na ação de solubilização e assim não atuando biologicamente (PENG et al., 2021), que é

também resultado da instabilidade dos flavonoides frente à mudança de pH (MONACH et al., 2004). O valor de solubilidade está de acordo com o previsto pelas análises de dissolução. Estes resultados condizem com o resultado encontrado nas análises de DRX e DSC, provando que o processo de micronização causou na modificação da estrutura cristalina por possível formação de polimorfo amorfo, que resultou no melhoramento da solubilidade e dissolução da luteolina.

Outros autores também encontraram resultados de comportamento semelhantes aos encontrados neste trabalho, como Zhang et al. (2020) em experimento de micronização de α -quitina por moagem superfina (SFG) obtendo amorfização e maior solubilização em solução de NaOH a 10%, Aguiar et al. (2018) na micronização de trans-resveratrol por SEDS conseguiu aumentar a solubilidade em água cerca de 2,8 vezes, Chau et al. (2007), no estudo de diferentes métodos de micronização para melhorar a funcionalidade da fibra insolúvel e Sefrin Speroni et al. (2021) na micronização de frações de bagaço de azeitona por moinho de bolas planetário de alto impacto aumento da liberação de compostos fenólicos passando da fase salivar para a fase gástrica da digestão. Nesses trabalhos citados, a solubilidade do composto alvo foi aumentada após o processamento.

O aumento da solubilidade da luteolina é de grande importância tanto para aplicações farmacêuticas como em indústrias alimentícias, pois a baixa solubilidade do composto ainda é uma tarefa desafiadora limitando suas aplicações biomédicas ou como suplementação nutracêutica.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Neste capítulo é apresentada uma síntese do trabalho com os principais resultados, na sequência são sugeridas pesquisas de continuidade.

5.1 Considerações gerais

O processo GAS empregado para micronização da luteolina pode ser considerado como bem-sucedido, pois implicou na redução de 10 vezes o tamanho de partícula após o processamento, realizado nas menores temperatura e pressão (respectivamente, 35 °C e 80 bar). A análise de MEV, com o auxílio do Sizer Meter comprovaram a diminuição do tamanho de partícula e modificação na sua morfologia, isso pode gerar diversos benefícios, como aumento da dissolução aquosa e biodisponibilidade, uma vez que estes são fatores que restringem a aplicação clínica da luteolina. A modificação na sua estrutura foi confirmada pelas análises de DRX e DSC, apresentando nova estrutura cristalina após o processamento. A análise de FTIR comprovou a não degradação da luteolina após o processamento. A atividade antioxidante melhorou cerca de 80%, e a luteolina micronizada apresentou maior solubilidade em meio aquoso que a luteolina não-micronizada, isso indica uma importante mudança na redução da oxidação lipídica dos tecidos. O processo de micronização proporcionou um aumento na taxa de dissolução. Além disso, uma maior solubilidade pode fornecer maior biodisponibilidade do composto.

Os resultados de micronização da luteolina são promissores, possibilitando abrangência das aplicações dessa flavona tanto na indústria farmacéutica, como na indústria alimentícia, visto que a maior barreira nas aplicações industriais é devido a sua baixa solubilidade em soluções aquosas, o que provoca baixa biodisponibilidade.

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho levam à conclusão de que a micronização por fluido supercrítico utilizando a técnica GAS mostra-se uma ótima alternativa para aumentar a solubilidade e velocidade de dissolução de compostos bioativos, além de modificações da estrutura cristalina acarretando melhoras nas atividades biológicas. Tais resultados abrem novas possibilidades para a micronização por fluido supercrítico, do ponto de vista científico e tecnológico, tanto para indústria farmacêutica, quanto para a indústria alimentícia, uma vez que a solubilidade e a biodisponibilidade são fatores limitantes tornando o uso de alguns compostos inviável em certos casos.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Devido a não identificação de uma variável de operação influente na redução de tamanho das partículas, seria interessante estudar outros fatores do processo, como por exemplo a vazão de CO₂ injetada na câmara de precipitação, concentração da solução, ou até mesmo aplicação de outras técnicas de micronização por tecnologia supercrítica. Aplicação da tecnologia GAS em outros compostos de interesse industrial que apresentem baixa solubilidade em meio aquoso e baixa biodisponibilidade *in vivo*.

Em relação às partículas, vale o esforço de estudar a estabilidade térmica das mesmas e tempo de armazenamento do composto; modelar matematicamente os perfis de dissolução da luteolina que contemple as representações adequadas dos mecanismos envolvidos no processo; realizar estudos de liberação *in vitro* em meios simuladores de digestão, com o uso de saliva, sucos gástrico, duodenal e bile, formulados a partir de sais, ácidos e enzimas, de modo a conhecer o comportamento das partículas nestes sistemas; avaliar a aplicação das partículas em formulações de iogurtes para verificar a estabilização das partículas e funcionalização da atividade antioxidante; realizar estudos *in vivo* de diferentes espécies para verificar a reprodutibilidade dos resultados observados *in vitro*.

CAPÍTULO 6 – PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DECORRENTE DA EXECUÇÃO DESTA TESE

6 PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DECORRENTE DA EXECUÇÃO DESTE TRABALHO

O referente capítulo apresenta a produção técnico-científica decorrente (direta ou indiretamente) da execução do trabalho de doutorado, relacionando artigos publicados e submetidos em revistas científicas. Alguns trabalhos citados aqui não fazem parte do corpo do documento de tese, mas foram realizados em paralelo e têm fundamental importância no desenvolvimento profissional e acadêmico.

6.1 Trabalhos publicados em periódicos

- C. Dal Magro, **A.E. dos Santos**, M.M. Ribas, G.P.S. Aguiar, C.R.B. Volfe, M.L.L.C. Lopes, A.M. Siebel, L.G. Müller, A.J. Bortoluzzi, M. Lanza, J.V. Oliveira, Production of curcumin-resveratrol cocrystal using cocrystallization with supercritical solvent, J. Supercrit. Fluids. 171 (2021) 105190. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105190>.

- G.S.B. Sakata, M.M. Ribas, C.D. Magro, **A.E. dos Santos**, G.P.S. Aguiar, J.V. Oliveira, M. Lanza, Encapsulation of trans-resveratrol in poly(ϵ -caprolactone) by GAS antisolvent, J. Supercrit. Fluids. 171 (2021) 105164. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105164>.

- C. Garbinato, C.A. Lima-Rezende, S.E. Schneider, J. Pedroso, **A.E. dos Santos**, F. Petry, G.P.S. Aguiar, L.G. Müller, M. Lanza, A. Piato, J. Vladimir Oliveira, A.M. Siebel, Investigation on the Anticonvulsant Potential of Luteolin and Micronized Luteolin in Adult Zebrafish (*Danio rerio*), Neurochem. Res. (2021). <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03409-8>.

- G.P.S. Aguiar, C.D. Magro, G.O. Carvalho, **A.E. Santos**, M. Lanza, J.V. Oliveira, Co-precipitation of anthocyanin in PHBV by the SEDS technique, J. Food Sci. Technol. (2020). <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04895-4>.

- M.M. Ribas, G.S.B. Sakata, **A.E. Santos**, C. Dal Magro, G.P.S. Aguiar, M. Lanza, J.V. Oliveira, Curcumin cocrystals using supercritical fluid technology, J. Supercrit. Fluids. 152 (2019) 104564. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104564>.

- C. Dal Magro, G.P.S. Aguiar, J.G. Veneral, **A.E. dos Santos**, L.M.P.C. de Chaves, J.V. Oliveira, M. Lanza, Co-precipitation of trans-resveratrol in PHBV using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids technique, J. Supercrit. Fluids. 127 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.025>.

6.2 Trabalhos aceitos para publicação em periódicos

- **A.E. dos Santos**, C. Dal Magro, L. B. Saturnino, G.P.S. Aguiar, J.V. Oliveira, M. Lanza. Micronization of luteolin using supercritical carbon dioxide: characterization of particles and biological activity in vitro. Journal Supercritical Fluids, aceite para publicação em 10 de novembro de 2021.

6.3 Trabalhos submetidos em periódicos

- Paulazzi, A. R.; Alves, B. O.; Zilli, G. A. L.; **Santos, A. E. dos**; Petry, F.; Soares, K. D.; Danielli, L. J.; Pedroso, J.; Apel, M. A.; Aguiar, G. P. S.; Siebel, A. M.; Oliveira, J. V.; Müller, L. G. Curcumin and n-acetylcysteine cocrystal produced with supercritical solvent: characterization, solubility, and preclinical evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities. Inflammopharmacology. **IPHM-D-21-00401**.

- S. Schneider, J. Pedroso, C. Lima-Rezende, **A.E. dos Santos**, G.P.S. Aguiar, L. G. Müller, M. Lanza, A. Piato, J.V. Oliveira, A. Siebel. Luteolin and micronized luteolin show anticonvulsant effects on pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish larvae, J. Neurochemical Research. **NERE-D-21-00775**.

REFERÊNCIAS

ADAMI, R. et al. Production of PEA composite microparticles with polyvinylpyrrolidone and luteolin using Supercritical Assisted Atomization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 143, n. July 2018, p. 82–89, 2019.

ADSCHIRI, T.; YOKO, A. Supercritical fluids for nanotechnology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 134, n. October 2017, p. 167–175, 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **RDC Nº 57, DE 17 DE NOVEMBRO DE 2009**, 2009.

AGUIAR, G. P. S. et al. Trans-resveratrol micronization by SEDS technique. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 350–355, out. 2016.

AGUIAR, G. P. S. et al. Micronization of N-acetylcysteine by supercritical fluid: Evaluation of in vitro and in vivo biological activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, n. April, p. 282–291, 2017.

AGUIAR, G. P. S. et al. Micronization of trans-resveratrol by supercritical fluid: Dissolution, solubility and in vitro antioxidant activity. **Industrial Crops & Products**, v. 112, n. November 2017, p. 1–5, 2018.

ALI, F. et al. Therapeutic potential of luteolin in transgenic Drosophila model of Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 692, n. September 2018, p. 90–99, 2019.

ALI, F.; SIDDIQUE, Y. H. Bioavailability and Pharmaco-therapeutic Potential of Luteolin in Overcoming Alzheimer's Disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 18, n. 5, p. 352–365, 2019.

AMIDON, G. L. et al. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. **Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

ANWAR, J.; ZAHN, D. Polymorphic phase transitions: Macroscopic theory and molecular simulation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 117, p. 47–70, 2017.

AZIZ, N.; KIM, M. Y.; CHO, J. Y. Anti-inflammatory effects of luteolin: A

review of in vitro, in vivo, and in silico studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 225, n. September 2017, p. 342–358, 2018.

BALDINO, L.; CARDEA, S.; REVERCHON, E. Supercritical Assisted Electrospray : An Improved Micronization Process. **Polymers**, v. 11, p. 244, 2019.

BENDER, A. B. B. et al. Effects of micronization on dietary fiber composition, physicochemical properties, phenolic compounds, and antioxidant capacity of grape pomace and its dietary fiber concentrate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 117, n. September 2019, 2020.

BEVILAQUA, G.; ROSA, P. D. T. V. E. Produção de micro e nanopartículas utilizando fluidos supercríticos. In: SOUSA, H. C. DE; BRAGA, M. E. M.; SOSNIK, A. (Eds.). . **Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados**. [s.l: s.n.].

BLAGDEN, N. et al. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 617–630, 2007.

BOEING, T. et al. Luteolin prevents irinotecan-induced intestinal mucositis in mice through antioxidant and anti-inflammatory properties. **British Journal of Pharmacology**, n. January, p. 1–16, 2020.

BRITTAİN, H. G. Polymorphism and Solvatomorphism 2010. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 101, n. 7, p. 2271–2280, 2012.

BRUNNER, G. **Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process**. [s.l: s.n.].

CAO, X. et al. Analysis of five active ingredients of Er-Zhi-Wan, a traditional Chinese medicine water-honeyed pill, using the biopharmaceutics classification system. **Biomedical Chromatography**, v. 34, n. 2, p. 1–11, 2020.

CAPUA, A. DI et al. Luteolin/dextran-FITC fluorescent microspheres produced by supercritical assisted atomization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, n. July, p. 97–104, 2017.

CAPUA, A. DI; ADAMI, R.; REVERCHON, E. Production of Luteolin/Biopolymer Microspheres by Supercritical Assisted Atomization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 56, p. 4334–4340, 2017.

CERREIA VIOGLIO, P.; CHIEROTTI, M. R.; GOBETTO, R. Pharmaceutical aspects of salt and cocrystal forms of APIs and characterization challenges.

Advanced Drug Delivery Reviews, v. 117, p. 86–110, 2017.

CHAU, C.; WANG, Y.; WEN, Y. Food Chemistry Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1402–1408, 2007.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH* assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 414–420, 2013.

CHENG, Y. et al. Micronization of etoposide using solution-enhanced dispersion by supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 115, p. 10–16, 2016.

CHOWDHURY, A. R. et al. Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. **Biochemical Journal**, v. 366, n. 2, p. 653–661, 2002.

COMMITTEE OF REVISION, U.; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, C.; COMMITTEE ON THE JAPANESE, P. **IMPURITIES: GUIDELINE FOR RESIDUAL SOLVENTS Q3C (R8)**. International Council for Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. **Anais...**2021

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

DAL MAGRO, C. et al. Production of curcumin-resveratrol cocrystal using cocrystallization with supercritical solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 171, n. October 2020, p. 105190, 2021.

DANG, H. et al. Luteolin-loaded solid lipid nanoparticles synthesis, characterization, & improvement of bioavailability, pharmacokinetics in vitro and vivo studies. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, 2014.

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

DE CAMPOS, L. M. A. S. et al. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8413–8420, 2008.

DI CAPUA, A. et al. Luteolin / dextran-FITC fluorescent microspheres produced by supercritical assisted atomization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, n. July, p. 97–104, 2017.

DI CAPUA, A.; ADAMI, R.; REVERCHON, E. Production of Luteolin/Biopolymer Microspheres by Supercritical Assisted Atomization. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 15, p. 4334–4340, 2017.

DOUROUMIS, D.; ROSS, S. A.; NOKHODCHI, A. Advanced methodologies for cocrystal synthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 117, p. 178–195, 2017.

DUHAN, J. S. et al. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. **Biotechnology Reports**, v. 15, n. December 2016, p. 11–23, 2017.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, n. 1, p. 1–24, 2011.

DURÁN, N. et al. Tecnologia de nanocristais em fármacos. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, p. 151–158, 2010.

FANG, C.-H. et al. Micronization of Three Active Pharmaceutical Ingredients Using the Rapid Expansion of Supercritical Solution Technology. **Chemical Engineering and Technology**, n. 00, p. 1–9, 2020.

FRANCESCHI, E. et al. Phase behavior and process parameters effects on the characteristics of precipitated theophylline using carbon dioxide as antisolvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 44, p. 8–20, 2008.

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

FRANCESCHI, E. et al. Co-Precipitation of Beta-Carotene and Bio-Polymer Using Supercritical Carbon Dioxide as Antisolvent. **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 4, p. 11–20, 2010.

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

FUENTE, J. C. DE LA; PETERS, C. J.; ARONS, J. DE S. Volume expansion in relation to the gas–antisolvent process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 17, p. 13–23, 2000.

GALEGO, F. I. F. **Contributo para o design de formas farmacéuticas: Polimorfismo e co-cristais do flavonóide luteolina.** [s.l.] Universidade de Coimbra, 2014.

GALLAGHER, P. M. et al. Gas Antisolvent Recrystallization : New Process To Recrystallize Compounds Insoluble in Supercritical Fluids. **Supercritical Fluid Science and Technology**, p. 334–354, 1989.

GIACOBBE, F. W. Thermodynamic solubility behavior of carbon dioxide in acetone. **Fluid Phase Equilibria**, v. 72, n. C, p. 277–298, 1992.

GIRON, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates. **Thermochimica Acta**, v. 248, n. C, p. 1–59, 1995.

GONG, N. et al. Purity assessment of luteolin reference material candidates by coulometric titration method. **Analytical Methods**, v. 5, p. 784–788, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 8, n. 2, p. 89–193, 1985.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. C, p. 1–85, 1990.

IMRAN, M. et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 112, n. September 2018, 2019.

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

JUPPO, A. M.; BOISSIER, C.; KHOO, C. Evaluation of solid dispersion particles prepared with SEDS. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 2, p. 385–401, 2003.

KANKALA, R. K. et al. Solution-enhanced dispersion by supercritical fluids : an ecofriendly nanonization approach for processing biomaterials and pharmaceutical compounds. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 4227–4245, 2018.

KHAN, J.; SARAF, S.; SARAF, S. Preparation and evaluation of luteolin-phospholipid complex as an effective drug delivery tool against GalN/LPS induced liver damage. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 21, n. 4, p. 475–

486, 2015.

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

LEMAŃSKA, K. et al. The effect of catechol O-methylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin - A mechanistic insight. **Free Radical Research**, v. 38, n. 6, p. 639–647, 2004.

LIU, H. et al. Effects of fisetin on oxaliplatin-induced neuropathic pain in mice. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 138–142, 2015a.

LIU, M. et al. Host–Guest Inclusion System of Luteolin with Polyamine- β -cyclodextrin: Preparation, Characterisation, Anti-oxidant and Anti-cancer Activity. **Australian Journal of Chemistry**, 2015b.

LIU, R. et al. The anti-amnesic effects of luteolin against amyloid β 25–35 peptide-induced toxicity in mice involve the protection of neurovascular unit. **Neuroscience**, v. 162, n. 4, p. 1232–1243, 2009.

LIU, Y. et al. Nanostructured lipid carriers versus microemulsions for delivery of the poorly water-soluble drug luteolin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 476, n. 1, p. 169–177, 2014.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 31–59, 2009.

LUO, Y. et al. Luteolin cocrystals: Characterization, evaluation of solubility, oral bioavailability and theoretical calculation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 50, n. September 2018, p. 248–254, 2019.

MADHESH, M.; VAIYAPURI, M. Effect of luteolin on lipid peroxidation and antioxidants in acute and chronic periods of isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Journal of Acute Medicine**, v. 2, n. 3, p. 70–76, 2012.

MADHESH, M.; VAIYAPURI, M. Luteolin a dietary flavonoid attenuates isoproterenol-induced myocardial oxidative stress in rat myocardium: An in vivo study. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, n. 2, p. 159–164, 2013.

MAJUMDAR, D. et al. Luteolin Nanoparticle in Chemoprevention : In Vitro and In Vivo Anticancer Activity. **Cancer Prevention Research**, n. 16, p. 65–74, 2014.

MANZOOR, M. F. et al. Novel extraction techniques and pharmaceutical

activities of luteolin and its derivatives. **Journal of Food Biochemistry**, n. April, p. 1–19, 2019.

MARCO, I. DE; REVERCHON, E. Influence of pressure, temperature and concentration on the mechanisms of particle precipitation in supercritical antisolvent micronization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 58, n. 2, p. 295–302, 2011.

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

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method . *Phytother Res* Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free. **PHYTOTHERAPY RESEARCH**, v. 15, n. August, p. 127–130, 2001.

MINATEL, I. O. et al. Phenolic compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. In: **Phenolic Compounds - Biological Activity**. [s.l: s.n.]. p. 1–24.

MONACH, C. et al. Polyphenols: Food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727–747, 2004.

MONTES, A. et al. Generation of microparticles of ellagic acid by supercritical antisolvent process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 116, p. 101–110, 2016.

NABAVI, S. F. et al. Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. **Brain Research Bulletin**, v. 119, p. 1–11, 2015.

NARBONA, E. et al. Polimorfismos de color floral : causas e implicaciones evolutivas. **Ecosistemas Revista Científica de Ecología Y Medio Ambiente**, v. 23, n. 3, p. 36–47, 2014.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Luteolina C15H10O6-PubChem**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280445>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

NOYES, A. A.; WHITNEY, W. R. The rate of solution of solid substances in their own solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 19, n. 12, p. 930–934, 1897.

ÖZGEN, U. et al. Relationship Between Chemical Structure and Antioxidant

Activity of Luteolin and Its Glycosides Isolated from *Thymus sipyleus* subsp . *sipyleus* var. *sipyleus*. **Records of Natural Products**, v. 1, p. 12–21, 2011.

PALAZZO, I. et al. Zein/luteolin microparticles formation using a supercritical fluids assisted technique. **Powder Technology**, v. 356, p. 899–908, 2019.

PAUL, D. K.; SAHA, R. K. **Nutrients, vitamins and mineral content in common citrus fruits in the northern region of Bangladesh** **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 2004.

PENG, B.; ZI, J.; YAN, W. Measurement and Correlation of Solubilities of Luteolin in Organic Solvents at Different Temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 51, p. 2038–2040, 2006.

PENG, M. et al. The roles of luteolin in peanut shell extract - Mediated protection of erythrocytes against hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity. **Food Bioscience**, v. 39, n. November 2020, p. 100826, 2021.

PESSOA, A. S. et al. Precipitation of resveratrol-isoniazid and resveratrol-nicotinamide cocrystals by gas antisolvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 145, n. November 2018, p. 93–102, 2019.

PINDELSKA, E.; SOKAL, A.; KOLODZIEJSKI, W. Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 117, p. 111–146, 2017.

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

PROSAPIO, V.; MARCO, I. DE; REVERCHON, E. Supercritical antisolvent coprecipitation mechanisms. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 138, n. May, p. 247–258, 2018.

RAMACHANDRAIAH, K.; CHIN, K. B. **Antioxidant, Antimicrobial, and Curing Potentials of Micronized Celery Powders added to Pork Sausages** **Food Science of Animal Resources**, 2021.

RASENACK, N.; MÜLLER, B. W. Micron-Size Drug Particles: Common and Novel Micronization Techniques. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2004.

RESENDE, R. C. DE et al. Analysis of spironolactone polymorphs in active pharmaceutical ingredients and their effect on tablet dissolution profiles. **Brazilian**

Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 52, 2016.

REVERCHON, E.; MARCO, I. DE. Mechanisms controlling supercritical antisolvent precipitate morphology. **Chemical Engineering Journal**, v. 169, n. 1–3, p. 358–370, 2011.

REVERCHON, E.; MARCO, I. DE; TORINO, E. Nanoparticles production by supercritical antisolvent precipitation: A general interpretation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 126–138, 2007.

REVISION, U. C. OF; COMMISSION, E. P.; PHARMACOPOEIA, C. ON THE J. **INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE**. Q3C: Impurities: Guideline for Residual Solvents. **Anais...**1995

RIBAS, M. M. et al. Curcumin cocrystals using supercritical fluid technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 152, p. 104564, 2019.

ROY, S. et al. Synthesis , characterisation and antioxidant activity of luteolin – vanadium (II) complex. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1172–1178, 2015.

RUFINO, M. DO S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SEFRIN SPERONI, C. et al. Micronization increases the bioaccessibility of polyphenols from granulometrically separated olive pomace fractions. **Food Chemistry**, v. 344, n. November 2020, 2021.

SHAKEEL, F. et al. Solubility, thermodynamic properties and solute-solvent molecular interactions of luteolin in various pure solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 255, p. 43–50, 2018.

SHIMOI, K. et al. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- β -glucoside in rats and humans. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters**, v. 438, n. 3, p. 220–224, 1998.

SOWA, M.; ŚLEPOKURA, K.; MATCZAK-JON, E. Cocrystals of fisetin, luteolin and genistein with pyridinecarboxamide cofomers: Crystal structures, analysis of intermolecular interactions, spectral and thermal characterization. **CrystEngComm**, v. 15, n. 38, p. 7696–7708, 2013.

TAGHI, M.; NAGHIZADEH, B.; GHORBANZADEH, B. Venlafaxine prevents

morphine antinociceptive tolerance: The role of neuroinflammation and the L-arginine-nitric oxide pathway. **Experimental Neurology**, v. 303, n. February, p. 134–141, 2018.

TAMBE, R. et al. Assessment of luteolin isolated from *Eclipta alba* leaves in animal models of epilepsy. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 264–268, 2016.

TEPELLI, F. Perspectives on the use of supercritical particle formation technologies for food ingredients. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 134, n. October 2017, p. 244–251, 2018.

TENORIO, A. et al. Relative Importance of the Operating Conditions Involved in the Formation of Nanoparticles of Ampicillin by Supercritical Antisolvent Precipitation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 114–123, 2007.

VASANTHA RUPASINGHE, H. P.; NAIR, S. V. G.; ROBINSON, R. A. Chemopreventive Properties of Fruit Phenolic Compounds and Their Possible Mode of Actions. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. v. 42p. 229–266.

VILLALVA, M. et al. Supercritical anti-solvent fractionation for improving antioxidant and anti-inflammatory activities of an *Achillea millefolium* L. extract. **Food Research International**, v. 115, n. May 2018, p. 128–134, 2019.

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

WANG, L. et al. Preparation and characterization of luteolin nanoparticles for enhance bioavailability and inhibit liver microsomal peroxidation in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 55, n. December 2018, p. 57–64, 2019a.

WANG, L. et al. Preparation and characterization of luteolin nanoparticles for enhance bioavailability and inhibit liver microsomal peroxidation in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 57–64, 2019b.

WANG, L. et al. Pickering emulsions stabilized by luteolin micro-nano particles to improve the oxidative stability of pine nut oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 4, p. 1314–1322, 2021.

WANG, Q. et al. Complexation of luteolin with lead (II): Spectroscopy characterization and theoretical researches. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 193, n. January, p. 25–30, 2019c.

WÜNSCHE, S. et al. A Contribution to the Solid State Forms of Bis(demethoxy)curcumin: Co-Crystal Screening and Characterization. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 720, 2021.

XU, K. et al. Physicochemical Properties and Antioxidant Activities of Luteolin-Phospholipid Complex. **Molecules**, v. 14, p. 3486–3493, 2009.

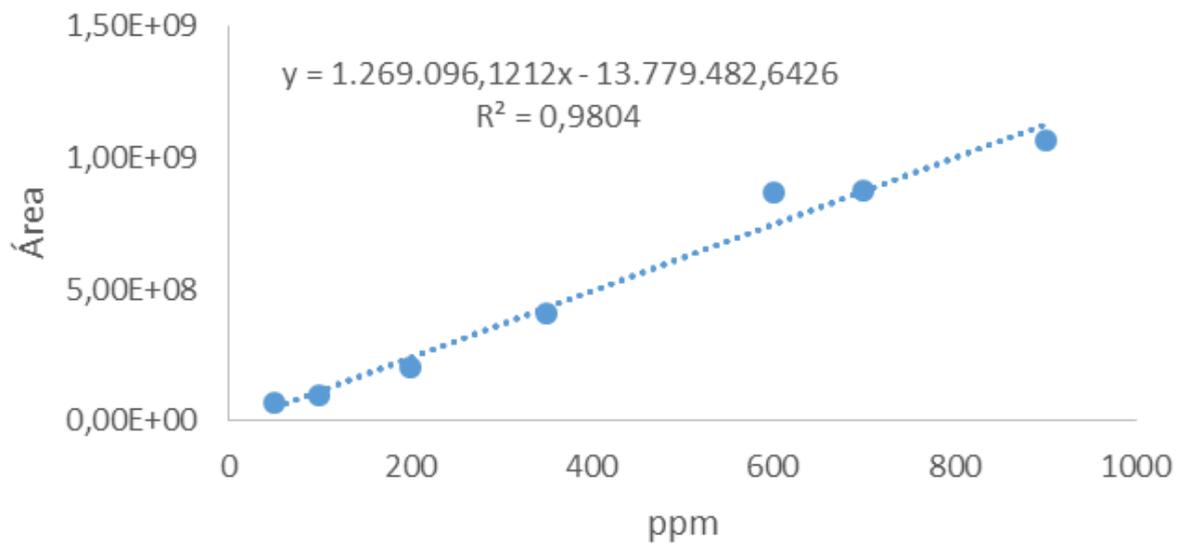
YAN, T. et al. Preparation, characterization and evaluation of the antioxidant capacity and antitumor activity of myricetin microparticles formed by supercritical antisolvent technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 175, n. December 2020, p. 105290, 2021.

ZHANG, W. et al. Superfine grinding induced amorphization and increased solubility of α -chitin. **Carbohydrate Polymers**, v. 237, n. March, p. 116145, 2020.

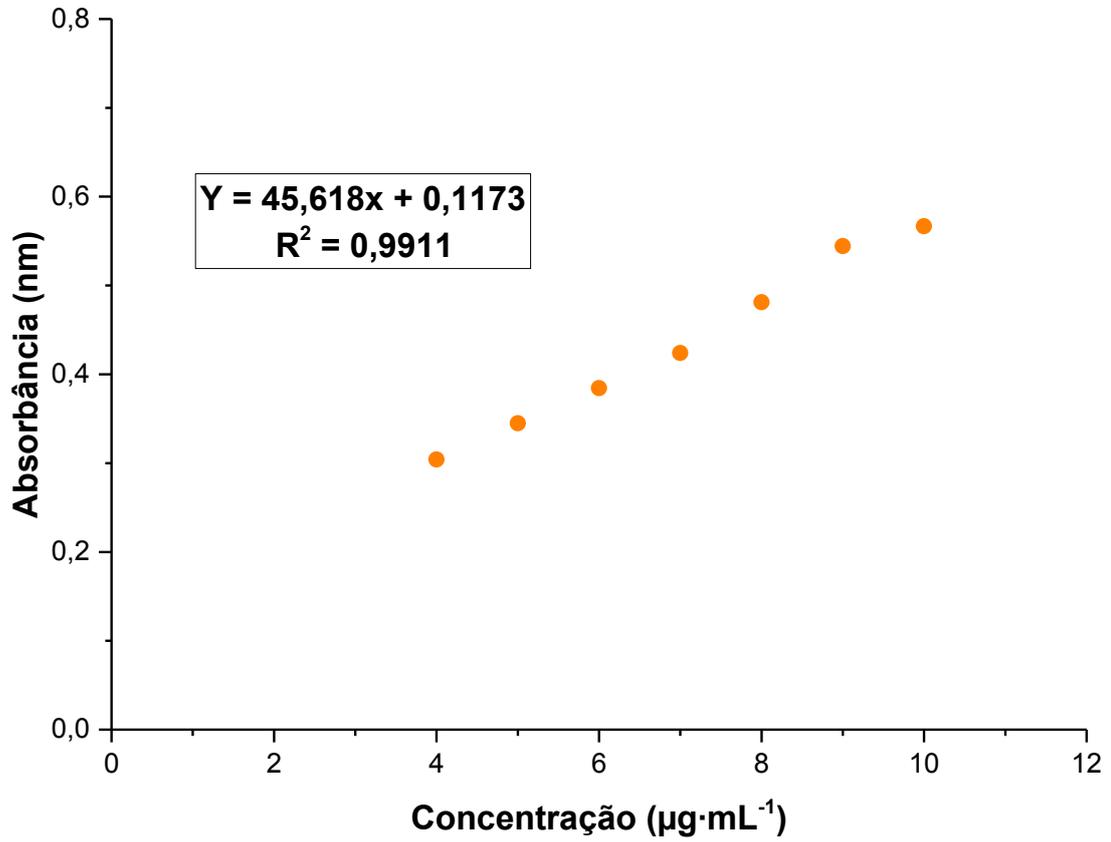
ZHAO, C. et al. Effect of raw material variability of glipizide on the in vitro dissolution rate and in vivo bioavailability performance: The importance of particle size. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 165–173, 2019.

ZHOU, P. et al. Enhanced phenolic compounds extraction from *Morus alba* L. leaves by deep eutectic solvents combined with ultrasonic-assisted extraction. **Industrial Crops & Products**, v. 120, n. November 2017, p. 147–154, 2018.

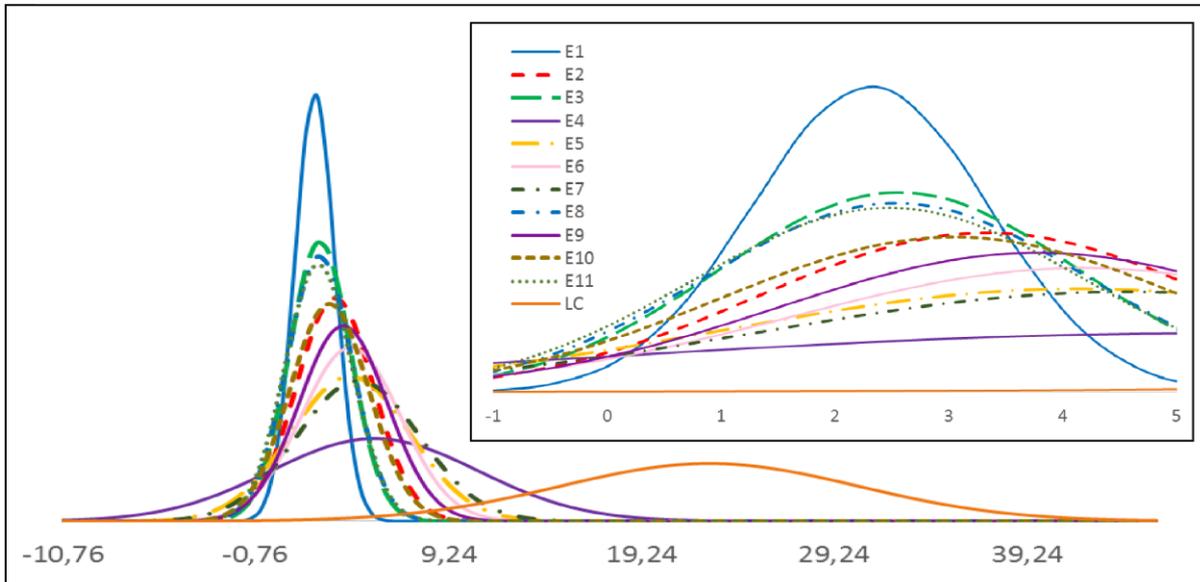
APÊNDICE A – Curva de calibração construídas a partir do CG - FID para quantificação de ppm residual de acetona



APÊNDICE B – Curva de calibração para determinação da concentração de luteolina



APÊNDICE C – Distribuição normal do tamanho de partícula da luteolina micronizada nos ensaios 1-11 e luteolina comercial



ANEXO A – Certificado de análise da amostra de luteolina



Active Pharmaceutica

IMPORTADORA E DISTRIBUIDORA DE INSUMOS FARMACÉUTICOS

CERTIFICADO DE ANÁLISES 19/19

INSUMO: **LUTEOLINA 98%**

NOME QUÍMICO: *4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-*

PESO MOLECULAR: 286,24 g/mol

FÓRMULA MOLECULAR: C₁₅H₁₀O₆

FABRICANTE: Kingherbs Limited

CAS: 491-70-3

NOME BOTÂNICO: *Arachis hypogaea L.*

PARTE UTILIZADA: Casca

SOLVENTE EXTRATOR: Etanol

ORIGEM: China

LOTE FABRICANTE: PSE-181107

LOTE PRODUÇÃO:

FABRICAÇÃO: 07/11/2018

VALIDADE: 06/11/2020

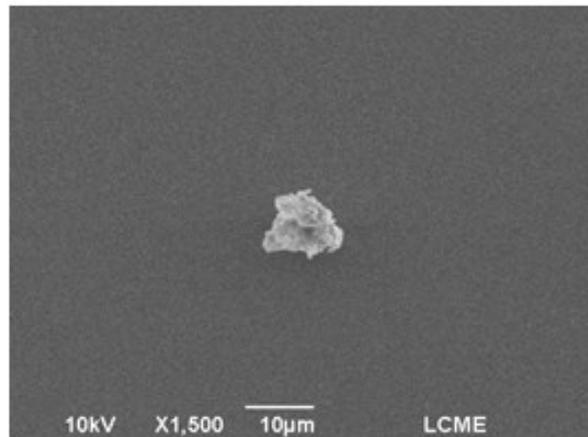
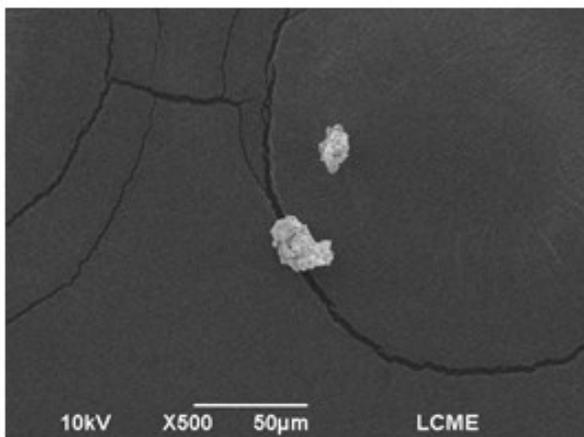
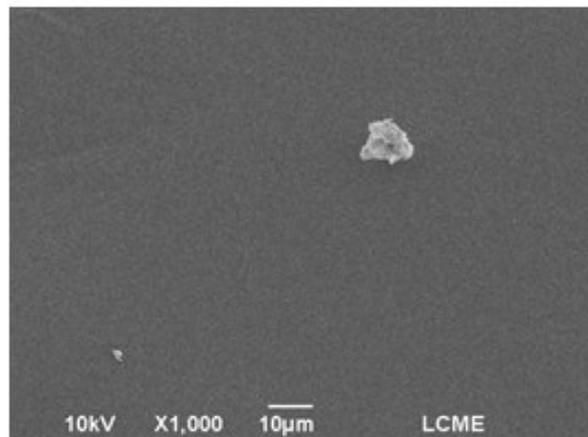
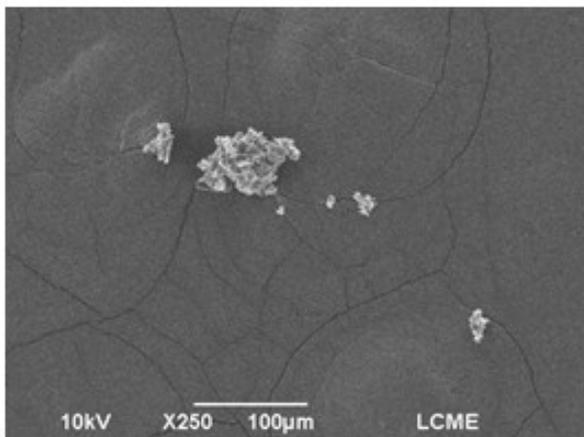
ANÁLISE	MÉTODO	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS	REFERÊNCIA
Descrição	Visual	Pó fino amarelo a verde claro	Conforme */**	Fabricante
Identificação	Fabricante	Positiva	Conforme**	Fabricante
Teor (base seca)	HPLC	≥ 98,0 %	98,33 %**	Fabricante
Densidade aparente	Densímetro* ASTM D1895B**	20 – 40 g/100 mL	20,5±0,1 g/100mL* Conforme**	Fabricante
Solubilidade	FB 5 <Solubilidade>	Insolúvel em etanol	Conforme */** Insolúvel em água*	Fabricante
Tamanho de partícula	AOAC 973.03	98% passa em malha 80	Conforme**	Fabricante
Perda por dessecação	5g/105°C/2h	≤ 2,0 %	1,28 %**	Fabricante
Cinzas sulfatadas	2g/525°C/3h	≤ 1,0 %	0,66 %**	Fabricante
Metais pesados	Abs. atômica	≤ 10 ppm	< 10 ppm**	Fabricante
Chumbo	Abs. atômica	≤ 1 ppm	Conforme**	Fabricante
Arsênio	Abs. atômica	≤ 1 ppm	Conforme**	Fabricante
Cádmio	Abs. atômica	≤ 0,5 ppm	Conforme**	Fabricante
Resíduo de etanol	USP – CG	Eur.Pharm	Conforme**	Eur.Pharm
666	USP – CG	≤ 0,2 ppm	Conforme**	Fabricante
DDT	USP – CG	≤ 0,5 ppm	Conforme**	Fabricante
Acefato	USP – CG	≤ 0,2 ppm	Conforme**	Fabricante
Metamidofós	USP – CG	≤ 0,2 ppm	Conforme**	Fabricante
Etil-Paration	USP – CG	≤ 0,2 ppm	Conforme**	Fabricante
PCNB	USP – CG	≤ 0,1 ppm	Conforme**	Fabricante
Aflatoxinas	USP - HPLC	≤ 0,5 ppm	Conforme**	Fabricante
Contagem total de bactérias aeróbias	FB 5 <5.5.3.1.2>	< 1000 UFC/g	Conforme*	FB 5
Fungos e leveduras	FB 5 <5.5.3.1.2>	< 100 UFC/g	Conforme*	FB 5
<i>E. coli</i>	FB 5 <5.5.3.1.3>	Ausente	Conforme*	FB 5
<i>Salmonella</i>	FB 5 <5.5.3.1.3>	Ausente	Conforme*	FB 5

*Resultado obtido no Laboratório de Controle de Qualidade Active Pharmaceutica.

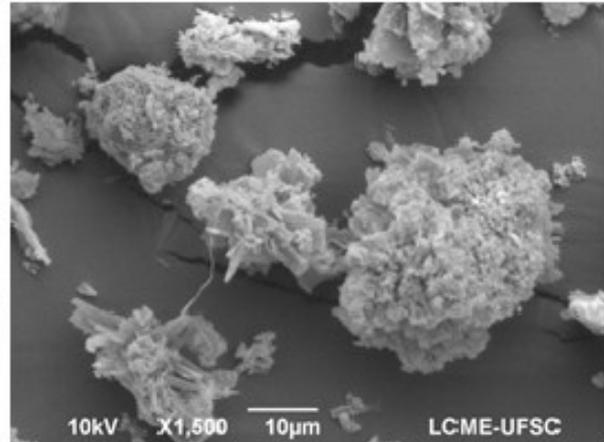
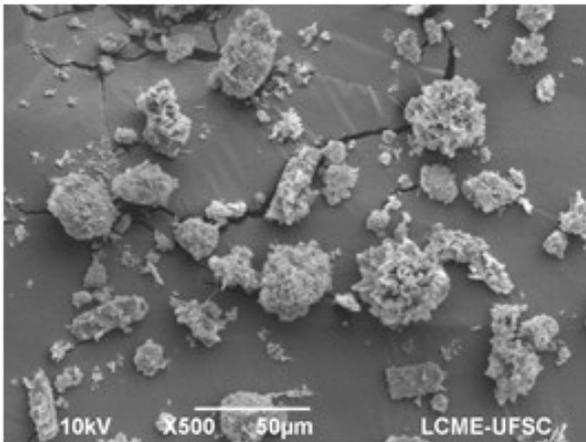
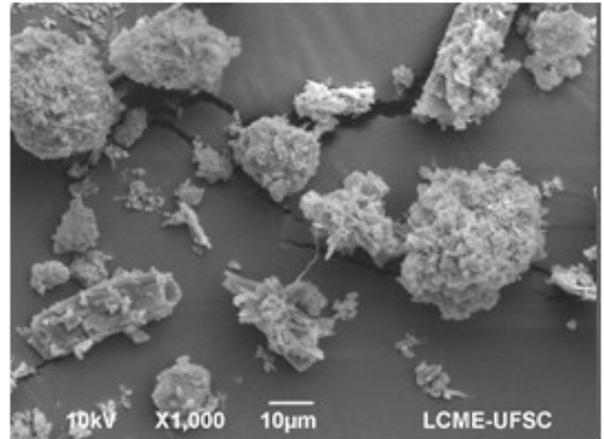
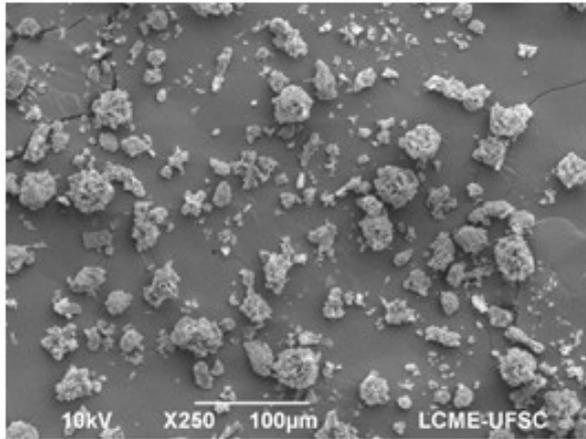
**Resultado transcrito conforme laudo original do fabricante

ANEXO B – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura usadas para medir o Dp de partículas produzidas por GAS e luteolina comercial

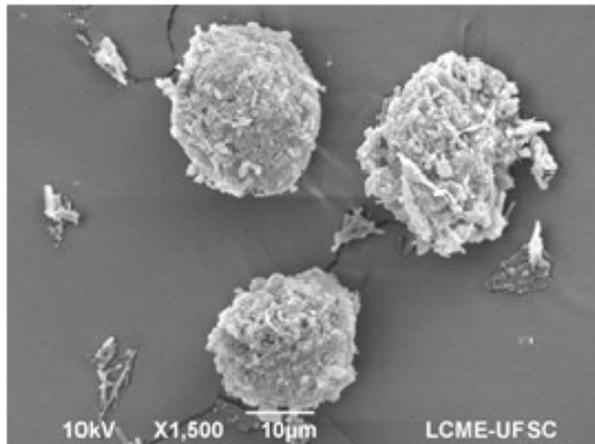
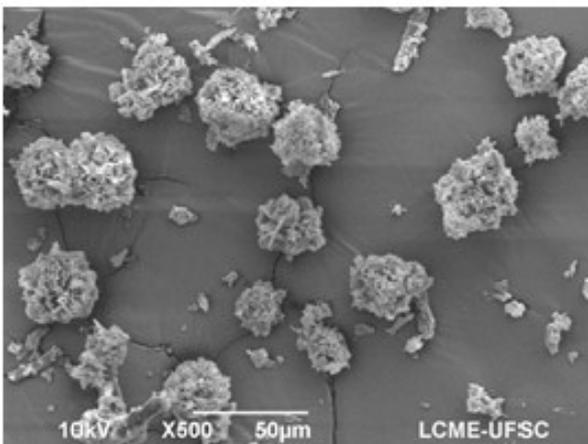
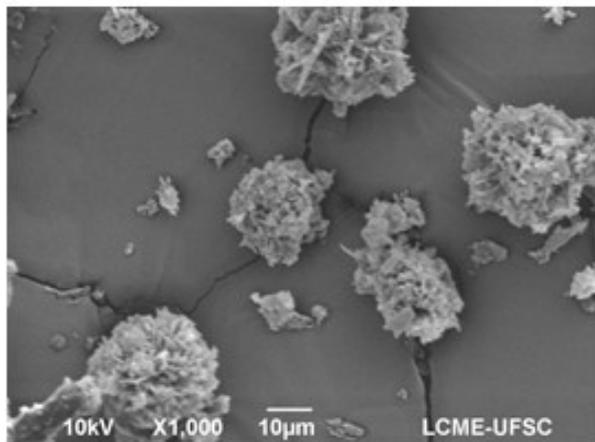
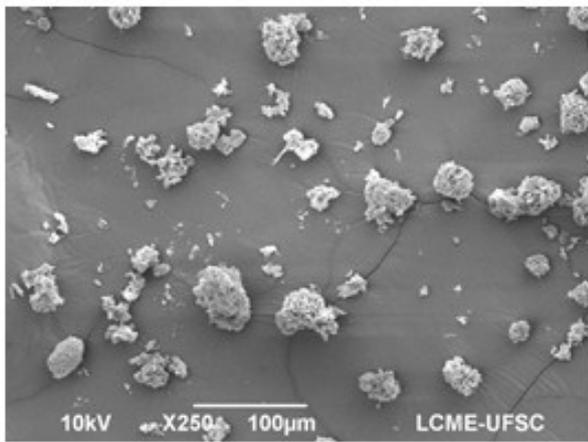
E1



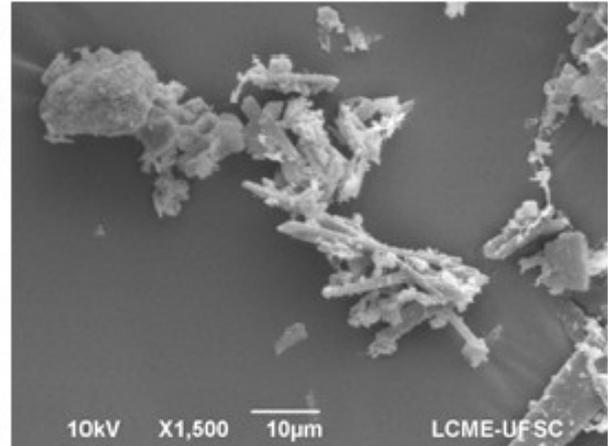
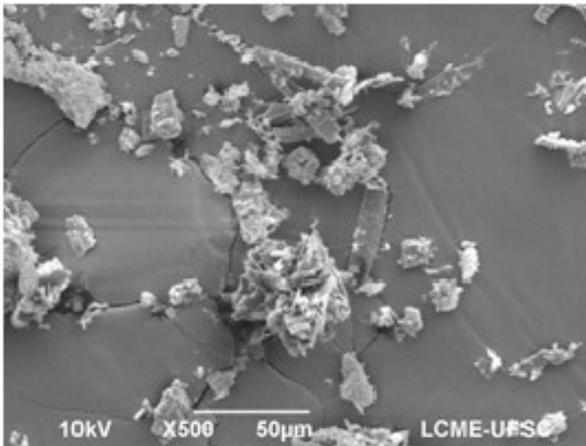
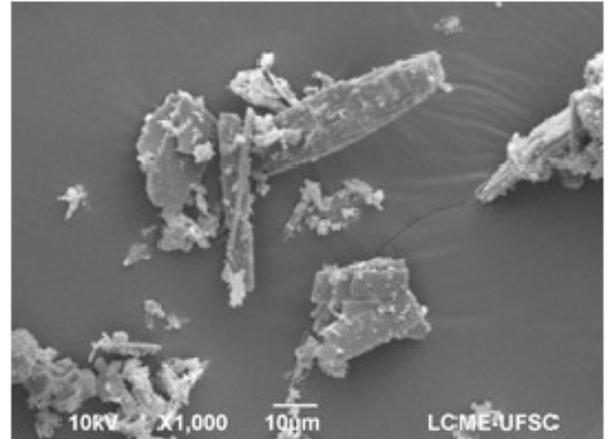
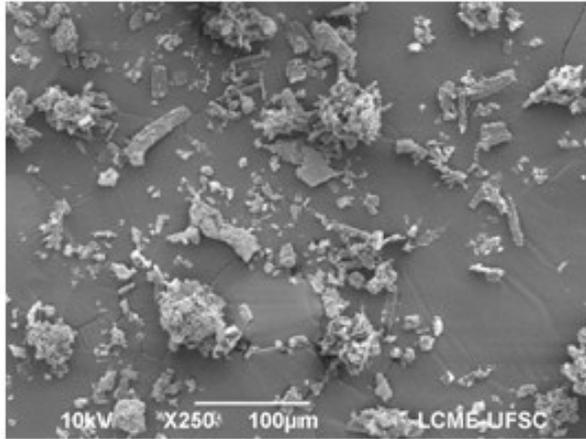
E2



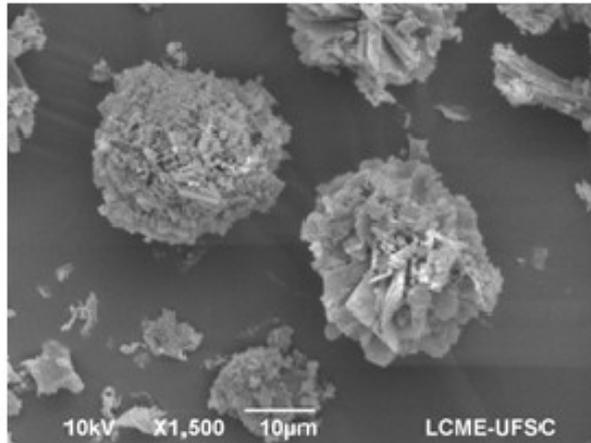
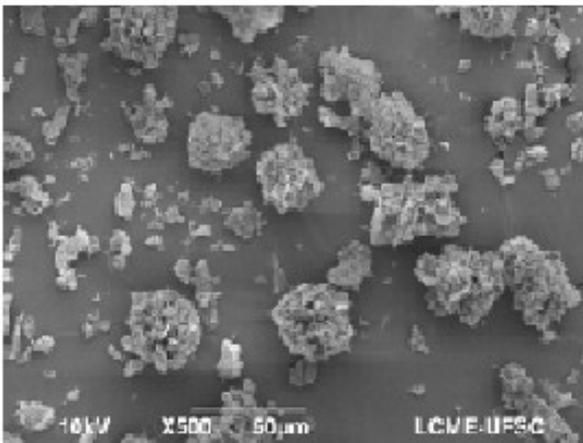
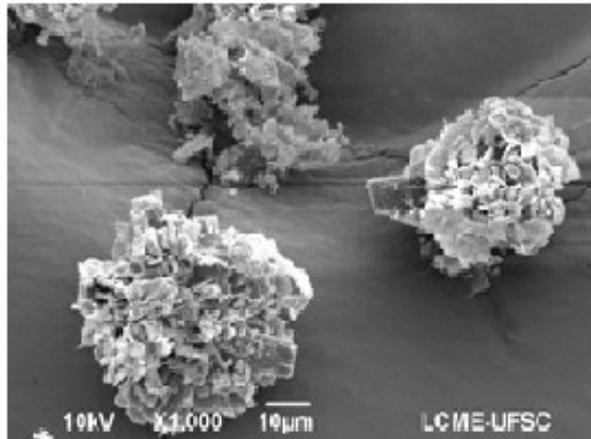
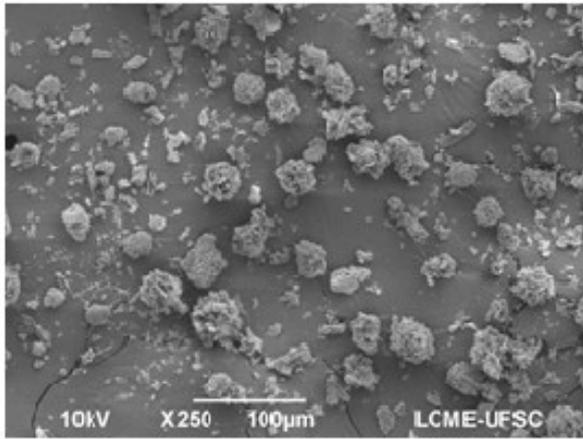
E3



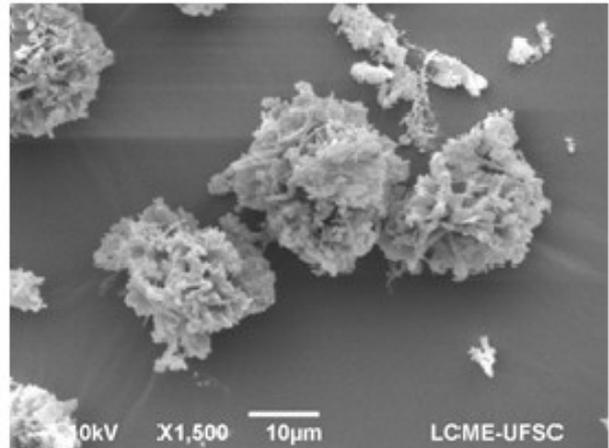
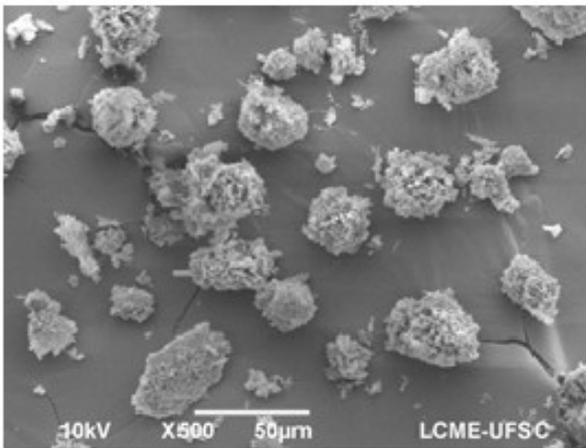
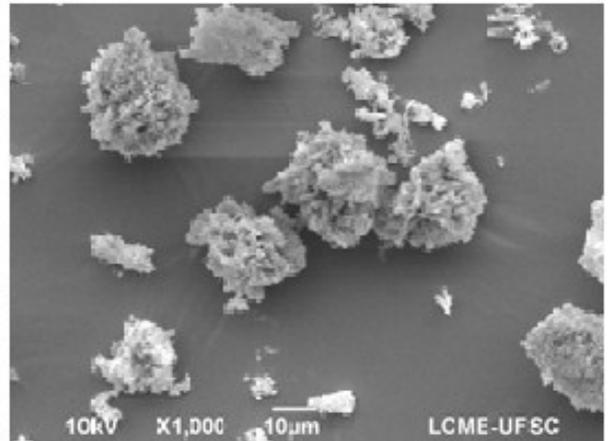
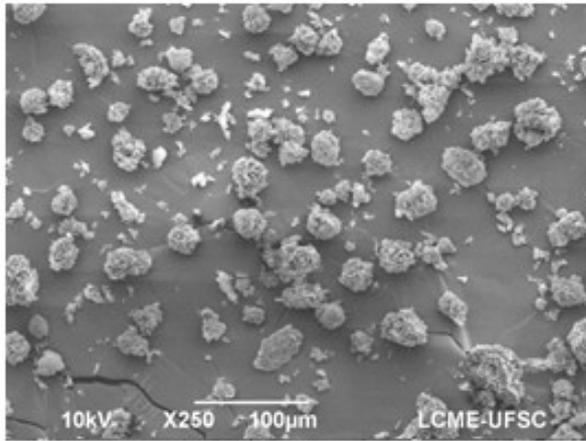
E4



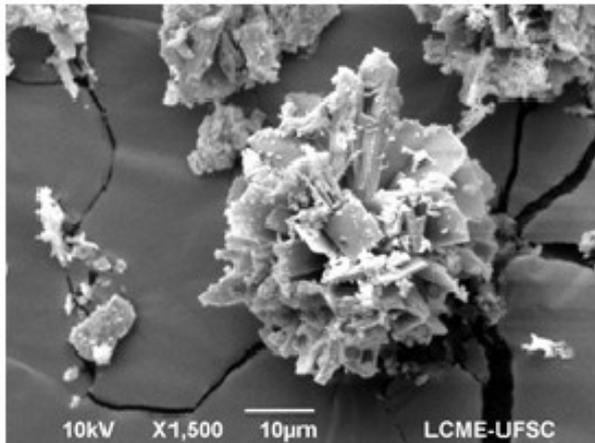
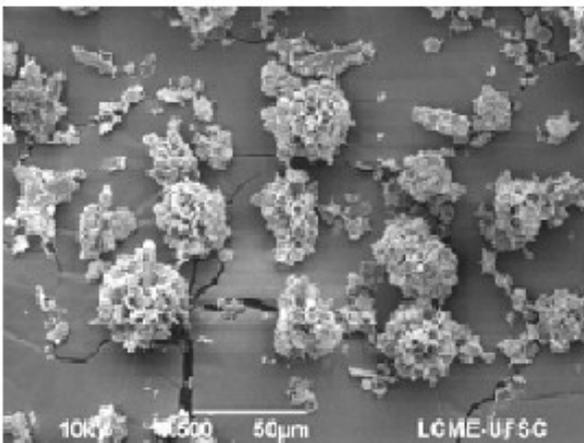
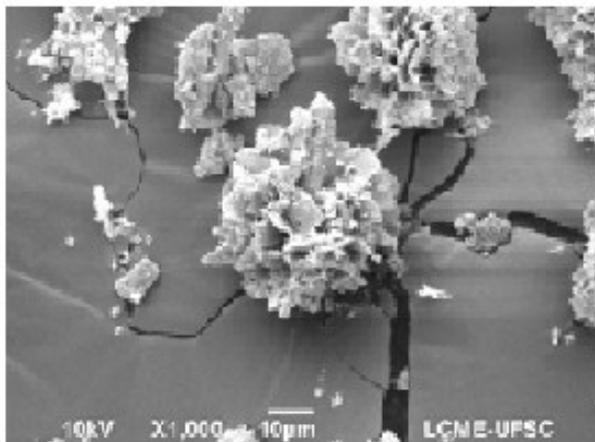
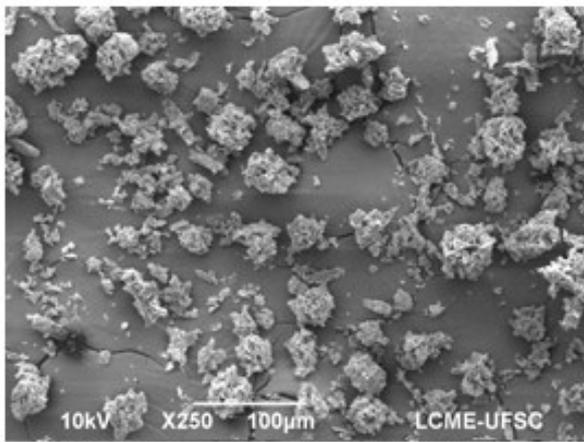
E5



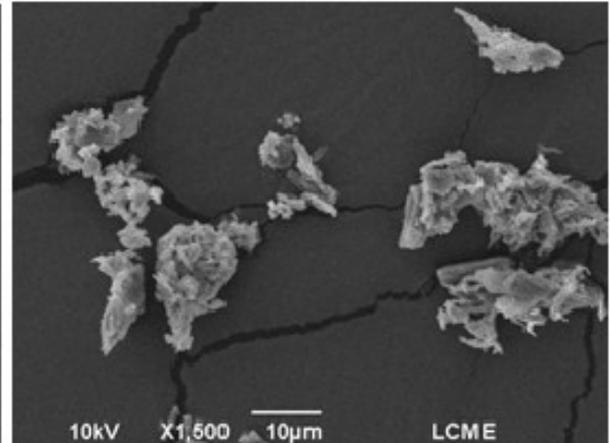
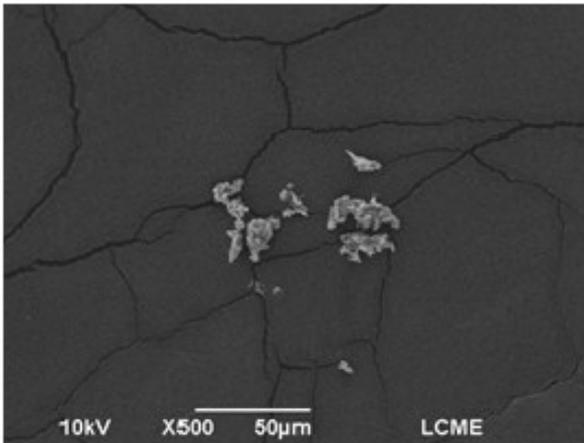
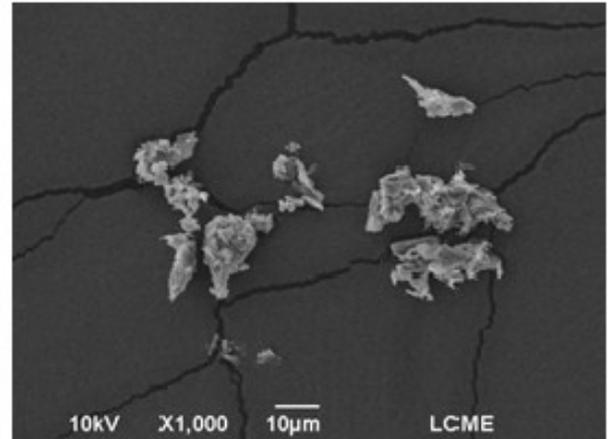
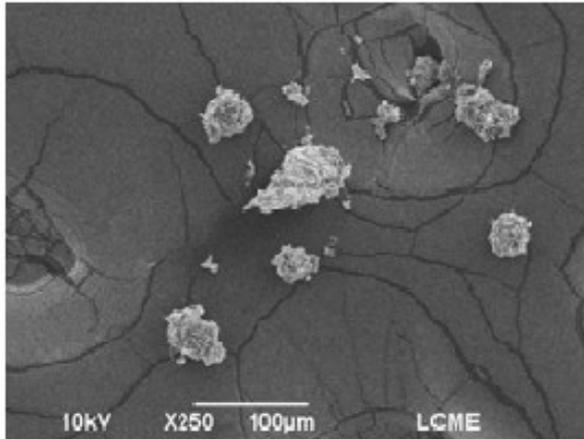
E6



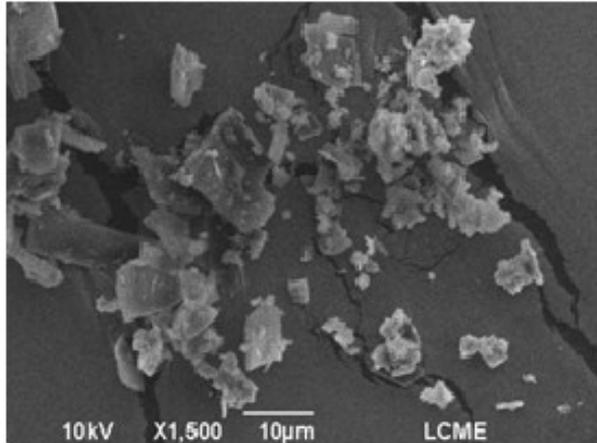
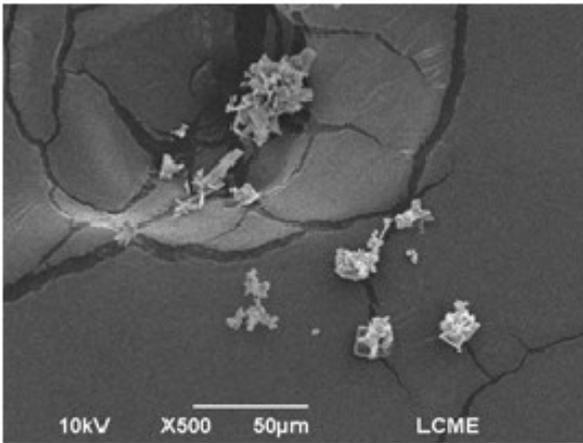
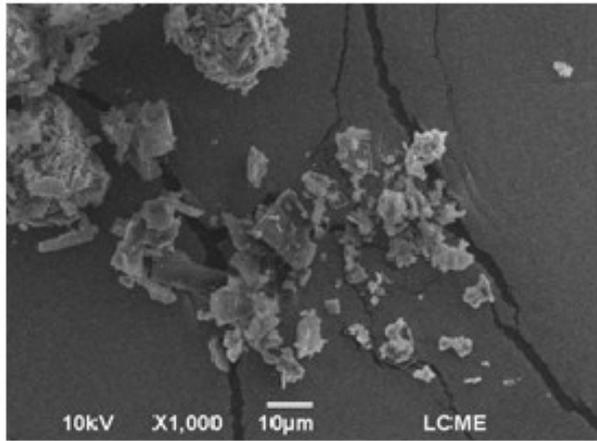
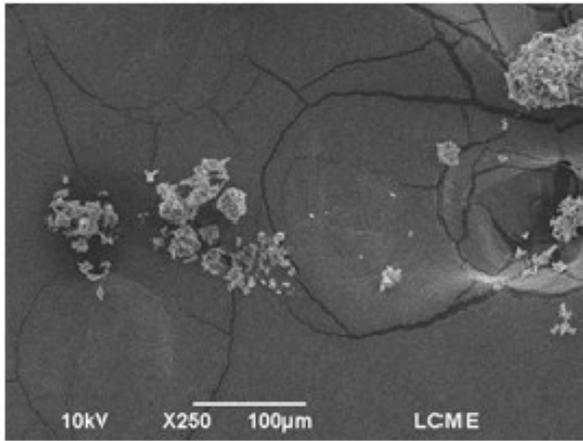
E7



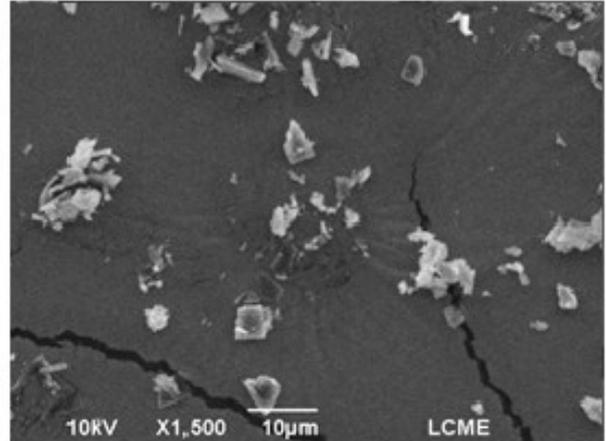
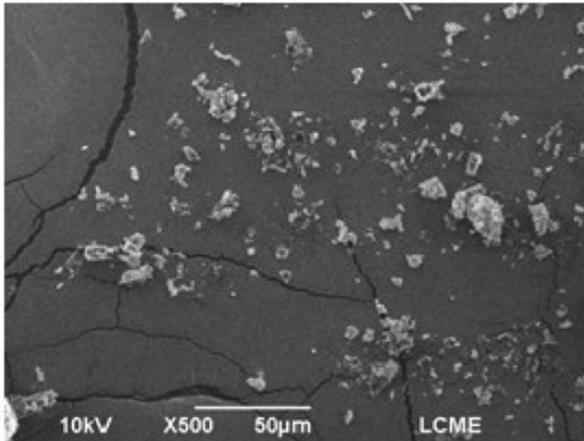
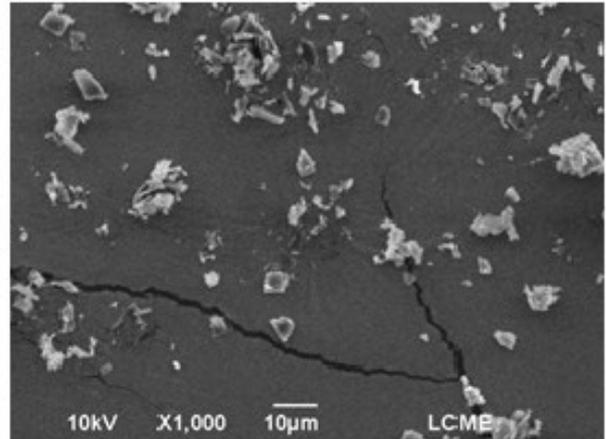
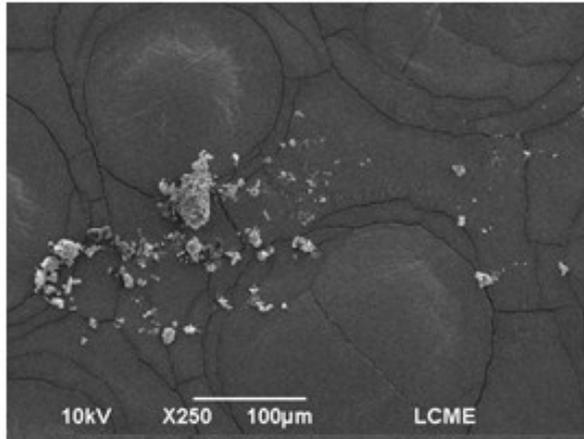
E8



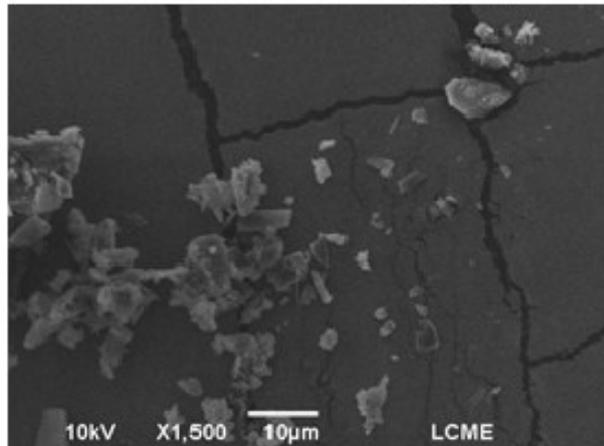
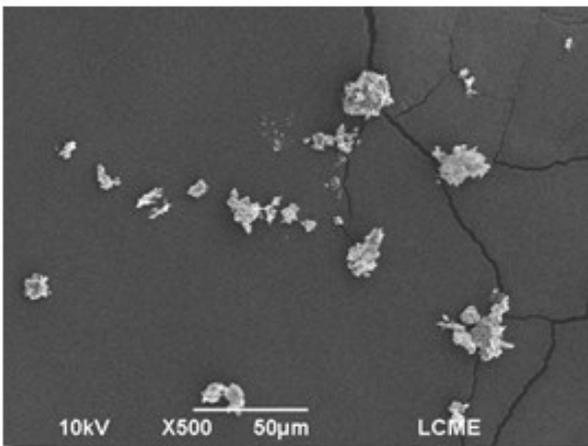
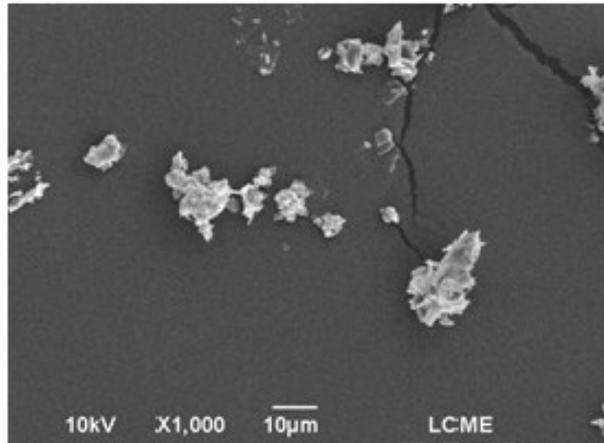
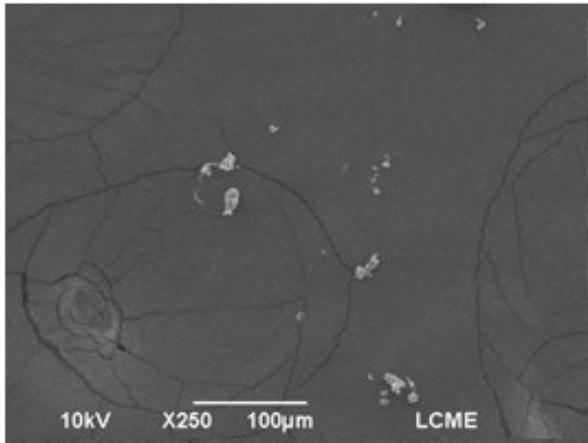
E9



E10



E11



LC

