UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Microencapsulação de compostos bioativos de *Camellia sinensis* em sistemas
lipídicos por *spray drying***

Vanessa Aparecida Secolin

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Microencapsulação de compostos bioativos de *Camellia sinensis* em sistemas lipídicos por *spray drying*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Vanessa Aparecida Secolin

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Pereira Oliveira

Ribeirão Preto
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Secolin, Vanessa Aparecida

Microencapsulação de compostos bioativos de *Camellia sinensis* em sistemas lipídicos por *spray drying*. Ribeirão Preto, 2014.
113 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Oliveira, Wanderley Pereira.

1. Microencapsulação. 2. *Camellia sinensis*. 3. *Spray drying*.

Capa: imagem disponível em: <http://paulmirocha.com/rebranding-alvita-tea/greentea-flowers_f/#.VHaCusnp3YM>. Acesso em 26 de novembro de 2014.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vanessa Aparecida Secolin

Microencapsulação de compostos bioativos de *Camellia sinensis* em sistemas lipídicos por *spray drying*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Pereira Oliveira

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Farmacêuticos (LAPROFAR).

Apoio Financeiro
FAPESP

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente nas horas de angústia. Aos meus pais Antonio e Neusa, ao meu irmão Andrey e meu noivo Danilo.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Wanderley Pereira de Oliveira, meu orientador, pela confiança em todos os momentos do desenvolvimento do projeto, pela sua constante orientação e flexibilidade, pela amizade e apoio.

À Dra. Cláudia Regina Fernandes de Souza pelos ensinamentos e desafios, pela paciência, confiança e incentivo em todos os momentos de minha formação científica.

Aos colegas do Laboratório de P&D em Processos Farmacêuticos (LAPROFAR), Diego, Lucimara, Tales, Maurette e Marcelo pela amizade, auxílio mútuo e bom convívio durante todos os anos.

À FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro provendo todos os recursos necessários para a realização deste trabalho.

As minhas amigas Marina e Érika, pelas idéias, incentivo, carinho e dedicação durante todo o decorrer do projeto.

Ao meu noivo, Danilo, pela paciência, compreensão, incentivo, carinho e atenção constante durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Meu eterno agradecimento aos meus pais, Antonio e Neusa, que sem medir esforços em suas vidas, me transmitiram todo o carinho, amor incondicional, sustento, incentivo, apoio e equilíbrio para o meu crescimento.

A todos aqueles que mesmo não citados, mas que me acompanharam de certa forma no desenrolar deste meu desafio, que puderam contribuir à sua maneira na realização deste trabalho.

“A curiosidade é mais importante do que o conhecimento.”

Albert Einstein

RESUMO

SECOLIN, V. A. **Microencapsulação de compostos bioativos de *Camellia sinensis* em sistemas lipídicos por *spray drying***. 2014. 113f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O chá verde (*Camellia sinensis*) é reconhecido mundialmente por seu alto teor de polifenóis, em especial as catequinas. As catequinas estão relacionadas à prevenção de várias doenças degenerativas, como o câncer e diabetes, devido ao grande potencial antioxidante. Contudo, vários inconvenientes precisam ser superados para aprimorar o uso destes produtos, principalmente em relação à sua biodisponibilidade. O desenvolvimento de carreadores lipídicos na encapsulação de compostos bioativos é uma tecnologia recente capaz de resolver vários problemas de biodisponibilidade apresentadas pelos produtos naturais, produzindo uma estrutura capaz de proteger os compostos ativos. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma formulação utilizando carreador lipídico, empregando métodos de secagem para aumentar a estabilidade dos compostos bioativos, enfatizando-se processos de preparação, tipo de excipientes e procedimentos para a caracterização físico-química, estabilidade e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do produto final. Os compostos bioativos foram extraídos a partir das folhas secas e moídas de chá-verde através do processo de maceração dinâmica, sendo filtrado, concentrado e liofilizado. A formulação foi desenvolvida utilizando o sistema de balanço hidrófilo-lipófilo (EHL) com tensoativos não-iônicos e co-solvente, e caracterizados pelas análises organolépticas, centrifugação, reologia, microscopia óptica, distribuição de tamanho e potencial zeta. Para a etapa de secagem, selecionou-se a formulação mais estável. As formulações foram secas em *spray dryer* de escala laboratorial a uma vazão de 4,0 g/min, e temperaturas de 100, 120 e 150 °C. O desempenho de secagem foi avaliado pela recuperação do produto. Os pós obtidos por *spray drying* foram caracterizados quanto ao teor de umidade, atividade da água, densidade, distribuição granulométrica, propriedades de fluxo, cristalinidade, morfologia e redispersibilidade. Após, se avaliou a atividade antioxidante do produto em óleo vegetal (óleo de soja) utilizando o teste acelerado de estabilidade oxidativa em Rancimat[®]. O EHL, o tipo de tensoativo e a técnica de preparo da formulação influenciaram diretamente na estabilidade do sistema. Para as formulações estudadas, o tensoativo que conferiu uma maior estabilidade foi o Gelucire[®] 44/14, sendo selecionado para prosseguimento com o processo de secagem das composições. O rendimento do processo atingiu em média 51,3 ± 3,5 %, típico para secadores do tipo *spray dryer* em escala laboratorial. A maioria das partículas apresentou aparência arredondada, sem presença visível de porosidade, independente do adjuvante (lactose ou trealose). O produto apresentou baixa atividade de água ($\leq 0,22$) e teor de umidade ($\leq 1,79$). O aumento da temperatura de secagem provocou um ligeiro aumento no diâmetro médio de partícula quando a lactose foi utilizada como adjuvante de secagem (9,8 ± 5,9 µm para 13,65 ± 8,4 µm). Os pós obtidos tiveram baixa densidade, sendo menor em temperaturas mais altas. O índice de Carr e Fator de Hausner (15 % e < 1,25, respectivamente) indicaram boas propriedades de compressão e fluidez. O produto foi prontamente redispersível, recuperando facilmente sua consistência e características originais. A avaliação da estabilidade oxidativa acelerada utilizando Rancimat demonstrou que o processo de encapsulação conferiu uma maior solubilidade e proteção dos compostos bioativos, levando ao aumento da atividade antioxidante. Os resultados aqui relatados confirmam a viabilidade da encapsulação dos compostos bioativos de *Camellia sinensis* em carreadores lipídicos empregando o processo de *spray drying*. O produto apresenta potencial de aplicação como matéria-prima para a produção de formas orais, inclusão em produtos nutracêuticos e cosméticos.

Palavras-chave: *spray drying*, encapsulação, fosfolípidos, chá-verde, biodisponibilidade.

ABSTRACT

SECOLIN, V. A. **Microencapsulation of bioactive compounds of *Camellia sinensis* in lipid systems by spray drying**. 2014. 113f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Green tea, a product made from *Camellia sinensis* leaves, is recognized worldwide by its high polyphenol content, in special the catechins. Tea catechins are linked to the prevention of several degenerative diseases as cancer and diabetes. However, several drawbacks need to be overcome in order to increase the use of this products, being their bioavailability one of the upmost. The development of carrier lipid based containing bioproducts is a recent technology, which can solve several bioavailability problems presented by natural products, producing a structure which confer protection to active compounds. The aim of this work was the development of carrier lipid based compositions containing bioactive compounds of *Camellia sinensis* (green tea) by spray drying evaluating processes of preparation, type of excipients and characterization of physicochemical properties and evaluation the antioxidant activity in vitro of the product. Bioactive compounds from dried and milled green tea leaves was extracted by dynamic maceration, filtered, concentrated and freeze-dried. The formulation was developed through the utilization of Hydrophilic Lipophilic Balance System (HLB) using the non-ionic surfactants and a co-solvent and characterized by organoleptic analysis, centrifugation, rheology, optical microscopy, size distribution and zeta potential. The most stable compositions were submitted to spray drying. The compositions were dried in a lab-scale spray dryer at flow rate of 4.0 g/min at temperatures of 100, 120 and 150 °C. The spray drying performance was characterized by determination of the powder production yield. Spray dried powders were characterized by moisture content, water activity, density, size distribution, flow properties, crystallinity, morphology, and redispersibility. After, it was evaluated the antioxidant activity of the product in vegetable oil (soybean oil) using the accelerated oxidative stability test Rancimat®. The HLB, the type of surfactant and the preparation method of the formulation influenced the system stability. For the formulations studied, the surfactant which confers the greater stability was Gelucire® 44/14, which was selected to prepare composition for spray drying. The powder production yield falls around 51.3 ±3.5 %, typical for lab scale spray dryers. Wrinkled and rounded particles, without visible presence porosities were mostly generated, independent of the adjuvant (trehalose or lactose). The product presented low water activity (≤ 0.20) and low moisture content (≤ 1.79). Increasing in drying temperature caused a slight increase in mean particle diameter, when lactose was used as drying carrier ($9.8 \pm 5.9 \mu\text{m}$ to $13.65 \pm 8.4 \mu\text{m}$). Low density powders were generated, but density tends to be lower at high drying temperatures composition were submitted to spray drying. Carr index and Hausner ratio of the product ($< 15\%$ and < 1.25 , respectively) were indicative of good compressive and flow properties. The product was promptly redispersible, regaining its original consistency straight forwardly. The accelerated oxidative stability using the Rancimat demonstrated that the encapsulation increased the solubility and protection of bioactive compounds, resulting to increased antioxidant activity of the product. The results here reported confirm the feasibility of entrapment of herbal bioactive compounds of *Camellia sinensis* in lipid carrier by spray drying. The product has potential to be used as raw material for production of oral dosage forms, inclusion in nutraceutical and cosmetic products.

Keywords: spray drying, encapsulation, phospholipid, green tea, bioavailability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Imagens da planta <i>Camellia sinensis</i> identificando-se: (A) folhas e flores, (B) arbusto e (C) flor e fruto (Fonte: MAZZA, 2013).....	7
Figura 2 –	Principais catequinas presentes na <i>Camellia sinensis</i> (Fonte: adaptado de ZAVERI, 2006).....	9
Figura 3 –	Exemplos dos diferentes tipos de estruturas baseadas em sistemas emulsionados utilizados como sistemas de liberação (Fonte: MCCLEMENTS; LI, 2010).....	17
Figura 4 –	Representação da formação e estrutura de uma emulsão O/A.....	18
Figura 5 –	Exemplos de fosfolipídios (Fonte: BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).....	21
Figura 6 –	Atomizadores pneumático (A) e de disco rotatório (B). (Fonte: OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).....	24
Figura 7 –	Representação das diferentes configurações de secadores do tipo <i>spray dryer</i> (Fonte: MELONI, 2003).....	25
Figura 8 –	Representação de um equipamento Rancimat® e esquema de seu princípio de operação.....	32
Figura 9 –	Diagrama esquemático e foto do secador utilizado (Fonte: RAMOS, 2011).....	41
Figura 10 –	Gradiente de eluição utilizado.....	43
Figura 11 –	Distribuição granulométrica acumulada do extrato liofilizado de <i>Camellia sinensis</i>	59
Figura 12 –	Perfil cromatográfico: (I) Formulação sem os ativos e (II) Perfil cromatográfico do extrato liofilizado de <i>Camellia sinensis</i> , onde (A) EGCG, (B) Caféina e (C) ECG.....	60
Figura 13 –	Aspecto visual das formulações preparadas com diferentes sistemas co-solvente após centrifugação a 106,2 xg/ 15 minutos, onde: (1) Álcool terc-butilico, (2) Água, (3) Álcool, iso-butilico e (4) Álcool n-butilico.....	61
Figura 14 –	Reologia das formulações: (A) Viscosidade em diferentes EHL e (B) Viscosidade com diferentes tensoativos e (C) Representação do perfil reológico das formulações (Gelucire 44/14).....	64
Figura 15 –	Aparência das formulações antes e após estresse térmico, onde: F: Gelucire® 44/14; G: Tween 80; H: Steareth 20 e I: Tween 20/Span 80 antes (esquerda) e após (direita) a exposição à temperatura.....	66
Figura 16 –	Fotografia da microscopia óptica das formulações no aumento de 100 x, onde: (I) Gelucire® 44/14 ultra-turrax (II) Gelucire® 44/14 manual; (III) Steareth 20 ultra-turrax; (IV) Steareth 20 manual; (V) Tween 80 ultra-turrax; (VI) Tween 80 manual; (VII) Tween/ Span ultra-turrax, (VIII) Tween/ Span manual.....	68

Figura 17 –	Fotografias das formulações obtidas pelos diferentes processos de homogeneização, onde: T0 = Pré-emulsão; MAN: Preparo manual; ULT: Preparo por ultra-turrax; (B) Homogeneizador de alta pressão à 1000 bar; (C) Homogeneizador de alta pressão à 750 bar; (B) Homogeneizador de alta pressão à 500 bar.....	70
Figura 18 –	Distribuição granulométrica acumulada obtida por microscopia óptica e análise de imagens.....	74
Figura 19 –	Micrografias obtidas por M.E.V. formulações contendo lactose e trealose secas em diferentes temperaturas de secagem, e dos excipientes puros, onde: A, B e C: formulação com lactose a 100, 120 e 150 °C respectivamente; D, E e F: formulação com trealose a 100, 120 e 150 °C; G e H: excipientes trealose e lactose monohidratada respectivamente.....	78
Figura 20 –	Difratogramas dos componentes isolados da formulação, onde: (A) PCH90 (lecitina de soja hidrogenada); (B) Lactose e (C) Trealose.....	81
Figura 21 –	Difratograma das formulações em função da temperatura do ar de secagem e dos adjuvantes, onde: (A) Trealose a 100 °C; (B) Trealose a 120 °C; (C) Trealose a 150 °C; (D) Lactose a 100 °C; (E) Lactose a 120 °C e (F) Lactose a 150 °C.....	82
Figura 22 –	Difratograma das formulações com a adição do adjuvante de secagem após o preparo, onde: (A) Lactose a 100 °C; (B) Trealose a 100 °C; (C) Lactose a 120 °C; (D) Trealose a 120 °C; (E) Lactose a 150 °C e (F) Trealose a 150 °C.....	84
Figura 23 –	Eficiência de encapsulação (EE%) das dispersões lipídicas secas obtidas por <i>spray dryer</i> em função das variáveis do processo, onde: (A) EE% da EGCG; (B) EE% da cafeína; (C) EE% da ECG.....	86
Figura 24 –	Recuperação (%) da formulação seca pelo processo de <i>spray drying</i>	88
Figura 25 –	Fotografias das formulações após o processo de <i>spray drying</i> no tempo zero, onde: L100A: adjuvante lactose adicionada durante o preparo da emulsão e seca a 100 °C, L: lactose e T: trealose; A e D: se refere à adição do excipiente durante e após o preparo da emulsão, respectivamente; 100, 120 e 150: temperaturas de secagem utilizadas (°C).....	89
Figura 26 –	Relação do fator de proteção do antioxidante com relação à concentração avaliada.....	90
Figura 27 –	Análise comparativa do fator de proteção da formulação e de seus componentes isolados.....	91
Figura 28 –	Gráfico comparativo evidenciando efeito sinérgico entre os antioxidantes.....	92
Figura 29 –	Fluxograma das atividades desenvolvidas no projeto.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Proporção das catequinas presentes no chá-verde (Adaptação HARA, 2001).....	10
Tabela 2 –	Composição das formulações avaliadas segundo o diagrama ternário de fases...	45
Tabela 3 –	Composição da formulação contendo catequinas do chá-verde.....	45
Tabela 4 –	Planejamento da avaliação do efeito sinérgico entre antioxidantes.....	55
Tabela 5 –	Resultados da co-validação do método analítico de análise da <i>Camellia sinensis</i>	59
Tabela 6 –	Proporção de tensoativos utilizados para alcançar o valor de EHL final.....	62
Tabela 7 –	Análise macroscópica e teste de centrifugação das emulsões com lecitina de soja desenvolvidas em função da determinação do valor de EHL.....	63
Tabela 8 –	Descrição dos tensoativos utilizados nas formulações com os respectivos valores de EHL.....	65
Tabela 9 –	Análise macroscópica e teste de centrifugação das emulsões com lecitina de soja desenvolvida em função da determinação do valor de EHL.....	66
Tabela 10 –	Avaliação do comportamento das formulações durante estresse térmico.....	66
Tabela 11 –	Análise macroscópica e teste de centrifugação das emulsões com lecitina de soja em função da pressão empregada no processo de homogeneização.....	70
Tabela 12 –	Potencial zeta e tamanho médio de partículas das formulações líquidas.....	72
Tabela 13 –	Temperatura do ar de saída, teor de umidade e atividade de água das dispersões lipídicas obtidas por <i>spray drying</i>	74
Tabela 14 –	Efeito das condições de processamento nas características de tamanho das partículas.....	75
Tabela 15 –	Propriedades de fluidez e compactação das formulações obtidas por <i>spray dryer</i>	79
Tabela 16 –	Classificação das propriedades de fluidez de pós associada ao FH e IC de acordo com a Farmacopéia dos Estados Unidos (2014).....	79
Tabela 17 –	Estimativa do período de armazenamento do óleo de soja a 20 °C, dos padrões e formulações teste, com as equações e os respectivos coeficientes de correlação.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A _a	Atividade de água
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS	American Oil Chemists' Society
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butilado de hidroxitolueno
CAF	Cafeína
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
C _s	Concentração de sólidos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPR	Desvio padrão relativo
DSPC	Diestearoilfosfatidilcolina
EC	Epicatequina
ECG	Epicatequina galato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Eficiência de encapsulação
EGC	Epigallocatequina
EGCG	Epigallocatequina galato
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
ERO	Especie reativa de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FH	Fator de Hausner
FP	Fator de proteção
IC	Índice de Carr
LM	Levemente modificado
M	Modificado
M _{água}	Massa de água destilada

M_c	Massa coletada
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Min	Minutos
M_{se}	Massa da solução extrativa no picnômetro
N	Normal
P_{atm}	Pressão do ar de atomização
PCH90	Fosfatidilcolina de soja hidrogenada 90 %
PI	Período de indução
q.s.p	Quantidade suficiente para
R	Recuperação
RE	Resolução
SD	<i>Spray drying</i>
TBHQ	Terc butil hidroquinona
T_{ge}	Temperatura de entrada do gás de secagem
T_{gs}	Temperatura de saída do gás de secagem
ULT	Ultraturrax
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta
W_{atm}	Vazão do ar de atomização
W_g	Vazão do ar de secagem
W_s	Vazão de alimentação
X_p	Umidade

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	v
Lista de abreviaturas e siglas.....	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. ATIVOS VEGETAIS.....	6
2.2. <i>CAMELLIA SINENSIS</i>	7
2.3. ASPECTOS FITOQUÍMICOS.....	8
2.4. CHÁ-VERDE E SUAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	10
2.4.1. Processo oxidativo.....	10
2.4.2. Antioxidantes	11
2.4.3. Aplicações na área farmacêutica	12
2.4.4. Aplicações na área alimentícia.....	13
2.5. LIMITAÇÕES DA UTILIZAÇÃO DE ATIVOS VEGETAIS	14
2.6. MICROENCAPSULAÇÃO DE ATIVO VEGETAIS.....	15
2.7. MICROENCAPSULAÇÃO EM SISTEMAS LIPÍDICOS.....	16
2.8. SISTEMAS EMULSIONADOS	17
2.8.1. Técnicas de produção de emulsões	18
2.8.2. Agentes emulsionantes.....	19
2.8.3. Sistemas lipídicos.....	20
2.8.4. Lecitinas e colesterol.....	20
2.9. ESTABILIDADE DE SISTEMAS LIPÍDICOS.....	21
2.10. SECAGEM DE SISTEMAS LIPÍDICOS.....	22
2.11. TECNOLOGIAS DE SECAGEM	23
2.12. <i>SPRAY DRYING</i>	23
2.13. Carreadores tecnológicos	26
2.14. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO PRODUTO	27
2.15. POTENCIAL APLICAÇÃO DO PRODUTO FINAL.....	30
2.15.1. Antioxidantes para óleos e gorduras	30
2.15.2. Estudo acelerado da estabilidade oxidativa utilizando o método Rancimat.....	31
2.16. Relevância do tema	32
3. OBJETIVO	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. MATÉRIA-PRIMA VEGETAL.....	38
4.2. LIPÍDEOS E AGENTES EMULSIFICANTES	38
4.3. CARREADORES DE SECAGEM.....	38
4.4. ÓLEO VEGETAL.....	38
4.5. REAGENTES, SOLUÇÕES E PADRÕES DE REFERÊNCIA	39
4.6. EQUIPAMENTOS	39
4.7. <i>SPRAY DRYER</i>	40
4.8. PREPARO DO EXTRATO CONCENTRADO E LIOFILIZADO.....	41
4.9. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS CONCENTRADO E LIOFILIZADO	41
4.9.1. Quantificação de EGCG, cafeína e ECG por CLAE.....	42
4.9.2. Teor de sólidos totais.....	43
4.9.3. Determinação da densidade.....	43
4.9.4. Determinação da perda por dessecação.....	44
4.9.5. Tamanho médio de partícula e distribuição granulométrica	44

4.10. DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS LIPÍDICOS EMULSIONADOS CONTENDO CATEQUINAS DE CHÁ-VERDE	44
4.10.1. Diagrama ternário de fases	44
4.10.2. Preparo da formulação	45
4.10.3. Sistema co-solvente	45
4.10.4. Equilíbrio Hidrófilo-lipófilo (EHL)	46
4.10.5. Avaliação de diferentes agentes emulsionantes associado ao método de preparo (manual e homogeneização por ultra-turrax)	48
4.10.6. Avaliação da influência dos métodos de homogeneização na estrutura da formulação	49
4.11. SECAGEM POR <i>SPRAY DRYING</i> E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO PRODUTO	50
4.11.1. Preparo da formulação	50
4.11.2. <i>Spray drying</i>	50
4.11.3. Propriedades físicas e químicas do produto	50
4.11.4. Desempenho da secagem (Recuperação do produto, R)	53
4.11.5. Análise estatística	53
4.12. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA EM RANCIMAT®	54
4.12.1. Preparo da amostra	54
4.12.2. Avaliação da dose-resposta	54
4.12.3. Efeito sinérgico	55
4.12.4. Tempo de prateleira (<i>shelf life</i>)	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS CONCENTRADO E LIOFILIZADO DE <i>CAMELLIA SINENSIS</i>	58
5.2. ESTUDO E DESENVOLVIMENTO DE CARREADOR LIPÍDICO EM SISTEMA EMULSIONADO CONTENDO CATEQUINAS DE CHÁ-VERDE	61
5.2.1. Sistema co-solvente	61
5.2.2. Estudo do EHL requerido para a formulação - Avaliação de agentes emulsionantes e métodos de preparo	62
5.2.3. Estresse térmico	66
5.2.4. Microscopia óptica	67
5.2.5. Homogeneização por alta pressão: análise macroscópica e teste de centrifugação	69
5.2.6. Microscopia óptica	71
5.2.7. Potencial zeta e tamanho de partícula	71
5.3. SECAGEM POR <i>SPRAY DRYING</i> E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO PRODUTO	72
5.3.1. Teor de umidade e atividade de água (A_a)	72
5.3.2. Tamanho médio de partícula e distribuição granulométrica	74
5.3.3. Morfologia	76
5.3.4. Propriedades de fluidez dos pós (determinação da densidade aparente e de compactação, fator de Hausner e índice de compressibilidade)	78
5.3.5. Difração de Raios-X	80
5.3.6. Eficiência de encapsulação (EE)	85
5.3.7. Redispersão	86
5.3.8. Desempenho da secagem	87
5.4. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA EM RANCIMAT	89
5.4.1. Avaliação da dose-resposta	89
5.4.2. Efeito sinérgico	91
5.4.3. Tempo de prateleira (<i>shelf life</i>)	93
6. CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
ANEXO A	112

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são fontes de moléculas bioativas que apresentam uma estrutura química diferenciada e um mecanismo de ação particular e inovador (SIMÕES et al., 2003). Muitos destes compostos exibem significativas propriedades biológicas, como por exemplo, atividade antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória e anti-tumoral, com grande potencial de exploração nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, químicas e cosmecêuticas (MANACH et al., 2005; FALLER; FIALHO, 2009; FANG; BHANDARI, 2010; HUANG; YU; RU, 2010).

A ação biológica dos ativos naturais está associada à presença de compostos fitoquímicos, dentre os quais se destacam os polifenóis, que apresentam notada ação antioxidante (MANACH et al., 2005; FALLER; FIALHO, 2009; FANG; BHANDARI, 2010; HUANG; YU; RU, 2010; CORTÉS-ROJAS, SOUZA; OLIVEIRA, 2014). Os polifenóis são uma ampla classe de compostos bioativos e que são encontrados na maioria das plantas, sendo os principais responsáveis pela atividade biológica, tais como atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

O chá-verde, produto obtido das folhas de *Camellia sinensis*, é reconhecido mundialmente pelo seu elevado teor de polifenóis, em especial as catequinas (HARA, 2001). Os quatro principais grupos de catequinas presentes no chá-verde incluem a (-)-epicatequina (EC), a (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina galato (ECG) e (-)-epigallocatequina galato (EGCG). O chá-verde está associado a prevenção de diversas doenças degenerativas como câncer (JIAN et al., 2004) e diabetes (FUKINO et al., 2008). Outros estudos evidenciam seu potencial antioxidante como aditivo em alimentos, como conservante alimentício, o que pode aumentar o tempo de prateleira de um produto (SIRIPATRAWAN, NOIPHA, 2012), além da atividade de fotoproteção (WISUITIPROT et al., 2011) e antienvhecimento (SENGER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010).

Entretanto, várias limitações precisam ser superadas a fim de aumentar a utilização de compostos bioativos em produtos no mercado, como por exemplo, problemas de instabilidade como reações de autooxidação, epimerização, instabilidade à variação de pH e ao conteúdo gástrico, além da baixa biodisponibilidade (CHANCHAL; SWARNLATA, 2009; WISUITIPROT et al., 2011).

Portanto, o desenvolvimento de mecanismos de proteção que possam manter a estabilidade dos compostos naturais ativos até o momento do consumo, bem como proporcionar um sistema de liberação alvo fisiológico específico são de fundamental

importância (HARA, 2001; SAITO, 2007; MAHMOOD; AKHTAR; KHAN, 2010; SENGHER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010).

Recentemente, grande atenção tem sido direcionada ao emprego de carreadores lipídicos no desenvolvimento de sistemas micro e nanoestruturados como estratégia para conferir vantagens aos produtos naturais. Dentre as principais vantagens pode-se incluir o aumento da solubilidade, melhoria da atividade biológica, o aumento da estabilidade, possibilidade de liberação sustentada e sítio específico, além da redução da degradação do ativo em decorrência de fatores físicos e químicos (TAN; RAO; PRESTIDGE, 2013; CORTÉS-ROJAS, SOUZA; OLIVEIRA, 2014). Um carreador lipídico ideal deve ser capaz de conferir uma proteção ao ativo durante o trânsito gastro-intestinal e aumentar a sua absorção, e/ou aumentar a estabilidade, a solubilidade e as propriedades de liberação do ativo.

O emprego de sistemas biocompatíveis, como por exemplo, fosfolípidos e colesterol podem gerar produtos com propriedades especiais e características promissoras (MORAES, et al., 2013; TAN; RAO; PRESTIDGE, 2013). Os fosfolípidos são os principais constituintes da membrana celular, o que pode conferir inúmeros benefícios ao composto ativo principalmente relacionado ao aumento da biodisponibilidade.

A lecitina de soja é uma mistura de fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol) e que tem sido muito utilizada em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos (PARKS; HELLERSTEIN, 2006). Evidências de efeito sinérgico com antioxidantes tem despertado grande interesse sobre o emprego de lecitinas como carreador no desenvolvimento tecnológico de produtos naturais. Dentre os estudos reportados pode-se citar a obtenção de alimentos funcionais com alta atividade antioxidante, utilizados como conservantes naturais ou ainda como sistemas de liberação (RAMADAN, 2012; MORAES, et al., 2013; TAN; RAO; PRESTIDGE, 2013; RASHIDINEJAD et al., 2014).

Entretanto, alguns sistemas lipídicos, em especial a fosfatidilcolina, possuem baixa estabilidade, principalmente em meio aquoso devido a sua estrutura química. Este fato se deve ao número de insaturações contidas na estrutura molecular destes lipídeos, o que as torna susceptíveis a reações de peroxidação (FIDORRA et al., 2006). Em escala industrial esses produtos necessitam de precisas condições de processamento, visando manter a estabilidade do produto, além de maiores cuidados durante o transporte e armazenamento.

A secagem de formulações lipídicas representa uma nova tendência especialmente para aplicações orais. A forma sólida é mais estável e pode ser facilmente redispersa quando

necessário (TAN; RAO; PRESTIDGE, 2013). Neste contexto, o emprego do *spray drying* é amplamente reportado industrialmente, pois além de produzir sistemas estáveis na forma de pós, reduzindo os riscos de contaminação microbiana, e custos de transporte e armazenagem, trata-se de um método robusto que permite a otimização das características das partículas, podendo ser utilizado em produtos termo-sensíveis, além de apresentar baixo custo de operação (OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009; INGVARSSON et al., 2011; INGVARSSON et al., 2013).

Apresenta-se neste trabalho um estudo sistemático que objetivou avaliar os principais fatores envolvidos na encapsulação de compostos bioativos presentes no chá verde (cafeína e catequinas), empregando-se composições à base de fosfatidilcolina de soja e colesterol, seguida por secagem em *spray drying*, enfatizando-se processos de preparação, tipo de excipientes e procedimentos para a caracterização físico-química, estabilidade e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do produto.

2. Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Ativos vegetais

Atualmente existe uma crescente tendência na utilização de ativos vegetais devido a evidências científicas que comprovam os seus efeitos benéficos à saúde. No organismo vegetal ocorrem inúmeras transformações bioquímicas que originam vários compostos químicos que são denominados metabólitos. Os metabólitos primários são aqueles essenciais para o crescimento, desenvolvimento e reprodução dos vegetais. Por outro lado, os denominados metabólitos secundários são as substâncias geradas fundamentalmente para a defesa do organismo, não sendo essenciais para sua sobrevivência. Em geral, a atividade biológica de produtos de origem vegetal está associada à presença dos metabólitos secundários, os quais incluem diversas classes de compostos, como por exemplo, os carotenóides, alcalóides, polifenóis, terpenos, esteróis, saponinas, compostos contendo nitrogênio e enxofre (PIETTA; MINOGGIO; BRAMATI, 2003; GEORGE; CENKOWSKI, 2009).

Muitos destes compostos exibem significativas propriedades biológicas, como por exemplo, atividade antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, e anti-tumoral, com grande potencial de exploração nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, químicas e cosmecêuticas (MANACH et al., 2005; FALLER; FIALHO, 2009; FANG; BHANDARI, 2010; HUANG; YU; RU, 2010). As moléculas bioativas provindas dos vegetais apresentam uma estrutura diferenciada e um mecanismo de ação particular e inovador, que tem motivado cada vez mais as indústrias investirem na pesquisa e desenvolvimento de produtos à base de ativos naturais.

O efeito protetor exercido por produtos naturais tem sido associada à presença de compostos fitoquímicos com pronunciada ação antioxidante, dentre os quais se destacam os polifenóis. Os polifenóis compreendem uma ampla classe de compostos bioativos encontrados na maioria das plantas, os quais apresentam comprovada atividade biológica, tais como atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (BERGONZI et al., 2014). A *Camellia sinensis* é reconhecida mundialmente pelo seu elevado teor de polifenóis, em especial as catequinas, que apresentam comprovadas evidências científicas em estudos clínicos (DALLUGE; NELSON, 2000). Vários autores citam que os efeitos benéficos da planta estão relacionados com a atividade antioxidante, sendo esta a propriedade farmacológica mais acentuada do produto (SENGER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010).

2.2. *Camellia sinensis*

A *Camellia sinensis* pertencente à família *Theaceae* originária do sudoeste da China. Na forma selvagem, pode atingir de 10 a 15 metros de altura e em cultivo no máximo 1,5 metros. A Figura 1 apresenta imagens da *Camellia sinensis*, com detalhes das folhas, flores e frutos. As folhas podem variar de 5 - 30 cm de comprimento, e cerca de 4 cm de largura. As flores são brancas de 2,5 a 4 cm de diâmetro, podendo aparecer solitária ou em grupos. O fruto é achatado, liso e arredondado e internamente apresenta uma cápsula com três sementes divididas cada uma em uma cápsula (SAITO, 2007; MAHMOOD; AKHTAR; KHAN, 2010).

No Brasil, o cultivo comercial da *Camellia sinensis* é mais restrito ao Vale do Ribeira-SP, em parte devido às condições climáticas da região que são mais favoráveis para o plantio da espécie. As colheitas são realizadas no período de agosto a maio, tendo um período de intervalo de dois meses que ocorre normalmente nos meses de junho e julho, depois da poda que ocorre antes do início do inverno. Entre as colheitas há um espaço de 7 a 10 dias durante o verão (normalmente no mês de janeiro), e de no mínimo vinte dias no mês de agosto (IAC-CIIAGRO, 2012).

Figura 1– Imagens da planta *Camellia sinensis* identificando-se: (A) folhas e flores, (B) arbusto e (C) flor e fruto (Fonte: MAZZA, 2013).

O consumo de infusões da *Camellia sinensis* já é reportado como a segunda bebida não-alcoólica mais consumida no mundo, atrás apenas da água. Esta tendência se deve aos

inúmeros benefícios atribuídos à saúde que se relacionam a seus compostos fitoquímicos (SAITO, 2007; DUARTE; MENARIN 2006; SENER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010).

No mercado existem várias denominações para a *Camellia sinensis* de acordo com processamento pelo qual o material vegetal é submetido após a colheita. A composição dos chás normalmente são as folhas, variando o estágio da coleta e o “processo fermentativo”, e que atualmente é denominado como processo oxidativo. Este processo é responsável pela oxidação enzimática dos polifenóis presente na planta, conferindo menor adstringência e uma coloração mais intensa ao material vegetal. Além disso, a estabilização por tratamento térmico preserva os polifenóis encontrados naturalmente na planta fresca (SENER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010; MAHMOOD; AKHTAR; KHAN, 2010). De forma geral, as denominações dos produtos encontradas no mercado são: chá-branco, chá-verde, chá-oolong, chá-preto e o chá-vermelho, descritos a seguir:

- ❖ Chá-branco: é composto por brotos e folhas jovens, e não passa pelo processo oxidativo e em consequência acaba sendo mais raro e caro;
- ❖ Chá-verde: é composto pela planta como um todo, e são levemente fermentadas e por isso mantém a coloração mais verde;
- ❖ Chá-oolong: as folhas passam por uma fermentação mediana, basicamente ficando entre o chá-verde e o preto, mas com características degustativas geralmente mais próximas a do chá verde;
- ❖ Chá-preto e chá-vermelho: passam pelo processo oxidativo completo, tendo como única diferença o agente oxidativo utilizado no processamento, que no caso pode ser uma enzima específica (chá-preto) ou mediada por micro-organismos (chá-vermelho), (CABRERA; ARTACHO; GIMENEZ, 2006; LIMA et al., 2009; MAHMOOD; AKHTAR; KHAN, 2010).

2.3. Aspectos fitoquímicos

A *Camellia sinensis* tem sido alvo de vários estudos farmacológicos e bioquímicos tendo em vista a sua composição fitoquímica. Contudo, vários fatores podem contribuir para que ocorra a variação do teor e dos componentes do chá, nas quais se destacam: a sua variedade, estação em que foi colhida, idade da folha, clima, técnicas de cultivo e tipo do solo. Além disso, outros aspectos como a tecnologia utilizada para a extração, concentração, conservação e armazenamento, também devem ser considerados (SAITO, 2007; LIMA et al., 2009).

As folhas frescas de *Camellia sinensis* possuem cafeína (cerca de 3,5 % do peso seco total), teobromina (0,15 - 0,2 %), teofilina (0,02 - 0,04 %) e outros metilxantinas, lignina (6,5

%), ácidos orgânicos (1,5 %), clorofila (0,5 %) e outros pigmentos, teanina (4 %) e os aminoácidos livres (1 - 5,5 %), além de vários compostos aromáticos (GRAHAM, 1992). Além disso, há uma grande variedade de compostos como flavonas, ácidos fenólicos, alcalóides, carboidratos, minerais, vitaminas e enzimas. O chá também contém flavonoides, principalmente a quercetina, kaempferol, miricetina e seus glicosídeos (BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS, 1997; GRAHAM, 1992; ZAVERI, 2006).

Neste contexto, o chá-verde é reconhecido mundialmente pelo alto teor de polifenóis, em especial as catequinas, as quais estão associadas à prevenção de doenças degenerativas como câncer e diabetes (BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS, 1997). Este fato está relacionado diretamente ao alto teor de catequinas, com predomínio do (-)-galato de epigallocatequina (EGCG) e (-)-epigallocatequina (EGC) (CABRERA; ARTACHO; GIMENEZ, 2006), o que faz do chá-verde uma matéria-prima promissora para a condução de novos estudos, e por este motivo foi escolhido para o desenvolvimento deste trabalho.

O teor de catequinas no chá-verde representa pouco mais de 90 % do teor total de flavonoides, sendo que de 20 a 30 % podem estar na forma oxidada. As principais catequinas do chá-verde são o epigallocatequinagalato (EGCG) de 1,2 a 18,8 %, epigallocatequina (EGC) de 0,1 a 5,5 %, epicatequina (EC) de 0,19 a 2 % e traços de catequina, além de altos teores de cafeína (HARA, 2001; SAITO, 2007). Na Figura 2 pode-se visualizar a estrutura química das catequinas descritas.

Figura 2 – Principais catequinas presentes na *Camellia sinensis* (Fonte: adaptado de ZAVERI, 2006).

Segundo Hara (2001), a composição das catequinas do chá-verde, em concentrações absolutas e relativas, encontra-se nas faixas descritas na Tabela 1. Entretanto, durante a revisão foram encontradas diferentes faixas teores de compostos ativos do chá-verde. Isto se deve tanto à qualidade do material vegetal, quanto ao processo utilizado na extração dos compostos bioativos (HARA, 2001; MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006; ZAVERI, 2006).

Tabela 1 – Proporção das catequinas presentes chá-verde (Adaptação HARA, 2001).

Catequinas	% Absoluta	% Relativa
(+) Galocatequina (GC)	1,4	1,6
(-) Epigalocatequina (EGC)	17,57	19,3
(-) Epicatequina (EC)	5,81	6,4
(-) Epigalocatequinagalato (EGCg)	53,90	59,1
(-) Epicatequinagalato (ECg)	12,51	13,7

Devido ao virtual crescimento da demanda de produtos multifuncionais e a grande variação no teor dos compostos ativos, a indústria farmacêutica e alimentícia tem sido forçada a controlar a qualidade desses produtos “naturais”, em termos de eficácia e segurança. Isso tem incentivado à padronização dos extratos vegetais e o uso de ferramentas para manter sua qualidade. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar são as técnicas amplamente empregadas para separação, identificação e quantificação de catequinas do chá-verde, sendo a cromatografia líquida em fase reversa e detecção com UV métodos frequentemente reportados na literatura (SHARMA et al., 2005; SAITO, 2007; HE et al., 2009).

2.4. Chá-verde e suas propriedades funcionais

Diferentes grupos de substâncias têm sido identificados na espécie *Camellia sinensis* e numerosos ensaios farmacológicos têm demonstrado que a atividade antioxidante está diretamente relacionada aos efeitos protetores do chá-verde (FERRARA; MONTESANO; SENATORE, 2001; SCHMITZ et al., 2005; PANDEY; GUPTA, 2009; DUARTE; MENARIM, 2006). A seguir são descritos o mecanismo de atividade antioxidante e algumas evidências de aplicações do chá-verde em setores industriais.

2.4.1. Processo oxidativo

Todos os seres vivos e compostos naturais estão suscetíveis a danos oxidativos tanto metabólicos como ambientais. O estresse oxidativo tem sido reportado como o principal fator desencadeador do processo de envelhecimento, surgimento de doenças e pela degradação de

alimentos (SILVA, BORGES, FERREIRA, 1999; MEDONÇA, 2009; RAJENDRAN et al., 2014).

A oxidação ocorre principalmente por influência do oxigênio atmosférico, estando envolvido numa série de reações que podem levar a processos degenerativos, devido à propriedade de gerar o que chamamos de espécies reativas de oxigênio (ERO) também conhecidas como radicais livres. A reação ocorre em nível molecular no qual altera-se o equilíbrio eletrônico de uma estrutura química, ocorrendo o ganho ou a perda de elétrons gerando um elétron desemparelhado na estrutura. Neste processo, a estrutura química fica eletronicamente instável, o que a deixa altamente reativa, tendo a capacidade de se ligar a qualquer molécula que se aproxime (YOUNGSON, 1995). Assim, os radicais livres são capazes de iniciar reações em cadeia trazendo sérios prejuízos para órgãos e tecidos levando ao envelhecimento prematuro das células e até mesmo ao desenvolvimento de células cancerígenas (RAJENDRAN et al., 2014).

Na área alimentícia este mecanismo provoca a deterioração do produto, levando a alteração do sabor, odor, coloração e textura do alimento, ou ainda podendo gerar compostos tóxicos. As substâncias que sofrem oxidação com maior facilidade são os ácidos graxos, óleos e gorduras, dando origem aos chamados hidroperóxidos (radicais livres que aceleram ainda mais a deterioração) e aos aldeídos voláteis (conhecido popularmente como ranço). Trata-se de uma das principais causas da redução da vida de prateleira de produtos alimentícios industrializados (SILVA, BORGES, FERREIRA, 1999; MENDONÇA, 2009).

2.4.2. Antioxidantes

Os agentes denominados antioxidantes são moléculas capazes de diminuir ou prevenir a oxidação de outras moléculas (PINCHUK et al., 2012). Os compostos antioxidantes podem ser formados por produtos sintéticos ou naturais como vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais.

De uma forma simplificada, os antioxidantes podem ser classificados de acordo com o mecanismo de ação em sistemas primários e sinérgicos. Os antioxidantes primários incluem os compostos fenólicos poliidroxilados (galatos) e os fenóis os quais atuam bloqueando a ação de radicais livres fornecendo elétrons ou hidrogênio, formando compostos estáveis. Dentro deste grupo os principais representantes são o BHA, BHT, TBHQ e tocoferóis. (NAWAR, 1996).

Os antioxidantes sinérgicos podem atuar como removedores de oxigênio, ou como agentes complexantes. Na primeira situação, o antioxidante pode atuar na remoção de oxigênio presente em um sistema fechado, dentre eles pode-se citar o ácido ascórbico, o

palmitato de ascorbila, sulfitos e eritorbatos. Por exemplo, 3,3 mg de ácido ascórbico é capaz de remover todo o oxigênio presente em um mililitro de ar. Em alimentos gordurosos utiliza-se o palmitato de ascorbila devido a sua alta lipossolubilidade. A segunda forma de atuação desse tipo de antioxidante é como agente complexante o qual reage com íons metálicos. As substâncias mais utilizadas nessa situação são ácido cítrico, EDTA e derivados do ácido fosfórico (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os flavonoides, incluindo flavonas, flavonóis e isoflavonas, constituem o grupo mais abundante de antioxidantes naturais, sendo capazes de inibir o processo oxidativo por diversos mecanismos, atuando em diferentes espécies reativas de oxigênio. A principal atuação está relacionada ao sequestro dos radicais livres, resultando na formação de outros complexos pela desativação do oxigênio singlete (forma reativa do oxigênio). Estes compostos são normalmente pouco solúveis em fase orgânica, mas demonstram atividade antioxidante, por exemplo, em sistemas emulsionados. Os compostos carotenóides e ácido ascórbico são definidos como antioxidantes sinérgicos, desativadores do oxigênio singlete e que também são capazes de reagir com os radicais peróxido ou alquil (KOLAKOWSKA, 2003).

As catequinas também estão no grupo de antioxidantes naturais, sendo a propriedade antioxidante dependente de sua estrutura química. Quando existem radicais ligados aos anéis da catequina e a presença de grupos hidroxila nos anéis A, B e D, a atividade do composto é potencializada. As catequinas são capazes de capturar as espécies reativas de oxigênio, como os radicais superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, sendo os radicais considerados como extremamente danosos aos lipídios, proteínas e DNA. O modo de ação consiste basicamente em transferir elétrons para as espécies reativas de oxigênio, estabilizando-as através da formação de um composto menos reativo (SENANAYAKE, 2013)

2.4.3. Aplicações na área farmacêutica

Diversas pesquisas científicas têm evidenciado que doenças degenerativas associadas à idade tais como câncer, doença de Parkinson, Alzheimer, problemas cardiovasculares e diabetes, apresentam como origem variações no equilíbrio dos compostos oxidante/antioxidante no organismo, levando a geração de radicais livres. Estudos *in vitro* e *in vivo*, tem fornecido fortes evidências de que os polifenóis do chá-verde podem auxiliar no equilíbrio dos radicais livres, desempenhando um papel importante na prevenção de diversas doenças crônicas, principalmente as doenças cardiovasculares, câncer, e patologias relacionadas. Outros estudos também sugerem o efeito benéfico da ingestão de chá-verde sobre a densidade óssea, função cognitiva, cárie dentária e pedras nos rins, entre outros (CABRERA; ARTACHO; GIMENEZ, 2006).

Evidências clínicas no controle de doenças cardiovasculares foram observadas por Wang et al. (2010), que realizou um estudo com 520 pacientes consumindo durante um mês de 125 a 249 g/ mês de folhas secas do chá-verde. Como resultado observou-se uma redução no risco de doença arterial coronariana em homens que ingeriram o chá-verde comparado com aqueles que não bebiam ($p < 0,001$). Tinahones et al. (2008), avaliaram clinicamente quatorze mulheres durante cinco semanas com um consumo de 350 mg de catequinas/ dia (equivalente a 8,4 g de chá verde). Neste caso, se observou uma melhora na função vascular e a resposta da artéria braquial a compressão aumentou de forma significativa ($p < 0,0001$) após o tratamento com extrato de chá verde. Além disso, houve redução (37,4 %) na concentração de LDL e dos triglicerídeos na circulação sanguínea. Resultados similares também foram observados por Unno et al. (2005), que monitoraram o efeito das catequinas do chá (epigallocatequina galato em doses de 1 mg, 68 mg e 243 mg) na resposta do metabolismo dos lipídios pós-prandial em seres humanos após a alimentação.

Pesquisas demonstram que o consumo habitual 1,5 kg de chá-verde ao ano pode diminuir o risco de câncer de próstata (JIAN al., 2004). Outros casos como redução da glicemia (FUKINO et al., 2008), diminuição do peso corporal (WU et al., 2003) e a menor prevalência de declínio cognitivo também foram atribuídos ao consumo habitual de chá.

O câncer de pele ou mesmo o envelhecimento (normal ou precoce) acontecem por razões cronológicas e ambientais. Neste último caso, a radiação ultravioleta é a principal responsável por aumentar o estresse oxidativo da pele, causando excessiva produção de radicais livres, causando sérios danos ao tecido (WISUITIPROT et al., 2011). Assim, o uso da EGCG em protetor solar, para prevenção do fotoenvelhecimento e redução do risco de câncer de pele devido à exposição aos raios UV também tem sido relatado. Vários estudos tem sido desenvolvidos na Universidade de Medicina de Nova Jersey nos Estados Unidos visando avaliar o efeito protetor do chá-verde contra os raios ultravioleta (SENGER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010). Chanchal e Swarnlata (2009), obtiveram resultados promissores de atividade fotoprotetora, empregando extratos vegetais, incluindo o chá-verde.

2.4.4. Aplicações na área alimentícia

Diversos estudos na literatura científica têm reportado efeitos benéficos do chá-verde quando empregue como aditivo na indústria alimentícia como, por exemplo, em pães (WANG; ZHOU, 2004), biscoitos, maçã desidratada (LAVELLI et al., 2010), produtos cárneos (MITSUMOTO et al., 2005; O'SULLIVAN et al., 2004; TANG et al., 2001) e em óleos e gorduras (PAREJO et al., 2003; MENDONÇA, 2009; MARTÍNEZ et al., 2013).

A oxidação lipídica é uma das principais causas da deterioração da qualidade de produtos cárneos e avícolas. As carnes e aves vermelhas são altamente suscetíveis à oxidação lipídica devido ao seu alto teor de gordura (YILMAZ, 2006) e elevada proporção de ácidos graxos poliinsaturados. A degradação destes componentes presentes nos produtos cárneos é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores estranhos, após o cozimento e posterior ao armazenamento refrigerado. Portanto, para manter estes produtos por uma maior tempo é necessário utilizar substâncias antioxidantes. Senanayake (2013), utilizaram o extrato de chá-verde como antioxidante em hambúrgueres de peru, nas concentrações de 50 a 100 ppm. Os resultados mostraram que a adição de extrato retardou significativamente a oxidação do produto. O extrato de chá-verde também tem demonstrado ação antioxidante de lipídios presentes em produtos cárneos. Tang et al. (2001) e Mitsumoto et al. (2005), observaram uma elevada atividade antioxidante das catequinas do chá-verde em carne bovina e de frango.

Os resultados de inúmeras pesquisas também confirmam as propriedades antioxidantes das catequinas do chá-verde em vários produtos com alto teor de lipídios (AMAROWICZ; SHAHIDI, 1995; CHEN et al., 1996; FRANKEL et al., 1997; SENANAYAKE, 2013). Quando as catequinas do chá-verde são adicionadas em produtos como macarrão e óleos comestíveis como óleo de soja, óleo de peixe e banha de porco, foi evidenciado o aumento da estabilidade oxidativa dos produtos (FRANKEL, 2005; KOKETSU; SATOH, 1997). Em uma pesquisa envolvendo óleos de origem marinha, como gordura de foca, o chá-verde também demonstrou efeitos antioxidantes (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1998). Em estudo conduzido por Wanasundara e Shahidi (1998), o extrato de chá-verde adicionado no óleo de peixe apresentou desempenho na antioxidante comparável aos antioxidantes sintéticos convencionais como α -tocoferol, BHT, BHA e TBHQ.

2.5. Limitações da utilização de ativos vegetais

Os extratos de plantas são uma excelente fonte de compostos fenólicos com notada atividade antioxidante. Devido aos benefícios que podem conferir à saúde humana, estes compostos assumem grande relevância em vários setores industriais incluindo o farmacêutico e o alimentício. Entretanto, estes compostos são susceptíveis à instabilidades durante, por exemplo, seu processamento, que podem levar a alterações de estrutura do composto, antes de sua utilização (VICTORIA; ANANINGSIH; WEIBIAO, 2011).

De forma geral, a literatura relata que a estabilidade das catequinas do chá-verde está relacionada diretamente com o pH e a temperatura do meio. Em soluções ácidas ($\text{pH} < 4$), as catequinas do chá-verde são altamente estáveis. Entretanto, quando em meio alcalino ($\text{pH} > 8$), as mesmas apresentam-se altamente instáveis. Zhu et al. (1997), demonstraram que (-)

galato de epigallocatequina e (-) epigallocatequina eram mais instáveis do que (-) -epicatequina e (-) galato-epicatequina em uma solução de caráter básico. Em estudo da biodisponibilidade das catequinas após administração oral, ocorreu absorção parcial das moléculas, o que foi atribuído à instabilidade do (-) galato de epigallocatequina e (-) epigallocatequina no pH neutro ou alcalino do intestino.

Em um ambiente de temperaturas elevadas, as catequinas não se apresentam muito estáveis. O aquecimento pode acarretar na conversão da molécula no seu isômero correspondente, em um processo conhecido como a epimerização. Os tratamentos térmicos podem diminuir a atividade antioxidante das catequinas principalmente devido à processos de oxidação, degradação térmica, epimerização e polimerização (ANANINGSIH; SHARMA; ZHOU, 2013).

Outro fator relevante é o teor dos componentes fitoquímicos necessários para que se atinja o efeito esperado e que está ligado diretamente à sua biodisponibilidade. Contudo, esta característica está diretamente relacionada a fatores como solubilidade, metabolismo e interação com outros compostos presentes na alimentação (SENGER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010). Por essa razão, inúmeros resultados positivos observados em ensaios de laboratório não são muitas vezes reproduzidos em ensaios clínicos.

Neste contexto, a microencapsulação é uma tecnologia amplamente aplicada e que possibilita a proteção destes antioxidantes naturais, permitindo ainda a sua liberação controlada e outros benefícios particulares do sistema.

2.6. Microencapsulação de ativo vegetais

A microencapsulação de ativos vegetais é uma tecnologia que vem sendo empregada para solucionar os problemas relacionados com a estabilidade e biodisponibilidade de compostos ativos. Esta técnica consiste na inclusão do agente ativo em um invólucro protetor, o qual pode ser um filme composto de derivados de carboidratos, gomas, proteínas, lipídios ou polímeros. No entanto, a escolha do tipo de material irá depender de sua capacidade em conferir proteção e aumentar a estabilidade do princípio ativo (CHANCHAL; SWARNLATA, 2009; WISUITIPROT et al., 2011).

Estes sistemas podem conferir inúmeras vantagens a produtos naturais incluindo o aumento da solubilidade e biodisponibilidade, melhoria da atividade biológica, aumento da estabilidade, liberação sustentada, redução da degradação da molécula devido à ação de fatores físicos e químicos (SARAF, 2010). Por isso, esta tecnologia é de grande interesse não apenas para o setor farmacêutico, mas também para a indústria de alimentos (CHAMPAHNE; FUSTIER, 2007).

A abordagem quanto aos sistemas de encapsulação inclui sistemas emulsionados (microemulsões e nanoemulsões), lipossomas, complexação, cristais líquidos, entre outros. Vários estudos demonstram a eficiência quanto à proteção e aumento da atividade de extratos utilizando a tecnologia da microencapsulação. Dentre eles pode-se citar a encapsulação de chá-verde utilizando quitosana para uso tópico. Na forma livre os principais biocompostos do chá-verde (EGCG, ECG, EC, EGC) não são capazes de permear a pele e após a encapsulação observou-se resultados muito promissores, pois o sistema foi capaz de proteger os ativos da degradação enzimática e melhorar a capacidade de permeação (WISUITIPROT et al., 2011). Gortzi et al. (2008), avaliaram a encapsulação do extrato de *Myrtus communis* em sistema lipossomal analisando a atividade antimicrobiana antes e depois da adição do agente protetor. Observaram um significativo aumento na atividade antimicrobiana do extrato, apresentando potencial de aplicação como conservantes naturais. Outro estudo relacionado com a atividade antioxidante de extrato confirmou que após a encapsulação de *Origanum dictamnus* em carreadores lipossomais houve o aumento da atividade antioxidante (GORTZI et al., 2007).

2.7. Microencapsulação em sistemas lipídicos

Os carreadores lipídicos têm ganhado destaque a algumas décadas, devido às inúmeras vantagens que podem atribuir aos produtos naturais como o aumento da solubilidade, melhoria da atividade biológica, aumento da estabilidade, liberação sustentada e redução da degradação devido a ação de fatores físicos e químicos (TAN; RAO; PRESTIDGE, 2013; CORTÉS-ROJAS, SOUZA; OLIVEIRA, 2014).

Estes sistemas utilizam diferentes matrizes lipídicas obtendo-se sistemas auto-emulsificantes, emulsões secas, dispersões sólidas, lipossomas, micro e nano partículas lipídicas sólidas, entre outras. Os processos utilizados para obter tais sistemas são muito variados, os quais incluem homogeneização por alta pressão, *spray drying*, *spray cooling*, extrusão e tecnologia de fluidos supercríticos (JANNIN, MUSAKHANIAN; MARCHAUD, 2008).

De acordo com a composição do sistema e o método de preparo pode-se obter diferentes tipos de estruturas de encapsulação. Neste contexto, os sistemas lipídicos emulsionados possuem uma grande vantagem devido à capacidade de encapsular ativos hidrofílicos e lipofílicos, sendo ideal para formulações contendo grande quantidade de substâncias ativas como os extratos vegetais. Na Figura 3 apresenta-se um resumo dos principais sistemas de encapsulação, utilizando como referência um estudo realizado por McClements e Li (2010).

Figura 3 – Exemplos dos diferentes tipos de estruturas baseadas em sistemas emulsionados utilizados como sistemas de liberação (Fonte: MCCLEMENTS; LI, 2010).

2.8. Sistemas emulsionados

Uma emulsão é uma dispersão em que a fase dispersa é composta de pequenos glóbulos distribuídos em um veículo no qual é imiscível (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 1999). De forma geral, para que se obtenha um sistema estável é necessário o uso de uma terceira fase composta por agentes emulsionantes. Em um sistema em que a fase interna (ou dispersa) é oleosa e a fase externa (ou dispersante) aquosa, são denominados como sistemas óleo-em-água (O/A). Na situação inversa são conhecidas como sistemas água-em-óleo (A/O), podendo existir outros tipos de formação, como as emulsões múltiplas, que não serão aqui abordados (AULTON, 2005; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 1999).

As emulsões convencionais apresentam como característica visual a opacidade o que é atribuído às dimensões das gotículas que compõem o sistema. Na sua estrutura cada gotícula é normalmente rodeada por uma camada fina de emulsificante. Em geral, o diâmetro médio da gotícula pode variar de 100 nm a 100 µm (MCCLEMENT; LI, 2010). Na Figura 4, tem-se a representação de um sistema emulsionado.

Figura 4 – Representação da formação e estrutura de uma emulsão O/A.

As emulsões convencionais são mais propensas a separação de fase e agregação das gotículas, devido ao tamanho das gotículas. Quanto maior o tamanho da gotícula, maior será a carga de atração entre elas aumentando a instabilidade da formulação, o que acarreta na separação de fases. Em partículas muito pequenas pode ocorrer o fenômeno de floculação, que envolve a agregação das gotículas dispersas, fase anterior à coalescência, o que acarreta a separação de fases (AULTON, 2005; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 1999).

Neste contexto, o tamanho das gotículas apresenta grande importância para os sistemas emulsionados, exercendo grande influência na modulação da liberação do ativo. A razão da liberação do ativo tende a ser inversamente proporcional ao diâmetro das gotículas. Comparando-se, por exemplo, emulsões e nanoemulsões, considera-se que a difusão do composto neste último é superior, levando à maior biodisponibilidade do ativo (MCCLEMENTS; LI, 2010).

Portanto, o tamanho da partícula da fase dispersa deve ser controlado pelo método e pelas condições de produção da emulsão, assim como pelo tipo e concentração do emulsionante utilizado.

2.8.1. Técnicas de produção de emulsões

Os aspectos teóricos sobre as diferentes técnicas de preparação de emulsões podem ser divididos basicamente em métodos de alta e baixa energia. Os métodos de baixa energia fazem uso da energia armazenada dentro dos agregados moleculares formados por moléculas do tensoativo presentes na emulsão. Dentre eles pode-se citar a emulsificação espontânea, a difusão de solvente e de temperatura de inversão de fase. Os métodos que utilizam emulsificação de alta energia são baseados na geração de energia mecânica através de alta tensão de cisalhamento utilizando os homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores,

ou pela utilização de ultra-som (ABISMAIL et al., 1999; PORRAS et al. 2004; BRUXEL et al., 2012).

Normalmente estes métodos são utilizados para reduzir o tamanho das gotículas através da alta energia mecânica imposta ao sistema, a qual gera forças capazes de deformar e quebrar as gotículas da fase interna em tamanhos menores, podendo chegar à escala nanométrica. Em estudos laboratoriais, a produção ocorre normalmente em duas etapas: a primeira consiste na produção de uma emulsão grosseira para, em uma segunda etapa, reduzir o diâmetro de gotícula. Portanto, dependendo do método, o processo de emulsificação pode ser influenciado por diversos fatores, assim as condições de operação devem ser otimizadas visando a obtenção da emulsão com as características desejadas (BRUXEL et al., 2012).

2.8.2. Agentes emulsionantes

A escolha do agente emulsionante é uma das etapas iniciais da preparação de uma emulsão. No entanto, a escolha não depende apenas da sua capacidade emulsionante, mas também da via de administração específica e conseqüentemente sua toxicidade. Além disso, deve ser compatível com os outros componentes da formulação e não interferir na estabilidade e eficácia do agente terapêutico (AULTON, 2005; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 1999; MCCLEMENTS; LI, 2010).

A inclusão de um ou mais agentes emulsificantes facilita a emulsificação durante o processo de produção, além de garantir a estabilidade do produto durante o prazo previsto de validade. Há diferentes formas pela qual estes agentes exercem seu feito, entretanto todos apresentam em comum a capacidade em formar um filme, adsorvido ao redor das gotículas dispersas, entre as duas fases (AULTON, 2005; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 1999).

Existem muitos tipos de emulsionantes disponíveis no mercado, sendo divididos principalmente em dois grupos principais: substância de origem natural e seus derivados e agentes tensoativos sintéticos ou semi-sintéticos. De forma resumida, pode-se citar dentre os emulsionantes e estabilizantes:

- ❖ **Polissacarídeos:** pode-se citar os agentes naturais goma arábica, ágar e pectina. Estes materiais formam colóides hidrofílicos quando adicionado à água e em geral produzem emulsões O/A.
- ❖ **Substâncias protéicas:** a gelatina, a gema de ovo e caseína são exemplos de compostos protéico empregados na formação de formulações O/A.
- ❖ **Álcoois de alto peso molecular:** como exemplo se pode citar o álcool estearílico, o álcool cetílico e o monoestearato de glicerina. Normalmente são empregados como agentes espessantes e estabilizantes.

- ❖ **Tensoativos:** esses compostos possuem em sua estrutura um grupo hidrofílico e outro lipofílico. Normalmente, estes podem ser aniônicos, catiônicos e não-iônicos. Nos tensoativos aniônicos, a porção hidrofílica é carregada negativamente e nos catiônicos positivamente. Devido às suas cargas iônicas opostas os tensoativos aniônicos e catiônicos tendem a se neutralizar, sendo incompatíveis. Já os tensoativos não-iônicos não apresentam cargas. Dependendo da sua natureza, os tensoativos podem promover a formação de emulsões O/A ou A/O (AULTON, 2005; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 1999).

De forma geral, os agentes emulsionantes são capazes de alterar as características do sistema como o tamanho das gotículas, distribuição granulométrica e a forma de liberação do ativo. Os emulsionantes permitem o controle das propriedades interfaciais como carga, tamanho da gotícula, reologia e ainda auxiliam na resposta do sistema ao estresse ambiental, como o pH, força iônica, temperatura e atividade enzimática (MCCLEMENTS; LI, 2010).

2.8.3. *Sistemas lipídicos*

Comercialmente existe uma variedade de excipientes lipídicos, os quais incluem ácidos graxos (por exemplo, ácido oleico), óleos vegetais naturais (por exemplo, óleo de soja), glicerídeos semi-sintéticos (por exemplo Miglyol[®], Capmul[®] MCM, SterotexTM), polioxietileno glicóis (PEG) ou seus derivados (por exemplo, macrogolglycerides Labrasol[®], Labrafil[®], Gelucire[®]), glicéridos etoxilados (por exemplo, Cremophor), ésteres de ácidos graxos (por exemplo, poliálcool Solutol[®], Tween), ou ainda colesterol e fosfolípideos, por exemplo lecitina de ovo e de soja (TAN; RAO; PRESTIDGE, 2013).

As propriedades de auto-estruturação destes excipientes lipídicos têm sido explorada para o desenvolvimento de uma ampla variedade de estruturas carreadoras de fármacos, por exemplo, emulsões, microemulsões, micelas, transportadores de fase líquida cristalina, lipossomas, niossomas e vários sistemas auto-emulsionantes.

2.8.4. *Lecitinas e colesterol*

O fosfolipídio mais encontrado no reino vegetal e animal são as fosfatidilcolinas. Dentre as principais fontes de lecitina destacam-se a gema de ovo e o óleo de soja. A principal diferença entre as lecitinas está no número de insaturações da estrutura molecular relacionada com a proporção dos ácidos graxos esterificantes. Neste sentido, a lecitina de soja possui um número maior de cadeias carbônicas e por isso um maior número de insaturações (PARKS;

HELLERSTEIN, 2006). Na Figura 5 apresenta-se alguns tipos de fosfolipídeos e suas estruturas químicas.

Os esteróides também estão presentes na membrana de animais e quando associados ao fosfolipídio auxiliam na formação e estruturação do sistema lipídico (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000). O colesterol possui propriedades lipofílicas e na bicamada lipídica este se organiza entre as moléculas de fosfolipídio com o grupo hidroxila voltado para a fase aquosa. Possui um anel tricíclico que se liga entre os carbonos das cadeias de ácidos graxos, realizando o empacotando das moléculas na bicamada (HASHIDA; KAWAKAMI; YAMASHITA, 2005). Portanto, com este arranjo, o colesterol consegue melhorar a fluidez da estrutura fosfolipídica, o que reduz sua permeabilidade e aumenta a estabilidade na presença, por exemplo, de fluídos biológicos (PARKS; HELLERSTEIN, 2006).

Fosfolipídeos (R ₃)	Cadeia hidrofóbica de ácido graxo (R ₁ e R ₂)	Nomenclatura e abreviatura	T _c (°C)	Carga
Fosfatidilcolina (PC) CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	CH ₃ (CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -(O)-	Dioleilfosfatidilcolina (DOPC)	<0	Anfótera
	CH ₃ -(CH ₂) ₁₂ -C(O)-	Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)	23	Anfótera
	CH ₃ -(CH ₂) ₁₄ -C(O)-	Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)	42	Anfótera
	CH ₃ -(CH ₂) ₁₆ -C(O)-	Diesteroilfosfatidilcolina (DSPC)	55	Anfótera
Fosfatidiletanolamina (PE) CH ₂ CH ₂ NH ₃	CH ₃ (CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -(O)-	Dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE)	<0	Anfótera
	CH ₃ -(CH ₂) ₁₆ -C(O)-	Diesteroilfosfatidiletanolamina (DSPE)	74	Anfótera
Fosfatidilglicerol (PG) CH ₂ CHOHCH ₂ OH	CH ₃ -(CH ₂) ₁₂ -C(O)-	Dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG)	13	Negativa
	CH ₃ -(CH ₂) ₁₄ -C(O)-	Dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG)	35	Negativa
Fosfatidilserina (PS) CH ₂ CHNH ₃ ⁺ COO ⁻	CH ₃ -(CH ₂) ₁₄ -C(O)-	Dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS)	79	Negativa
	CH ₃ -(CH ₂) ₁₆ -C(O)-	Diesteroilfosfatidilserina (DSPS)	79	Negativa

Figura 5 – Exemplos de fosfolipídios (Fonte: BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

2.9. Estabilidade de sistemas lipídicos

A estabilidade é definida como a capacidade de um produto em manter as suas características físico-químicas dentro dos limites especificados, de forma a garantir a eficácia e segurança do produto. A estabilidade de sistemas lipídicos pode ser afetada por processos químicos, físicos e biológicos. Dependendo da sua composição, as formulações lipídicas podem apresentar um curto tempo de meia-vida em parte devido à instabilidades físicas e químicas. Os sistemas lipídicos, em especial a fosfatidilcolina, possuem uma baixa estabilidade devido a sua estrutura química. Este fato se deve ao número de insaturações

contidas na estrutura molecular destes lipídeos, o que as torna mais sensíveis a reações de peroxidação (FIDORRA et al., 2006).

Alguns estudos reportam que a fosfatidilcolina de soja hidrogenada tem apresentado bons resultados no aumento da estabilidade das membranas lipídicas, intensificada pelo uso do colesterol. Pietzyk e Henschke (2000) e outros autores revelam que a fosfatidilcolina de soja hidrogenada é menos susceptível à degradação por oxidação devido ao maior número de insaturações (CHORILLI; RIMÉRIO; OLIVEIRA, 2007; CHOUGULE; PADHI; MISRA, 2007). Em contrapartida, ao uso do colesterol é atribuída a capacidade de empacotar as moléculas fosfolipídicas, o que aumenta significativamente a sua temperatura de transição vítrea e induz à formação de uma estrutura mais organizadas e mais rígida, com menor mobilidade (TIROSH, et al. 1997; LIMA, 1998; LEE et al., 2005).

Contudo, o meio aquoso é o principal favorecedor a ocorrência de reações químicas, as quais aceleram a degradação química e física dos fosfolipídeos, o que pode causar a redução da eficácia devido aos produtos da degradação que podem até mesmo apresentar efeitos colaterais indesejados (GRIT; CROMMELIN, 1993). Os problemas estão associados com a degradação de lipídios por hidrólise, oxidação, sedimentação, agregação, escape do fármaco ou fusão de partículas durante armazenamento (CHENGJIU; RHODES, 1999). Em geral, todos os tipos de ácidos graxos estão susceptíveis a oxidação que ocorre nas cadeias livres pela presença das duplas ligações na estrutura (GRIT; CROMMELIN, 1993; MOHAMMED et al., 2006).

Neste contexto, os produtos em estado sólidos são reconhecidamente mais estáveis do que soluções aquosas ou dispersões (INGVARSSON et al., 2011). Desta forma, ao eliminar a água presente no sistema, etapa que pode ser realizada por inúmeros processos de desidratação, é esperado um aumento significativo no tempo de prateleira de um produto. Assim, operações como liofilização, secagem por *spray drying* ou *spray freeze drying*, entre outros, produzindo sistemas na forma de pós, são capazes de aumentar a estabilidade e superar os problemas de degradação (NIVEM, 1995; COURRIER; BUTZ; ADAMME, 2002).

2.10. Secagem de sistemas lipídicos

A desidratação ou secagem é vista como meio viável para a estabilização de sistema coloidais lipídicos, facilitando o armazenamento, transporte e estabilidade do produto (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; INGVARSSON et al., 2011). As principais vantagens atribuídas a este processo são:

- ❖ **A possível redução no volume de administração:** neste caso a conversão de emulsões líquidas ou suspensões pode reduzir o volume consideravelmente (mais de 50 %) na conversão para o estado seco.
- ❖ **Maior precisão na dosagem:** a incorporação do produto em cápsulas ou comprimidos fornecem uma dosagem mais exata e precisa, em comparação com a administração de um volume prescrito de uma suspensão usando uma seringa ou uma colher.
- ❖ **A facilidade de transporte e de armazenagem:** as formulações líquidas são normalmente mais volumosas e propensas a reações de instabilidade, além de proliferação microbiana. Também necessitam de espaços maiores para armazenamento e sistemas de refrigeração para transporte e armazenamento, para garantir um maior prazo de validade.
- ❖ **Melhor adesão do paciente:** é geralmente preferida por pacientes adultos para administrar cápsulas/ comprimidos, em vez de uma formulação líquida.

2.11. Tecnologias de secagem

Uma forte tendência das indústrias tem sido a substituição de produtos na forma fluida pela forma sólida. Os produtos secos possuem várias vantagens, dentre as quais pode-se citar: maior estabilidade física, química e microbiológica, além da facilidade para o armazenamento e transporte dos produtos no mercado (INGVARSSON et al., 2011).

De uma forma simplificada, a secagem pode ser definida como o processo pelo qual uma substância volátil presente em um material passa para o estado gasoso através do fornecimento de calor. Este processo reduz a atividade de água (quantidade de água disponível para reações químicas) permitindo que o produto seja armazenado em temperatura ambiente (OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009).

Durante a escolha de um processo de secagem, é de grande importância avaliar características como: custo do produto a ser processado, propriedades físicas e químicas do material, sensibilidade térmica e a aplicação (OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009). Isso porque durante o processo de desidratação podem ocorrer várias reações favoráveis ou mesmo desfavoráveis para o produto final de acordo com a metodologia empregada.

2.12. *Spray drying*

Por definição, a secagem por nebulização ou *spray drying* consiste na alimentação e nebulização de soluções ou suspensões em uma câmara de gás quente, que ao entrar em contato com as gotículas, promove a transferência de calor que evapora todo o solvente, formando uma partícula sólida. Desta forma, o processo consiste basicamente em três etapas

fundamentais: atomização, desidratação e coleta do pó (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; INGVARSSON et al., 2011).

Um secador *spray dryer* é composto por um sistema de alimentação do ar de secagem, sistema de alimentação e atomização da composição de secagem, câmara de secagem e sistema de coleta do produto (ciclone). Quanto ao tipo de atomizador são classificados em três tipos principais: pneumáticos, pressurizados e centrífugos, sendo este último efetivo para soluções e suspensões, podendo ser empregado para a secagem de líquidos de elevada viscosidade ou até mesmo pastas. Os atomizadores pneumáticos e os de pressão são mais propensos a oclusão dependendo do material utilizado, embora permitam a obtenção de partículas de diversos diâmetros (OLIVEIRA, PETROVICK, 2010). Nas Figuras 6 e 7, respectivamente, pode-se visualizar os atomizadores pneumático e centrífugo e diferentes configurações de secador do tipo *spray dryer*.

Figura 6 – Atomizadores pneumático (A) e de disco rotatório (B). (Fonte: OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Figura 7 – Representação das diferentes configurações de secadores do tipo *spray dryer* (Fonte: MELONI, 2003).

Atualmente, o *spray dryer* é aplicado em diversas operações industriais, entre as quais pode-se citar a secagem de polpas e sucos de frutas (CANO-CHAUCA et al., 2005; ÓBON et al., 2009), extratos vegetais (CRNKOVIC, 2012; ZAMPIÉR, 2012; FERNANDES, 2013), enzimas (GONÇALVES et al., 2013), encapsulação de óleos essenciais e aromas (JAFARI et al., 2008). O curto tempo de permanência do produto dentro do equipamento permite o seu uso, por exemplo, na secagem de materiais termo-sensíveis. Outra grande vantagem é a possibilidade da obtenção de produtos secos com propriedades pré-definidas. A umidade do pó, a solubilidade, o tamanho da partícula, fluidez e densidade aparente são propriedades de fundamental importância e que podem ser controladas pela seleção de condições operacionais adequadas (TEIXEIRA, 2010; FERNANDES, 2013).

Com relação a outros tipos de secadores, em especial a liofilização, o *spray drying* oferece várias vantagens, como o tipo de partícula produzido, permitindo uma otimização do produto seco, além do baixo custo de operação e a rapidez do processo. Especificamente quanto a produção de lipossomas, é possível o seu preparo direto sem prévia formação, o que pode contornar riscos como a de fusão e agregação, e o rompimento da estrutura da bicamada da membrana durante a desidratação (INGVARSSON et al., 2011). Dentre as desvantagens

que podem ser citadas para este método são: grandes dimensões e custo de implantação do equipamento, porém o valor final do produto pode justificar seu emprego.

A operação utilizando sistemas lipídicos requer cuidados para que se obtenha maiores taxas de recuperação. O parâmetro operacional reportado na literatura para tais sistemas prevê o uso da temperatura de saída abaixo, ou no limite, da temperatura de transição vítrea do material lipídico. Dentre estes estudos pode-se destacar o uso da fosfatidilcolina de soja para obter formulações secas pelo método de *spray drying* tendo como carreador de secagem, a lactose, a uma temperatura de entrada de 110 °C e a de saída de 75 – 80 °C (GOLDBACH; BROCHART; STAMM, 1993).

2.13. Carreadores tecnológicos

Os carreadores de secagem, também conhecidos como estabilizadores ou crioprotetores são utilizados durante o processo de secagem para prevenir a desestabilização do produto durante o processo de secagem (CROWE; CROWE, 1995; INGVARSSON et al., 2011). Assim, diferentes excipientes têm sido identificados e comumente aplicados como estabilizadores para a secagem de formulações lipídicas (INGVARSSON et al., 2011).

Atualmente a trealose é considerada padrão ouro, sendo o excipiente de escolha na maioria dos estudos da literatura. Trata-se de um dissacarídeo não redutor com uma elevada temperatura de transição vítrea e que consegue ter uma boa interação com a bicamada lipídica através de ligações de hidrogênio (CROWE; CROWE; CHAPMAN, 1984; CROWE; CROWE, 1995). A trealose é normalmente usada em estudos comparativos em parte devido a sua alta temperatura de transição vítrea e o baixo peso molecular (INGVARSSON et al., 2011).

Crowe e Crowe (1988), estudaram a quantidade de trealose necessária para inibir o escape do material encapsulado e a fusão entre os lipossomas durante a secagem por liofilização. Concluíram que aproximadamente 1,6 g de trealose por grama de lipídeo seriam necessários para estabilizar o sistema. Yokota, Moraes e Pinho (2012), avaliaram a viabilidade do uso de fosfolipídios puros e não-puros na encapsulação de caseína hidrolisada pelo método de evaporação do solvente e posterior liofilização avaliando o uso da trealose e da sacarose como carreadores tecnológicos. Os autores observaram que não houve alterações significativas na eficiência de encapsulação e no tamanho de partícula. A análise morfológica evidenciou a prevenção quanto a fusão e agregação das partículas.

O uso de dissacarídeos como a sacarose, lactose e trealose na estabilização de sistemas lipídicos à base de lecitinas durante a secagem tem apresentado bons resultados (VICTORIA; ANANINGSIH; WEIBIAO, 2011; INGVARSSON et al., 2011; INGVARSSON et al., 2013).

A proporção lipídeo:carreador tem se mostrado mais promissora mantendo a relação 1:1 (CHARNVANICH; VARDHANABHUTI; KULVANICH, 2010).

2.14. Propriedades físico-químicas do produto

A caracterização físico-química do produto de secagem é uma etapa muito importante, considerando sua importância na funcionalidade e na estabilidade do produto final. De forma geral, propriedades relevantes dos pós secos são a umidade final, a atividade de água, distribuição de tamanhos das partículas, morfologia, porosidade, densidade aparente, fluidez, compactabilidade, resistência mecânica, cristalinidade ou polimorfismo e temperatura de transição vítrea (OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009), que serão abordadas rapidamente à seguir.

❖ *Teor de umidade e atividade de água*

O teor de água de um produto possui relação direta com sua estabilidade e tem relação com a eficiência do processo de secagem. Além de favorecer reações químicas como a hidrólise, a umidade pode facilitar a proliferação de microorganismos. Outras propriedades do pó como as propriedades de fluidez também são diretamente influenciados pela umidade (BETAGIRI; JENKINS; PARSONS, 1993; WEC; CROMMELIN, 1997; OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009; CORTES-ROJAS; OLIVEIRA, 2012). No produto tem-se a água livre e a água ligada. A água livre se encontra disponível o crescimento de microorganismos e reações de hidrólise. A forma de medir este parâmetro é através da determinação da atividade de água (FERREIRA NETO; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2005). A água ligada é aquela que está diretamente ligada ao produto e não está diretamente disponível.

❖ *Distribuição do tamanho de partículas*

O tamanho médio e a distribuição de tamanho das partículas são importantes em etapas posteriores do processamento tecnológico. O tamanho da partícula possui influência direta em características como, por exemplo, a dissolução. Por exemplo: partículas pequenas tendem a dissolver mais rapidamente, aumentando a taxa de dissolução. No entanto, se forem muito finas pode dificultar a molhabilidade do pó causando aglomeração das partículas (SOUZA, 2003; CORTES-ROJAS; OLIVEIRA, 2012). Para se definir a distribuição do tamanho de partículas ou comparar a característica entre diferentes pós pode-se realizar uma curva de distribuição granulométrica, que é a representação do diâmetro das partículas em diferentes intervalos de tamanhos. Dentre os métodos de análise do tamanho e distribuição

das partículas pode-se citar a tamisação, microscopia, dispersão de luz laser e por sedimentação (AULTON, 2005).

❖ **Morfologia**

As características morfológicas de uma partícula são de fundamental importância por serem capazes de revelar os aspectos superficiais como o tamanho, forma e estrutura, que estão diretamente relacionadas com as propriedades dos pós. Aspectos morfológicos estão intimamente relacionados com a área superficial de contato que irá influenciar em características como solubilidade e dissolução, ou ainda nas propriedades de fluidez e compactabilidade dos pós (OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009; YOKOTA; MORAES; PINHO, 2012).

❖ **Porosidade**

A porosidade de uma partícula é influenciada pelo processo de secagem e condições operacionais utilizadas. Características que são diretamente relacionadas com a porosidade são as propriedades de fluidez, molhabilidade e, principalmente compressibilidade. Pode-se dizer que uma maior porosidade conduz a uma maior compressibilidade, o que acarreta em grânulos mais compactos reduzindo, por exemplo, a taxa de desintegração ou a liberação de fármacos (AULTON, 2005).

❖ **Densidade aparente**

A densidade é a relação entre a massa e o volume ocupado por um material. Características como tamanho, forma e porosidade das partículas são determinantes para esta propriedade. Pós ou grânulos de densidade muito baixa não são adequados para compressão e para o enchimento de cápsulas, por exibirem elevado volume por unidade de massa de produto (AULTON, 2005; OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009).

❖ **Escoabilidade (fluidez)**

A escoabilidade ou fluidez de um pó são muito importantes por serem fatores diretamente ligados ao processamento de um produto. Por exemplo, durante o enchimento de cápsulas ou na compressão de comprimidos, taxas de escoamento baixas podem causar problemas durante o processo e heterogeneidade das doses. Medidas indiretas da fluidez de um material particulado são realizados pelo ângulo de repouso e fator de Hausner. A fluidez de um material particulado podem ser modificadas pela adição de, por exemplo, agentes lubrificantes (AULTON, 2005; OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009).

❖ *Compactabilidade*

O processo de compactação é utilizado para a produção de comprimidos, grânulos e pellets, por exemplo. Desta forma, é necessário que o material seja capaz de se acomodar rapidamente com a pressão aplicada. Partículas muito porosas apresentam problemas na compactação, podendo provocar defeitos no produto, como por exemplo em comprimidos, facilitando a sua quebra. A capacidade de consolidação do material é indicada usualmente pelo índice de Carr (AULTON, 2005; OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009).

❖ *Resistência mecânica*

Partículas secas devem ter uma boa resistência mecânica para as etapas subseqüentes de processamento, transporte e armazenagem do produto. Na área farmacêutica, testes como a medida da friabilidade ou dureza são recomendados pela Farmacopéia Brasileira (AULTON, 2005; OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009).

❖ *Cristalinidade ou polimorfismo*

Trata-se do arranjo das moléculas de uma estrutura, capaz de alterar significativamente as propriedades de um produto, principalmente no que se refere a valor terapêutico, por interferir em aspectos como biodisponibilidade e estabilidade. Isso é influenciado pelos diferentes graus de cristalinidade, surgimento de diferentes formas cristalinas ou polimorfos de um ativo. Os processos de solubilização, aquecimento e fusão que ocorrem durante uma secagem alteram estas características dos fármacos e sua ação. Estas propriedades normalmente são detectadas por técnicas como infravermelho, difração de raios-X e calorimetria diferencial de varredura (AULTON, 2005; OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009).

❖ *Transição vítrea*

Transição vítrea é definida pela temperatura na qual ocorre uma mudança de fase de segunda ordem nos materiais amorfos. É específica para cada material e corresponde a uma transição de ordem estrutural, levando a uma mudança da mobilidade e flexibilidade molecular. Nessa temperatura o sistema passa de um estado vítreo para o estado gomoso. O estado vítreo é caracterizado por alta viscosidade, rigidez e estabilidade, dada por uma baixa mobilidade molecular, onde os movimentos moleculares estão restritos. No estado gomoso a viscosidade diminui bruscamente e aumenta a mobilidade das cadeias de macromoléculas (BERTAN, 2003). Neste caso, dependendo da temperatura de transição vítrea o material poderá apresentar problemas de adesão durante a secagem reduzindo a eficiência do processo.

Este problema é especialmente sensível em extratos de plantas medicinais, que contêm açúcares e ácidos orgânicos, em carreadores lipídicos e poliméricos (YOKOTA; MORAES; PINHO, 2012).

2.15. Potencial aplicação do produto final

A oxidação lipídica é uma das alterações mais importantes que afetam os alimentos que contem óleos e gorduras. Trata-se do principal responsável pelo desenvolvimento de sabor desagradável e o odor em alimentos, tornando-os impróprios para o consumo. Desta forma, a utilização de antioxidantes na composição destes alimentos permite uma maior vida útil dos produtos (MENDONÇA, 2009).

Embora o uso de antioxidante seja benéfico na preservação de alimentos, o uso de antioxidantes sintéticos tem sido cada vez mais restringido em consequência dos efeitos nocivos observados experimentalmente (SHAHIDI; ZHONG, 2005). Em alguns países o uso destes aditivos passou até mesmo ser restringido, devido a evidências que confirmam a susceptibilidade do desenvolvimento de doenças como carcinoma de estômago, efeitos deletérios nos pulmões, fígado e sangue quando expostos a certas quantidades de BHT e BHA, por exemplo (ANTOLOVICH et al., 2002; RAMALHO, JORGE, 2006).

Neste contexto, evidencia-se a existência de um grande interesse na obtenção e utilização dos antioxidantes provenientes de fontes naturais, porque se presume que o uso destes compostos sejam mais seguros (SHAHIDI; ZHONG, 2005). Muitos compostos de ocorrência natural de ervas e especiarias têm sido amplamente estudados por sua ação antioxidante (FRANKEL, 2005; MAESTRI et al. 2006; YANISHLIEVA; MARINOVA, 2001; ZHANG et al., 2010).

Conforme avaliado em toda revisão, o chá-verde apresenta grande potencial como antioxidante natural, e após o desenvolvimento do produto, propõe-se avaliar a capacidade antioxidante do produto como conservante de óleos e gorduras, de forma a introduzir uma aplicação tecnológica.

2.15.1. Antioxidantes para óleos e gorduras

O desenvolvimento de compostos indesejáveis oriundos da oxidação lipídica é um problema a ser resolvido para prolongar a vida útil de óleos, gorduras e alimentos ricos em lipídeos (GORDON, 2001). O óleo de soja é amplamente utilizado no Brasil considerando sua disponibilidade e preço, no entanto, apresenta grande susceptibilidade à oxidação, uma vez que possui altos teores de ácidos graxos insaturados em sua composição (ABIOVE, 2014;

ARAÚJO, 2004). Nesse contexto, torna-se uma matriz relevante para estudos com antioxidantes.

Para avaliação da oxidação, e consequentemente dos antioxidantes em alimentos pode ser utilizado o teste acelerado de estabilidade oxidativa em Rancimat. Este teste possui ampla aceitação devido à facilidade de uso, reprodutibilidade e baixo custo de operação e a não utilização de reagentes químicos (MENDONÇA, 2009).

2.15.2. Estudo acelerado da estabilidade oxidativa utilizando o método Rancimat

De forma geral, os óleos naturais possuem uma baixa estabilidade durante o armazenamento, sendo oxidados principalmente pelo oxigênio atmosférico. O processo de oxidação que ocorre lentamente à temperatura ambiente é denominado como reações de auto-oxidação. Este processo se inicia com a cadeia dos ácidos graxos insaturados sofrendo um processo envolvendo vários estágios, o que resulta em diversos produtos de degradação, dentre os quais encontram-se os peróxidos a partir da oxidação primária e os alcoóis, aldeídos e ácidos carboxílicos como produtos secundários da oxidação.

Em um teste de oxidação rápida, o estado de oxidação pode ser representado em função do tempo, obtendo-se uma curva a partir do monitoramento da produção de peróxidos. O tempo decorrido até ao ponto de inflexão de curva (ponto de máxima variação de velocidade de oxidação) denomina-se por período de indução (PI), representado pelo tempo necessário para que os compostos de degradação sejam produzidos (PEREIRA, 2010).

O Rancimat é um equipamento projetado para acelerar o processo de oxidação de materiais lipídicos pela ação da temperatura e do oxigênio do ar. Os produtos formados pela oxidação são altamente voláteis e através do fluxo de ar são levados para uma célula de condutividade contendo água destilada. A água absorve os compostos, que serão detectados através da alteração da condutividade do meio (FAÍSCA, 1998; MENDONÇA, 2009; PEREIRA, 2010). Na Figura 8, apresenta-se o equipamento Rancimat utilizado para tais testes, e um esquema de seu princípio de operação.

Desta forma determina-se o período de indução, que é o tempo que a amostra demora a produzir os compostos de degradação. O método permite estimar a atividade de proteção dos antioxidantes quando adicionados em óleo puro. O efeito de proteção ou fator de proteção (FP) é consequência da ação do aditivo incorporado a determinado produto, sendo estimado pela razão entre o PI do produto com incorporação do aditivo e o seu PI sem qualquer aditivo, denominado como amostra de controle (FAÍSCA, 1998).

Figura 8 – Representação de um equipamento Rancimat® e esquema de seu princípio de operação.

2.16. Relevância do tema

A *Camellia sinensis* é uma espécie vegetal pertencente à família *Theaceae* que tem recebido grande atenção devido a comprovações científicas de várias atividades biológicas (antioxidante, antiinflamatória, antibacteriana), as quais podem ser associadas a substâncias ativas presentes em preparações contendo a planta ou suas partes (folhas).

A encapsulação de ativos vegetais é uma tecnologia que vem sendo empregada para solucionar os problemas relacionados com a estabilidade e biodisponibilidade dos biocompostos, sendo capaz de manter a estabilidade do ativo até o momento do consumo, e proporcionar sua liberação em um alvo fisiológico específico, ou ainda proporcionar outras aplicações ao produto. A crescente necessidade de novas alternativas encapsulação de ativos levou ao desenvolvimento deste trabalho que tem por objetivo principal a sistematização de metodologias científicas a serem empregadas no desenvolvimento, produção e avaliação da qualidade de uma matéria-prima utilizando o extrato bruto da *Camellia sinensis* como fonte de bioativos.

Dentre os sistemas lipídicos, a fosfatidilcolina e o colesterol têm sido utilizados como agentes encapsuladores mostrando-se muito promissores (principalmente quando associado a tecnologias de secagem visando a necessidade de preservação de sua estabilidade), proporcionando maior atividade biológica e biodisponibilidade, além de mascarar características como sabor e odor desagradáveis, que poderiam prejudicar seu uso como medicamento ou suplemento/aditivo alimentar.

O uso de metodologias analíticas para controlar a qualidade de produtos naturais, em termos de eficácia e segurança, é cada vez mais exigido pelos órgãos reguladores incentivando a sua padronização e caracterização, visando o estabelecimento de parâmetros de qualidade para a matéria-prima vegetal (incluindo extratos vegetais e fitoconstituintes) e para o produto final (forma farmacêutica).

Nas páginas seguintes, será abordada de maneira sistemática a obtenção do extrato seco de *Camellia sinensis*, a incorporação dos ativos no carreador lipídico visando a obtenção de uma emulsão seca, caracterização das formulações e otimização do processo de produção, além da avaliação da atividade *in vitro* do produto final pelo método acelerado de estabilidade oxidativa utilizando o Rancimat[®]. Um fluxograma das etapas realizadas durante a execução deste projeto de pesquisa encontra-se no Anexo A, visando facilitar o entendimento do leitor quanto à forma de condução do trabalho.

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este trabalho teve or objetivo geral a encapsulação de compostos bioativos presentes no chá-verde em carreadores lipídicos, empregando-se composições à base de fosfatidilcolina de soja e colesterol, seguida por secagem por *spray drying* enfatizando-se os processos de preparação, tipo de excipiente e procedimentos empregados para caracterização físico-química, estabilidade e avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do produto obtido.

3.2. Objetivos específicos

Com o objetivo de investigar o potencial tecnológico para a encapsulação de bioativos do chá-verde em sistemas lipídicos utilizando a tecnologia de secagem por *spray drying*, as seguintes etapas foram realizadas:

- ❖ Levantamento bibliográfico;
- ❖ Extração dos compostos bioativos do chá-verde e obtenção do extrato bruto e liofilizado;
- ❖ Desenvolvimento e/ou adaptação de métodos analíticos para caracterização físico-química dos extratos bruto (concentrado e liofilizado)e dos sistemas encapsulados obtidos;
- ❖ Desenvolvimento de sistemas lipídicos encapsulados contendo bioativos do chá-verde (estudo do diagrama ternário de fases, método de preparo das formulações, utilização de sistemas co-solvente, avaliação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) entre outras).
- ❖ Padronização de metodologias para caracterização das propriedades físicas das formulações obtidas (análise macroscópica, microscopia, centrifugação, reologia, estresse térmico, potencial zeta e tamanho de partícula).
- ❖ Estabelecimento dos parâmetros operacionais do processo de secagem por *spray drying* (otimização das condições operacionais).
- ❖ Avaliação das propriedades físico-químicas do produto seco obtido (teor de umidade, atividade de água, distribuição granulométrica e tamanho médio de partícula, morfologia, propriedades de fluidez dos pós, difração de raios-x, eficiência de encapsulação dos compostos bioativos na matriz lipídica, resispersão do produto e desempenho da secagem).

- ❖ Avaliação da estabilidade oxidativa utilizando o método Rancimat (avaliação da dose-resposta, efeito sinérgico dentre os antioxidantes presentes no chá-verde encapsulado e antioxidantes sintéticos como BHT e BHA. Incluindo a determinação do prazo de validade do óleo de soja (controle) adicionado dos antioxidantes encapsulados obtidos neste trabalho.
- ❖ Avaliação do potencial tecnológico do secador *spray drying* na obtenção de antioxidantes naturais encapsulados em sistemas lipídicos visando o aumento da estabilidade e biodisponibilidade dos compostos bioativos de interesse.

4. Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matéria-prima vegetal

A matéria-prima vegetal, constituída por folhas secas e moídas de Chá-verde (*Camellia sinensis*), foi adquirida de produtor agrícola da região do Vale do Ribeira (Sítio Braço do Capinzal, Registro, SP). A confirmação da identidade da planta foi realizada através do reconhecimento dos marcadores químicos presente no material vegetal previamente validado, conforme descrito no item 4.9.

4.2. Lipídeos e agentes emulsificantes

Os lipídeos selecionados para o desenvolvimento deste projeto foram a fosfatidilcolina de soja hidrogenada 90 % (Phospholipon[®] 90H, Lipoid GMBH, Ludwigshafen, Alemanha) e o colesterol 94 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os sistemas emulsificantes avaliados foram:

- ❖ Tween 20: polissorbato 20 – EHL 16,7; LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil;
- ❖ Tween 80: polissorbato 80 – EHL 15; LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil;
- ❖ Span 80: monoleato de sorbitano – EHL 4,3; LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil;
- ❖ Gelucire[®] 44/14: glicerídeos semi-sintéticos – EHL 14, Gattefossé, France;
- ❖ Steareth 20: álcool estearílico/ Unitol[®] – MAPRIC Produtos Farmacêuticos e Cosméticos, São Paulo, Brasil.

4.3. Carreadores de secagem

A adição de carreadores de secagem visa melhorar o desempenho do processo de secagem, contribuir na proteção dos compostos bioativos e melhorar as características farmacotécnicas do produto. Os carreadores de secagem avaliados foram a lactose M-200 (Natural Pharma Produtos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e a D(+) trealose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); sendo avaliado a influência sobre o processo de secagem e a qualidade físico-química do produto seco.

4.4. Óleo vegetal

O óleo de soja bruto foi gentilmente cedido pela Coplacana, Cooperativa dos Plantadores de Cana do Estado de São Paulo (SP, Brasil), isento de antioxidantes. Após o

recebimento, as amostras foram armazenadas a 4 °C, em ausência de luz, até o momento da análise.

4.5. Reagentes, soluções e padrões de referência

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os reagentes, soluções e padrões de referência listados a seguir:

- ❖ Ácido acético glacial (LabSynth);
- ❖ Ácido clorídrico (LabSynth);
- ❖ Água purificada (osmose reversa);
- ❖ Água ultrapura (MilliQ);
- ❖ Álcool etílico absoluto (LabSynth);
- ❖ Álcool iso-butílico (LabSynth);
- ❖ Álcool n-butílico (LabSynth);
- ❖ Álcool terc-butílico (LabSynth);
- ❖ Metanol (LabSynth);
- ❖ Metanol pureza > 99,9 % (Chromasolv[®] Sigma Aldrich);
- ❖ Padrão de cafeína (Sigma Ultra, EC: 200-362-1);
- ❖ Padrão de galato de epicatequina 98% (Sigma Aldrich, CAS: 1257-08-5);
- ❖ Padrão de galato de epigallocatequina 95% (Sigma Aldrich, CAS: 989-51-5).

4.6. Equipamentos

Os equipamentos utilizados na execução do trabalho encontram-se descritos à seguir:

- ❖ Agitador magnético Fisatom, Modelo 753;
- ❖ Agitador multiprovas com aquecimento IKA Modelo RT15;
- ❖ Analisador de potencial zeta, Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments;
- ❖ Analisador de tamanho de partículas, Dynamic Light scattering, Beckman Coulter LS13 320;
- ❖ Balança analítica Marte (500 g e 5000 g);
- ❖ Balança analítica Mettler Tolleto (250 g);
- ❖ Balança analítica, Shimadzu, modelo AUW220D;
- ❖ Banho termostatizado Brookfield, Modelo TC - 500;
- ❖ Banho-maria Fisatom, Modelo 550;
- ❖ Centrifuga, Fanem Modelo 206;
- ❖ Condutivímetro, Methrohm, Módulo de condutividade 856;
- ❖ Cromatógrafo líquido de alta eficiência – UV, Shimadzu Prominence;

- ❖ Estufa de secagem e esterilização Fanem, Modelo 315 SE;
- ❖ Evaporador rotativo Fisatom Modelo 802;
- ❖ Homogeneizador de alta pressão, Panda Plus 2000;
- ❖ Liofilizador Micromodulyo - 1,5 L, Modelo VLP 195 FD - 115 da Thermo Fischer Scientific;
- ❖ Medidor de atividade de água AquaLab 4TEV (Decagon Devices; Pullman, WA-USA);
- ❖ Microscópio eletrônico de varredura Inspecione F-50 FEI, Nederland;
- ❖ Microscópio óptico Olympus[®] – Modelo BX60MIV operando o *software* Image Pro-plus versão 7.0;
- ❖ pH-metro, Micronal, Modelo B474;
- ❖ Processador ultrassônico Sonics VC 750 e acessórios;
- ❖ Rancimat, Methrohm 873;
- ❖ Reômetro Brookfield Modelo LV-DV III;
- ❖ Sistema de filtração à vácuo;
- ❖ *Spray dryer* SD-05 LabPlant, Reino Unido;
- ❖ Titulador Karl Fischer, Methrohm 870 KF Titrino Plus;
- ❖ Ultra-som Odontobrás, Modelo 802;
- ❖ Ultraturrax, IKA, T18 basic.

4.7. *Spray dryer*

Utilizou-se o *spray dryer* de escala laboratorial, modelo SD-05 fabricado pela Lab-Plant, Reino Unido, que possui uma câmara de secagem de 215 mm de diâmetro e 500 mm de altura (Figura 9). Os principais componentes do sistema são:

- ❖ Sistema de alimentação de suspensão, que é composto por uma bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Parmer, modelo 7553-75, 6 a 600 rpm) e um atomizador de duplo fluido (mistura interna) a ar comprimido, com diâmetro do orifício de atomização de 1 mm;
- ❖ Sistema de alimentação do ar de secagem, constituído por um compressor e filtro de ar (operação concorrente);
- ❖ Sistema de controle de temperatura do gás de secagem, e
- ❖ Sistema coletor do produto seco (ciclone).

Figura 9 – Diagrama esquemático e foto do secador utilizado (Fonte: RAMOS, 2011).

4.8. Preparo do extrato concentrado e liofilizado

Como fonte de catequinas foi empregue o extrato bruto de chá-verde obtido conforme condições de extração predefinidas em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa (CRNKOVIC, 2011). Inicialmente preparou-se uma solução extrativa na proporção 1:10 (p/v) de material vegetal/ solvente em um extrator encamisado com aquecimento a 70 °C e agitação a 200 rpm durante 60 minutos, utilizando uma solução hidroalcoolica a 70 % (v/v). A solução extrativa foi filtrada em sistema de filtração a vácuo e concentrada em evaporador rotativo Fisatom modelo 802, a uma temperatura de 50 °C e pressão reduzida de 600 mmHg.

A amostra de extrato concentrado foi dividida em duas porções, sendo uma armazenada em frasco âmbar à temperatura de 4 °C para posterior utilização (extrato concentrado) e a outra porção foi submetida ao processo de liofilização (extrato liofilizado), as quais serão empregadas posteriormente nos estudos de formulação e secagem. Para o processo de liofilização, volumes de aproximadamente 25 mL foram distribuídos em tubos cônicos de 50 mL que foram congelados a -20 °C por 48 horas. Em seguida foram levados ao freezer a -80 °C por 4 h e transferidos para o liofilizador VLP 195 FD-115, Thermo Fischer Scientific, temperatura de condensação de -40 °C por 48 horas. Após a secagem, o material particulado foi acondicionado em frasco escuro hermeticamente fechado e armazenado a temperatura de -20 °C.

4.9. Caracterização físico-química dos extratos concentrado e liofilizado

Os extratos concentrado e liofilizado foram caracterizados através da quantificação dos marcadores químicos epigallocatequina galato (EGCG), cafeína (CAF) e a epicatequina galato (ECG), utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Também se

determinou o teor de sólidos totais para o extrato concentrado, e o teor de umidade, tamanho médio de partícula e a distribuição granulométrica para o extrato liofilizado.

4.9.1. Quantificação de EGCG, cafeína e ECG por CLAE

A quantificação dos marcadores químicos presentes no chá-verde, epigallocatequina galato (EGCG), cafeína (CAF) e a epicatequina galato (ECG), foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com o método descrito por He et al., (2009) com adaptações (CRNKOVIC, 2011) anteriormente validado. A co-validação da metodologia analítica foi realizada segundo os critérios propostos pela resolução da ANVISA RE nº 899, de 29/5/2003. Os parâmetros avaliados foram: linearidade, precisão intermediária, repetibilidade e seletividade/especificidade.

Utilizou-se um cromatógrafo à líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu Prominence, equipado com bombas de alta pressão mod. LC-10 AD, amostrador automático mod. SIL-10ADVP, detector espectrofotométrico Photodiodo Array mod. SPD-M10A, controlado pelo *software* LC Solution. Utilizou-se uma coluna de fase reversa C-18 Shimadzu (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm) termostaticada a temperatura de 30 °C, usando pré-coluna C-18 para filtrar possíveis compostos presentes no extrato e que são insolúveis nos solventes de eluição (fase móvel).

Como fases móveis utilizou-se a água acidificada a 1 % (v/v) com ácido acético glacial (A) e o metanol (B). O gradiente de eluição da fase móvel B pode ser visualizado na Figura 10, sendo 5 - 50 % de B durante 0 - 12 minutos, permanecendo 1 minuto em 50 % de B. A partir dos 13 até os 20 minutos de análise, os gradientes aumentam linearmente de 50 - 100 % de B, permanecendo mais 4 minutos em 100 % de B. O gradiente diminui de 100 - 5 % de B de 24 a 26 minutos de análise, permanecendo mais 4 minutos em 5 % de B, finalizando a análise em 30 minutos. As fases móveis foram filtradas (0,45 µm, Millipore) e degaseificadas antes do uso, empregando-se a vazão total de 1,2 mL.min⁻¹.

Figura 10 – Gradiente de eluição utilizado.

O volume de injeção da amostra foi de 20 µL e a detecção ocorreu a 280 nm. Os picos cromatográficos foram identificados comparando-se os tempos de retenção com as substâncias padrões, além da comparação com o perfil do espectro UV referente cada pico. A quantificação foi realizada por integração da área do pico em comparação com padrão externo. As curvas analíticas foram confeccionadas utilizando soluções padrão de cafeína (CAF), epicatequina galato (ECG) e epigallocatequina galato (EGCG) em diversas concentrações.

4.9.2. Teor de sólidos totais

O teor de sólidos (g/g) foi determinado através do método da estufa (gravimetria). Uma amostra de 2 g do extrato concentrado foi adicionada em uma placa de Petri previamente pesada. A placa foi levada a estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$, a qual teve o peso monitorado até permanecer constante. Com estes valores determinou-se o teor de sólidos através da Equação 1:

$$C = \frac{ms}{mt} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

C = concentração de sólidos (g/g)

ms = massa seca (g)

mt = massa total adicionada (g).

4.9.3. Determinação da densidade

A densidade foi determinada pelo método do picnômetro, comparando-se com o peso específico da água purificada a 25°C . O picnômetro foi pesado vazio e depois com água purificada, evitando-se o contato direto com o mesmo e eliminando-se as bolhas. Após sua

limpeza, foi adicionado o extrato e pesado novamente (SOUZA, 2003). O cálculo da densidade foi determinado através da Equação 2:

$$d = \frac{m_{se}}{m_{\text{água}}} \cdot d_{\text{água}}^{25^{\circ}\text{C}}$$
Equação 2

Onde:

d = densidade da solução extrativa (g/cm^3)

m_{se} = massa da solução extrativa contida no picnômetro (g)

$m_{\text{água}}$ = massa de água destilada contida no picnômetro (g).

4.9.4. Determinação da perda por dessecação

A determinação da perda por dessecação de sistemas particulados foi realizada pelo método gravimétrico segundo procedimento descrito por Souza (2007). Amostras de 2 g de material vegetal foram pesadas em placa de Petri previamente pesadas e armazenadas em estufa a 105°C , até a obtenção de massa constante. Os resultados foram expressos em porcentagem através da média de três determinações.

4.9.5. Tamanho médio de partícula e distribuição granulométrica

A distribuição granulométrica e o tamanho médio das partículas foram determinados dispersando-se uma amostra do pó em uma lâmina de vidro e obtendo-se imagens com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus® – modelo BX60MIV) conectado a uma câmera digital (modelo 3.2.0, SPOT Insight). As imagens obtidas com aumento de 50 vezes foram analisadas pelo sistema de análise de imagens Image Pro-Plus®. Para garantir a confiança e a repetitividade do método foi avaliado um mínimo 1.000 partículas (SOUZA, 2003).

4.10. Desenvolvimento de sistemas lipídicos emulsionados contendo catequinas de chá-verde

4.10.1. Diagrama ternário de fases

O diagrama ternário de fases foi utilizado para auxiliar na definição das proporções das fases aquosa (A), oleosa (O) e de tensoativo (T), de forma a se obter um sistema emulsionado estável. Os pontos selecionados no gráfico se limitaram a quatro pontos (Tabela 2). A escolha dos pontos teve como princípio a composição original estudada na primeira etapa do projeto (dados não apresentados), visando otimizar a formulação.

Tabela 2 – Composição das formulações avaliadas segundo o diagrama ternário de fases.

Código	Fase aquosa (%) (p/p)	Fase oleosa (%) (p/p)	Tensoativo (%) (p/p)
1	80	15	5
2	85	10	5
3	90	5	5
4	90	10	0

4.10.2. Preparo da formulação

A fosfatidilcolina de soja hidrogenada, o colesterol 94% e os tensoativos avaliados foram pesados e dissolvidos no solvente da fase lipídica descritos no item 4.10.3 e aquecido a 70 °C sob agitação durante 10 minutos. Em outro béquer foi pesado o extrato liofilizado de chá-verde e o adjuvante (trelose diidratada e/ou lactose), os quais foram diluídos em água purificada e aquecidos a 70 °C. A fase aquosa foi vertida na dispersão lipídica gradativamente e homogeneizada manualmente obtendo-se uma pré-formulação. Em seguida, foi agitado em homogeneizador de alta velocidade (T-25 ultra-turrax, IKA WORKS, Inc., Wilmington, NC, EUA), utilizando um ciclo de três minutos a 18.000 rpm, um minuto agitação manual e por último dois minutos em ultra-turrax a 18.000 rpm. A Tabela 3 apresenta as proporções utilizadas de cada componente da formulação.

Tabela 3 – Composição da formulação contendo catequinas do chá-verde.

Composição	Teor (%)
Colesterol	1,25
PCH90	8,75
Tensoativo	5
Co-solvente	35
Extrato liofilizado	3
Adjuvante (trelose ou lactose)	13
Água purificada (q.s.p.* 100%)	34

*q.s.p.: quantidade suficiente para.

4.10.3. Sistema co-solvente

Os lipídeos utilizados neste estudo (lecitina de soja e colesterol) apresentam temperatura de transição vítrea em torno de 55 °C. A transição vítrea consiste em uma transição de fase de segunda ordem de um estado sólido-vítreo para um estado semi-líquido gomoso (LEITE; MURR; PARK, 2005). De acordo com Li, Deng e Cui (2006), pode-se utilizar um co-solvente, por exemplo, o álcool terc-butílico para solubilizar a lecitina em água. Assim, realizou-se alguns ensaios de solubilização da fase lipídica utilizando-se um co-solvente. Os

sistemas co-solventes propostos foram: água, etanol/água, e álcool n-butilico na proporção 2:1 (v/v), sendo utilizado na proporção 3:1 (v/p), solvente/ lipídeo.

Ao final do estudo, selecionou-se a formulação estável e reavaliou-se o sistema co-solvente substituindo-se o álcool n-butilico pelos alcoóis iso-butilico e terc-butilico, e outra apenas com água, observando-se a influência de cada co-solvente na estabilidade da formulação.

4.10.4. Equilíbrio Hidrófilo-lipófilo (EHL)

O fosfolipídio utilizado (fosfatidilcolina de soja) possui diferentes EHL, de acordo com sua composição, não sendo possível estimar previamente este valor. Desta forma foi realizado um teste preliminar para avaliar a faixa de EHL para a formulação. Utilizou-se o Tween 20, Tween 80 e Span 80, observando-se macroscopicamente em que proporções ocorreriam a separação de fases. Através desta análise determinou-se que os testes deveriam ser realizados na faixa de EHL de 13 a 16. A triagem foi realizada utilizando o Tween 20 e o Span 80 determinando-se a proporção de cada tensoativo conforme as equações 3, 4, 5 e 6, para se obter o EHL desejado.

$$P_A = EHL_B - EHL_{req} \quad \text{Equação 3}$$

$$P_B = EHL_A - EHL_{req} \quad \text{Equação 4}$$

$$\%T_A = P_A \cdot 100 / (P_A + P_B) \quad \text{Equação 5}$$

$$\%T_B = 100 - \%T_A \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

A e B são os tensoativos utilizados

P_A : proporção do tensoativo A

P_B : proporção do tensoativo B

EHL_B : equilíbrio hidrófilo-lipófilo de B

EHL_{req} : equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido para a formulação

$\%T_A$: porcentagem necessária do tensoativo A

$\%T_B$: porcentagem necessária do tensoativo B

Para observar o comportamento da formulação ao utilizar tensoativos diferentes em um mesmo EHL, realizou-se um ensaio utilizando o Gelucire® 44/14. As formulações foram analisadas quanto às características macroscópicas, teste de centrifugação e comportamento reológico, descritos à seguir.

❖ Análise macroscópica

Os ensaios organolépticos são capazes de avaliar as características de um produto pelos órgãos do sentido, ou seja, o aspecto, cor, odor, sabor e tato. A sua importância está em possibilitar a visualização imediata de alterações no produto indicando a sua estabilidade (ANVISA, 2008). Avaliou-se nesta etapa aspectos macroscópicos (visual) da formulação, observando-se a aparência, ou seja, turvação, homogeneidade, precipitação, entre outros. Utilizou-se como nomenclatura: N = Normal, sem alteração; LM = Levemente Modificada (apresentava-se com tendência em separar-se demonstrada pela visualização de uma tênue linha divisória); M = Modificada (quando ocorria acentuação dessa linha divisória, com separação de fases total).

❖ Centrifugação

Amostras de dois gramas de cada uma das emulsões foram centrifugadas (Centrifuga Eppendorf 5430R, Alemanha) durante 15 minutos a 106,2; 663,8 e 1301 xg a 25°C. Utilizou-se como nomenclatura: N = Normal, sem alteração; LM = Levemente Modificada (apresentava-se com tendência em separar-se demonstrada pela visualização de uma tênue linha divisória); M = Modificada (quando ocorria acentuação dessa linha divisória, com separação de fases total).

❖ Reologia

A caracterização reológica das formulações foi realizada visando avaliar a existência de relações entre o comportamento reológico das suspensões e sua influência nos resultados da secagem. Os ensaios foram realizados em um Reômetro Brookfield Modelo LV-DV III, cilindros concêntricos operando o *software* Reocalc®. Para a realização das leituras selecionou-se um programa com incremento/ redução de velocidade de 20 rpm, faixa de leitura de 20 a 200 (aumentando e reduzindo a rotação) e o *spindle* SC4-25. Essa caracterização foi realizada para as formulações obtidas pela variação do EHL (13 a 16) e observando a diferença entre os tensoativos, sendo a concentração de sólidos final fixada em 31 %. Após o preparo das formulações, as amostras permaneceram em repouso por 24 horas para rearranjo estrutural dos lipídios, em temperatura ambiente controlada (± 25 °C). As leituras foram realizadas com controle de temperatura fixadas em 25,0; 35,0 e 45,0 $\pm 0,5$ °C com o auxílio de um banho termostatzado Brookfield TC-500, a fim de se verificar a influência desta variável (temperatura) no comportamento reológico das emulsões.

4.10.5. Avaliação de diferentes agentes emulsionantes e método de preparo (manual e homogeneização por ultra-turrax)

Determinando-se a faixa ideal de EHL, outros tensoativos foram selecionados para avaliar sua influência na estabilidade da formulação (Gelucire[®] 44/14, Steareth 20, Tween 20/ Span 80 (EHL 16) e Tween 80). Em paralelo, as formulações foram submetidas a diferentes processos de homogeneização (homogeneização manual e ultra-turrax) e avaliadas quanto à estabilidade no teste preliminar de estabilidade que envolve os testes de estresse térmico, análise microscópica e centrifugação (AZZINI, 1999; MORAIS, 2006). Os métodos de preparo e a caracterização encontram-se descritas abaixo.

❖ Estresse térmico

As formulações foram acondicionadas em frasco transparente de vidro e devidamente fechados. As amostras foram aquecidas em banho termostatzado Brookfield TC-500 em faixa de temperatura de 40 ± 2 a 80 ± 2 °C, aumentando-se a temperatura de 5 em 5 °C, permanecendo-se 30 minutos em cada temperatura. Ao final de cada temperatura as amostras foram avaliadas macroscopicamente utilizando-se como nomenclatura: N = Normal, sem alteração; LM = Levemente Modificada (apresentava-se com tendência em separar-se demonstrada pela visualização de uma tênue linha divisória); M = Modificada (quando ocorria acentuação dessa linha divisória, com separação de fases total) (AZZINI, 1999; MORAIS, 2006).

❖ Análise microscópica

Uma pequena amostra de cada uma das formulações foi dispersa em lâmina de vidro e visualizadas em microscópio óptico (Olympus[®] – modelo BX60MIV) conectado a uma câmera digital (modelo 3.2.0, SPOT Insight). As imagens obtidas com aumento de 100 vezes foram analisadas pelo sistema de análise de imagens Image Pro-Plus[®]. O objetivo deste estudo foi visualizar as características da formulação como forma e homogeneidade do tamanho dos glóbulos formados.

❖ Centrifugação

Conforme descrito na seção 4.10.4.

4.10.6. Avaliação da influência dos métodos de homogeneização na estrutura da formulação

De acordo com o teste de estabilidade preliminar, selecionou-se a formulação considerada mais estável, a qual foi submetida a diferentes processos de homogeneização, de forma a correlacionar a sua estabilidade com o seu processo de obtenção. Assim, após o preparo da pré-emulsão, a mesma foi homogeneizada por três processos diferentes: manual, ultra-turrax e homogeneizador de alta pressão (Panda Plus 2000, Niro Soavi). As formulações obtidas pelos diferentes processos (manual, ultra-turrax e homogeneizador de alta pressão) foram caracterizadas pela análise macroscópica, centrifugação, microscopia óptica, potencial zeta e tamanho de partículas, conforme descrito à seguir.

❖ Manual

Após o preparo conforme descrito no item 4.10.2 (inversão da fase aquosa sobre a fase oleosa), a formulação foi homogeneizada com bastão de vidro com movimentos rápidos e circulares até seu completo resfriamento.

❖ Ultra-turrax

A pré-emulsão obtida a partir do preparo descrito no item 4.10.2, foi homogeneizada mantendo um ciclo de três minutos sob agitação em ultra-turrax a 18.000 rpm, um minuto agitação manual e durante dois minutos em ultra-turrax a 18.000 rpm.

❖ Homogeneizador de alta pressão

A pré-emulsão preparada conforme descrito no item 4.10.2, foi homogeneizada em homogeneizador de alta pressão a 500, 750 e 1.000 bar e a seis ciclos de passagem em cada pressão. As amostras foram coletadas nos ciclos 2, 3, 4, 5 e 6.

As formulações preparadas foram submetidas à análise macroscópica, ensaios de centrifugação e análise microscópica (conforme procedimentos descritos anteriormente), e determinação do potencial zeta e distribuição de tamanhos.

❖ Potencial zeta e tamanho de partícula

A carga de superfície de sistemas lipídicos pode influenciar sua estabilidade prevenindo ou provocando a fusão e agregação de partículas. O potencial zeta é uma forma de quantificar estas cargas, relacionando-se que quanto mais positivo ou mais negativo o valor, mais estável é o sistema. As amostras foram colocadas em cubetas de acrílico de 1,0 cm de

caminho ótico e analisadas no Zetasizer Nano (Malvern) e a distribuição do tamanho das partículas determinada por difração a laser no equipamento Light Scattering (Beckman Coulter).

4.11. Secagem por *spray drying* e avaliação das propriedades físico-químicas do produto

4.11.1. Preparo da formulação

A fosfatidilcolina de soja hidrogenada (Phospholipon 90H), o colesterol e o Gelucire® 44/14 foram pesados e dissolvidos em álcool n-butílico/ água (1:2, v/v) e aquecido a 70 °C sob agitação durante 10 minutos. Em outro béquer foi pesado o extrato de chá-verde e o adjuvante (lactose ou trealose) os quais foram diluídos em água purificada e aquecidos a 70 °C. A fase aquosa foi vertida na dispersão lipídica gradativamente e homogeneizada manualmente obtendo-se uma pré-formulação. Em seguida foi agitado em ultra-turrax, utilizando um ciclo de três minutos a 18.000 rpm, um minuto agitação manual e dois minutos a 18.000 rpm. Para fins de validação do método analítico preparou-se branco da formulação, sem a adição do extrato.

4.11.2. Spray drying

A formulação foi alimentada a uma vazão (W_{susp}) de 4 g/min, sendo a vazão do ar de secagem (W_g) mantida constante em 60 m³/h, pressão do ar de atomização (P_{atm}) de 5 kgf/cm² e vazão do ar de atomização (W_{atm}) de 17 lpm. Avaliou-se três temperaturas de entrada do gás de secagem (T_{ge}), respectivamente de 100, 120 e 150 °C. A temperatura do gás de saída foi monitorada em intervalos regulares, de forma a se obter o instante em que o processo atingisse regime permanente. Após este período, iniciou-se a alimentação da formulação de secagem e a coleta do produto seco com duração aproximada de 30 minutos. Durante o experimento, variáveis como temperatura e umidade do ar ambiente e temperatura do ar de saída foram monitoradas de forma a verificar o desempenho do equipamento. Após a obtenção da formulação seca, o material foi caracterizado conforme descrito à seguir:

4.11.3. Propriedades físicas e químicas do produto

O produto seco foi caracterizado pela determinação do teor de umidade, atividade de água, tamanho médio e distribuição granulométrica das partículas, morfologia, determinação da densidade aparente e de compactação dos pós, propriedade de fluidez dos pós, difração de

raios-X, eficiência de encapsulação, e redispersibilidade do produto em água. Os seguintes métodos foram usados nessas caracterizações:

❖ Teor de umidade e atividade de água

O teor de umidade do produto seco foi determinado por titulação pelo método de Karl Fischer, no equipamento Methrom 870 KF Titrino Plus. Amostras de aproximadamente 100 mg foram utilizadas em cada determinação. As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média e desvio padrão.

A atividade de água (A_a) das amostras foi determinada em triplicata no equipamento AquaLab 4 TEV (Decagon Devices, Pullman, USA) à temperatura de 25 °C, utilizando o sensor de ponto de orvalho. Este parâmetro está relacionado à umidade do pó e possibilita determinar a quantidade de água livre disponível para o crescimento microbiano e para reatividade química e enzimática.

❖ Distribuição granulométrica e tamanho médio de partícula

A distribuição granulométrica e o tamanho médio das partículas secas foram determinados dispersando-se uma amostra do pó em uma lâmina de vidro e obtendo-se imagens com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus mod. BX60MIV) conectado a uma câmera digital (modelo 3.2.0, SPOT Insight). As imagens foram obtidas com aumento de 50 vezes, e analisadas em um sistema de análise de imagens (Image Pro-Plus 7.0®). Para garantir a confiança e a reprodutibilidade do método foi avaliado um mínimo 1.000 partículas (SOUZA; OLIVEIRA, 2012) em cada amostra. Os resultados foram expressos como d_{10} , d_{50} e d_{90} , representando o diâmetro médio da partícula em 10, 50 e 90 % da distribuição de tamanho, respectivamente. O SPAN da distribuição do tamanho das partículas foi obtido através da Equação 7.

$$SPAN = (d_{90} - d_{10}) / d_{50} \quad \text{Equação 7}$$

❖ Morfologia

O estudo morfológico visa avaliar a forma e as características superficiais das micropartículas. A análise foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) empregando-se o microscópio eletrônico Inspecione F-50 (FEI, Nederland). As amostras foram dispersas e afixadas em um suporte de alumínio recoberto com uma fita adesiva de carbono dupla face. Em seguida, as amostras foram introduzidas em pulverizador de ouro

(120 segundos, vácuo 2.10^{-2} mbar, corrente 40 mA). As micrografias foram geradas no modo topográfico a 5 kV.

❖ Propriedades de fluidez dos pós

As propriedades de fluidez dos pós foram caracterizadas através da determinação da densidade bruta (aparente) e de compactação (ρ_b e ρ_t), fator de Hausner (FH), e índice de Carr (IC), empregando recomendações da FDA (PRISTA et al., 1995).

Para determinar a densidade aparente, um grama de cada uma das amostras das emulsões secas foram pesadas separadamente, e transferidas para uma proveta de 10 mL. A mesma foi determinada pela razão entre a massa e o volume (cm^3) ocupado pelo material particulado. Para a determinação da densidade de compactação, uma amostra de um grama de cada uma das formulações foi pesada e transferida para a proveta de 10 mL e submetida a 1250 quedas em superfície lisa e altura de $3,0 \pm 0,2$ mm com o auxílio do equipamento Calleva TD21[®] (Frankfurt, Germany). A densidade aparente de compactação foi calculada pela razão entre a massa em gramas pelo volume em centímetros cúbicos ocupado pelo material particulado após a compactação (FERNANDES, 2013).

O fator de Hausner (FH) foi determinado como a razão entre a densidade compactada (ρ_a) e a densidade bruta (ρ_t) das composições secas (Equação 8). O Índice de Carr (IC) foi determinado como a razão percentual entre a diferença entre as densidades compactadas e bruta, dividida pela densidade compactada, segundo a Equação 9 (CORTÉS-ROJAS, SOUZA, OLIVEIRA, 2014).

$$FH = \frac{\rho_a}{\rho_t} \quad \text{Equação 8}$$

$$IC = \frac{(\rho_t - \rho_b)}{\rho_t} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

❖ Difração de Raios-X

As amostras foram colocadas em um suporte para amostras pulverulentas e a superfície fechada por uma lâmina de vidro. As medidas foram obtidas por um difratômetro de raios-x marca Rigaku Rotaflex, modelo RU-200B, com câmara de difração multi-propósito em radiação $\text{CuK}\alpha$ $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, corrente de 100 mA e voltagem de 50 kv, em ângulos de 5 a 40° em 2θ , com incremento de 0,02 °/s (1,2°/min) (FERNANDES, 2013).

❖ Eficiência de encapsulação

A quantificação dos marcadores químicos presentes no chá-verde, galato de epigallocatequina (EGCG), cafeína (CAF) e galato de epicatequina (ECG) foi determinada por CLAE, segundo metodologia descrita conforme descrito no item 4.9.1. A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada através da equação 10 (QUN et al., 2011).

$$EE\% = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

Onde:

m_1 = quantidade total do ativo

m_2 = quantidade de ativo liberado em solução aquosa

❖ Redispersão dos produto seco

As dispersões lipídicas secas foram ressuspensas na mesma concentração inicial (31 % de sólidos) com água purificada e agitada em homogeneizador de alta velocidade (ultra-turrax) por três minutos a 18000 rpm, a fim de avaliar a capacidade em retornar sua forma inicial estável.

4.11.4. Desempenho da secagem (Recuperação do produto, R)

O desempenho da operação de secagem foi avaliado através da determinação da recuperação de produto (R) durante a secagem. A recuperação do produto (R) foi determinada por balanço de massas, relação percentual entre a massa de pó total coletada e a massa de sólidos alimentada no equipamento (CORTES-ROJAS; OLIVEIRA, 2012), utilizando-se a Equação 11.

$$R = \frac{M_c \cdot (1 - X_p)}{W_s \cdot C_s \cdot \theta} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

Onde:

M_c : massa coletada (g)

X_p : umidade (g)

W_s : vazão de alimentação (g/min)

C_s : teor de sólidos da composição de secagem (g/g)

θ : tempo de processo (min)

4.11.5. Análise estatística

Neste estudo foi aplicado a análise de variância (ANOVA) *one way*, usando o teste de Turkey para comparar as variáveis utilizadas no processo de secagem com os resultados obtidos de performance do processo e propriedades do produto.

4.12. Avaliação da estabilidade oxidativa em Rancimat®

A atividade antioxidante das emulsões secas foi avaliada através do estudo de estabilidade oxidativa do óleo de soja utilizando o Rancimat® Methrom 873 segundo método AOCS Cd 12b-92 (AOCS, 2003). O estudo de estabilidade oxidativa foi realizado tendo como objetivo avaliar a atividade antioxidante do extrato de *Camellia sinensis* antes e após o processo de encapsulação. As etapas da pesquisa realizadas compreenderam: o estudo de avaliação de dose-resposta, sinergismo e estimativa do tempo de vida de prateleira do óleo de soja com os antioxidantes avaliados.

4.12.1. Preparo da amostra

Os antioxidantes em estudo compreendem o extrato liofilizado de chá-verde, L100A (extrato de chá-verde encapsulado), BHT, BHA e as catequinas isoladas. Previamente foram preparadas soluções-mãe de cada um dos agentes antioxidantes, na concentração de 0,005; 0,004; 0,003; 0,002 e 0,001 g/mL (o que corresponde a 500, 400, 300, 200 e 100 ppm), e homogeneizada em banho ultrassônico durante 5 minutos. Uma amostra de 0,3 g da solução mãe foi adicionada em 3 g de óleo de soja, a qual foi homogeneizada e inserida no equipamento, de acordo com as condições de cada estudo que serão descritas à seguir. Em outro tubo foi pesado a mesma quantidade de óleo de soja e metanol sem antioxidante, sendo utilizado como controle. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.12.2. Avaliação da dose-resposta

A capacidade antioxidante do extrato liofilizado de *Camellia sinensis* foi comparada à de antioxidantes tradicionalmente usados na indústria alimentícia, como BHA e BHT nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 ppm utilizando o Rancimat®. Neste estudo também comparou-se a atividade do extrato de chá-verde após a microencapsulação, com a lecitina de soja isolada (PCH90 - concentração usada na formulação), e o padrão de catequinas (EGCG) nas concentrações de 100, 300 e 500 ppm. As amostras foram submetidas à temperatura de 110 °C, com fluxo de ar de 10 L/h, utilizando 50 mL de água ultrapurificada para recepção dos voláteis.

O efeito do antioxidante, responsável por retardar a oxidação da amostra, foi medido através do cálculo do Fator de Proteção (FP) de acordo com a expressão a seguir:

$$FP = \frac{PI_{ant}}{PI_{cont}}$$

Equação 12

Onde:

FP = fator de proteção

PI_{ant} = período de indução do antioxidante

PI_{cont} = período de indução do controle (amostra sem antioxidante)

4.12.3. Efeito sinérgico

A possibilidade de haver efeito sinérgico entre os antioxidantes em estudo (extrato, antioxidantes sintéticos e da formulação desenvolvida) foi investigada através de uma combinação entre os antioxidantes realizada por meio de um planejamento fatorial, conforme descrito na Tabela 4. A concentração final de antioxidante nas amostras de óleo de soja foram de 0,02 g/ 100 g (200 ppm), tendo em vista o limite máximo de antioxidante sintético preconizado pela ANVISA para óleos e gorduras (BRASIL, 1988). O estudo foi realizado à temperatura de 110 °C, com vazão de ar a 10 L/h, utilizando 50 mL de água ultrapurificada para recepção dos voláteis.

Tabela 4 – Planejamento da avaliação do efeito sinérgico entre antioxidantes.

Associação dos antioxidantes	Proporção
BHT + BHA	1:1
BHT + BHA	1:3
BHT + BHA	3:1
BHT + L100A	1:1
BHA + L100A	1:1
BHT + Extrato liofilizado de <i>Camellia sinensis</i>	1:1
BHA+ Extrato liofilizado de <i>Camellia sinensis</i>	1:1

4.12.4. Tempo de prateleira (*shelf life*)

A avaliação da estabilidade oxidativa no Rancimat em diferentes temperaturas pode ser utilizada para estimar o tempo de armazenamento de um produto. O cálculo é realizado através da extrapolação da curva, relacionando-se o período de indução (PI) em horas versus a temperatura utilizada, calculada em escala logarítmica. Neste estudo, avaliou-se o tempo que o óleo de soja poderia ser armazenado em uma temperatura de 20 °C utilizando o extrato liofilizado de *Camellia sinensis* como antioxidante na concentração de 200 ppm, comparado ao produto final obtido no estudo (extrato encapsulado) utilizado na concentração de 100 ppm. O padrão de referência utilizado foi o óleo comercial Liza[®] e o óleo de soja sem antioxidantes. Os testes foram realizados nas temperaturas de 100, 110, 120 e 130 °C, com vazão de ar a 10 L/h, utilizando 50 mL de água ultrapurificada para recepção dos voláteis. As

equações da reta foram obtidas com auxílio do *software* 873 *Biodiesel Rancimat 1.1*, apresentando o resultado final expresso em horas.

5. Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização físico-química dos extratos concentrado e liofilizado de *Camellia sinensis*

Quando se utiliza material vegetal como fonte de ativos é de grande importância a caracterização inicial do produto para garantir a qualidade de diferentes lotes de um produto. Vários fatores podem contribuir para que ocorra a variação na composição dos constituintes químicos do material vegetal, como por exemplo sazonalidade, clima, técnicas de cultivo e tipo do solo. Além disso, outros aspectos como a tecnologia utilizada para a extração, concentração, conservação e armazenamento, também devem ser considerados (SAITO, 2007; LIMA et al., 2009). Identificando-se os principais marcadores pode-se estabelecer o controle de qualidade da matéria-prima vegetal utilizada no desenvolvimento e comercialização de um produto fitofarmacêutico, mantendo-se os mesmos padrões de qualidade e reprodutibilidade lote a lote.

A caracterização física do extrato concentrado de chá-verde apresentou valores de teor de sólidos de $14,1 \pm 0,28$ % e densidade $0,87 \pm 0,08$ g/cm³. O extrato liofilizado foi avaliado quanto a perda por dessecação (teor de umidade) e distribuição granulométrica.

O teor de umidade é um parâmetro importante na análise de matérias-primas vegetais, visto que teores elevados de água favorecem o crescimento microbiano e a ocorrência de reações de degradação, incluindo a oxidação e hidrólise, que alteram a qualidade do produto (WEC; CROMMELIN, 1997). O resultado encontrado para o teor de umidade do extrato liofilizado foi de $4 \pm 0,5$ %, ficando dentro dos limites preconizados para matérias primas, menor que 14 % (SOUZA, 2003).

A distribuição granulométrica é um fator importante, considerando que o tamanho e a distribuição de tamanho das partículas irão influenciar na liberação do ativo devido a sua área superficial de contato. Durante o processo de mistura dos ativos com os outros componentes de uma composição, para que se tenha uma formulação homogênea recomenda-se manter o pó com uma estreita faixa granulométrica. Na Figura 11, está representado a distribuição granulométrica acumulada do extrato liofilizado pela frequência acumulada, que apresentou tamanho médio e faixa de distribuição de $9,9 \pm 8,5$ µm.

Figura 11 – Distribuição granulométrica acumulada do extrato liofilizado de *Camellia sinensis*.

A quantificação dos marcadores químicos na matéria-prima vegetal foi realizada por CLAE. Na literatura, a CLAE tem sido a técnica mais empregada para a separação, identificação e quantificação de catequinas, por permitir bons resultados com estreita faixa de variação e altos índices de reprodutibilidade. Assim, utilizou-se o método descrito por He et al. (2009), com adaptações (CRNKOVIC, 2011), anteriormente validado. Quando o método já se encontra validado, é necessário realizar apenas uma validação parcial do método (co-validação), de modo a comprovar que estes resultados podem ser reproduzidos com os equipamentos disponíveis no laboratório onde será aplicada a metodologia (BRASIL, 2003). O teor dos marcadores químicos CAF, EGCG e ECG foram determinados utilizando-se as equações das curvas analíticas obtidas experimentalmente descritas na Tabela 5, sendo os resultados expressos em porcentagem de extrato (g/g).

Tabela 5 – Resultados da co-validação do método analítico de análise da *Camellia sinensis*.

Padrões analisados	Faixa de concentração (µg/mL)	Equação da reta	R ²	Repetibilidade DPR (%)
EGCG	25-500	$y=22270.2x - 80580.5$	0,9995	3,26
ECG	25-500	$y=30069x + 495382$	0,9992	4,98
CAF	5-100	$y=44666x + 12419$	0,9994	3,56

A seletividade do método analítico foi avaliada analisando-se o branco (formulação sem os compostos biativos), observando-se possíveis alterações na linha de base do cromatograma. Na Figura 12, pode-se visualizar que não houve interferências na linha de base dos cromatogramas. Desta forma, conclui-se que não houve interferentes durante a análise.

Figura 12 – Perfil cromatográfico: (I) Formulação sem os ativos e (II) Perfil cromatográfico do extrato liofilizado de *Camellia sinensis*, onde (A) EGCg, (B) Cafeína e (C) ECG.

O teor dos marcadores químicos encontrados no extrato liofilizado de *Camellia sinensis* foram 15,25 % $\pm$ 1,2 de EGCG, 6,49 % $\pm$ 0,17 de CAF e 4,38 % $\pm$ 0,38 de ECG. Os tempos de retenção dos picos obtidos foram de 14,2 minutos (min) para EGCG, 15,0 min para a CAF e 15,9 min para ECG confirmados com o padrão analítico e pelo espectro no UV. A precisão intermediária foi avaliada em dias diferentes e por dois analistas. Este parâmetro foi avaliado a partir da análise do teor de soluções de amostra de mesma concentração. O método apresentou-se preciso com um desvio padrão relativo (DPR) de 4,5 %, sendo aceita a variação de até 5 % (BRASIL, 2003). Para a precisão do sistema foram avaliadas as áreas e o tempo de retenção das corridas consecutivas da solução de padrão. A partir da análise dos resultados obtidos, pode-se considerar o método preciso, considerando que o coeficiente de variação entre as leituras da mesma amostra inferior a 2,0 % (BRASIL, 2003).

De acordo com a literatura, os valores obtidos para o teor de marcadores encontram-se dentro do esperado. Contudo, durante a revisão foram observados diferentes concentrações para estes compostos ativos que pode ser atribuído tanto a qualidade do material vegetal, como na forma que foi realizada a extração dos compostos ativos (HARA, 2001; MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006; ZAVERI, 2006).

5.2. Desenvolvimento de sistemas lipídicos emulsionados contendo catequinas de chá-verde

5.2.1. Sistema co-solvente

A definição da proporção dos componentes da formulação foi realizado em paralelo ao estudo utilizando o co-solvente, de forma a determinar a faixa ideal de EHL para a formulação verificando aparência, consistência e estabilidade em 24 horas. Nessa etapa do trabalho, se fixou a proporção 85 % de fase aquosa, 10 % a oleosa e 5 % de tensoativo.

Durante o estudo da formulação a utilização de co-solventes foi proposta, uma vez que ensaios preliminares, sem o uso de co-solventes, resultaram em formulações instáveis. Quando misturado ao lipídeo, e submetidos ao aquecimento e agitação, observa-se que a solução álcool n-butílico:água adquire uma aparência gelificada e transparente, evidenciando uma completa solubilização da fase lipídica. Os demais sistemas avaliados adquirem uma consistência espumosa, chegando a duplicar o volume pela incorporação de ar, comportamento mais acentuado quando utiliza-se a água como solvente. Assim, selecionou-se o álcool n-butílico:água (1:2, v/v) para preparar a fase lipídica.

Ao final do estudo, selecionou-se a formulação mais estável e reavaliou-se o sistema co-solvente substituindo o álcool n-butílico pelos alcoóis iso-butílico e terc-butílico, e apenas água, observando-se a influência de cada solvente na estabilidade da formulação. Verificou-se que após algumas horas, a formulação preparada apenas tendo água como solvente apresentou separação de fase. Este fato confirma a necessidade do uso de um co-solvente para a total solubilização dos lipídeos utilizados. Na Figura 13, apresenta-se as formulações após processo de centrifugação utilizando álcool ter-butílico, água, álcool iso-butílico e n-butílico, respectivamente.

Figura 13 – Aspecto visual das formulações preparadas com diferentes sistemas co-solvente após centrifugação a 106,2 xg/ 15 minutos, onde: (1) Álcool terc-butílico, (2) Água, (3) Álcool iso-butílico, (4) Álcool n-butílico.

5.2.2. Estudo do EHL requerido para a formulação - Avaliação de agentes emulsionantes e métodos de preparo

Um parâmetro importante no desenvolvimento de emulsões é a avaliação dos valores de EHL requerido. Esse sistema foi desenvolvido por Griffin, e tem por objetivo determinar a razão correta de tensoativo capaz de estabilizar um sistema emulsionado (SANTOS et al., 2005), através da relação do EHL do tensoativo com o da fase oleosa.

A lecitina de soja é uma mistura de fosfolipídeos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol), com variações na composição, de acordo com o tipo e grau de pureza. Desta forma, a lecitina de soja não apresenta um EHL definido. Inicialmente utilizou-se o Tween 20 (EHL 16,7), Tween 80 (EHL 15) e o Span 80 (EHL 4,3) para realizar uma análise macroscópica da faixa de EHL da formulação. Neste estudo, observou-se que a separação de fases foi menor para a formulação utilizando o Tween 80 (EHL 15). Assim, selecionou-se a faixa de EHL que compreende de 13 a 16 para as próximas análises.

Para obter os valores de EHL exigidos pelo sistema em estudo, utilizou-se misturas de tensoativos previamente descritas, alternando a proporção do par escolhido, cujas quantidades encontram-se apresentadas na Tabela 6 e os respectivos EHL resultantes. Adicionalmente, preparou-se uma formulação contendo apenas Gelucire® 44/14 de EHL 14 para observar o comportamento da formulação em um mesmo EHL com tensoativo de propriedades diferente.

Tabela 6 – Proporção de tensoativos utilizados para alcançar o valor de EHL final.

Código	EHL _{final}	% A ^a	% B ^b	% C ^c
A	13	29,84	70,16	0
B	14	21,77	78,23	0
C	15	13,71	86,29	0
D	16	5,65	94,35	0
E	14	0	0	100

^a% de Span 80; ^b% de Tween 20; ^c% de Gelucire® 44/14.

Os resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das formulações desenvolvidas, com a finalidade de determinar o valor de EHL requerido da lecitina de soja utilizada, encontram-se na Tabela 7. Segundo a análise macroscópica e teste de centrifugação, as formulações que apresentaram estabilidade foram a D (Tween 20 e Span 80, EHL 16) e a E (Gelucire® 44/14, EHL 14), respectivamente. A análise macroscópica e centrifugação foram utilizadas para selecionar a formulação estável. A avaliação visual da aparência da emulsão é

um método preciso de detecção de separação de fases ou instabilidade, podendo fornecer informações consideráveis. Emulsões separadas em duas ou mais fases é assumida como instável (IDSON, 1993). O teste de centrifugação é um método que permite avaliar a estabilidade de diferentes emulsões através da aceleração da força da gravidade. Desta forma, o método fornece informações rápidas sobre a separação de fases da dispersão, prevendo se o produto irá separar durante o período de armazenagem (AZZINI, 1999; IDSON, 1993; MORAIS, 2006).

Tabela 7 – Análise macroscópica e teste de centrifugação das emulsões com lecitina de soja desenvolvidas em função da determinação do valor de EHL.

Código	EHL	Análise macroscópica	Centrifugação
A	13	M	-
B	14	N	M
C	15	N	M
D	16	N	N
E	14	N	N

Onde, N= Normal (estável); LM= Levemente Modificada e M= Modificada; - = não testada. A a D: Tween 20 + Span 80; E: Gelucire® 44/14.

As propriedades reológicas caracterizam as relações entre tensão e deformação de um material, seja este no estado sólido, líquido ou em solução, fornecendo informações importantes sobre a estrutura, estabilidade e possíveis impactos no processo de fabricação. A análise reológica das emulsões preparadas foi realizada utilizando um reômetro programado para que a velocidade de rotação fosse crescente até 200 rpm e diminuísse até o repouso total com intervalos de 20 rpm. As leituras foram realizadas com controle de temperatura fixadas em 25,0; 35,0 e 45,0 $\pm$ 0,5 °C com o auxílio de um banho termostatizado.

O estudo do comportamento reológico foi realizado tendo como variáveis o EHL (de 13 a 16, Figura 14-A) e o uso de tensoativos diferentes próximos ao EHL ideal da formulação (Figura 14-B). Os valores de viscosidade tenderam a decrescer com o aumento da taxa de cisalhamento, retornando a valores elevados com a redução do cisalhamento; entretanto, apresentando pequena área de histerese (gráfico decrescente em um patamar inferior ao gráfico ascendente, indicando a ocorrência de tixotropia em todas as amostras). Portanto, as formulações elaboradas apresentaram comportamento pseudoplástico e presença de tixotropia (Figura 14 – C).

Figura 14 – Reologia das formulações: (A) Viscosidade em diferentes EHL e (B) Viscosidade com diferentes tensoativos e (C) Representação do perfil reológico das formulações (Gelucire 44/14).

Avaliando-se os resultados desta etapa, observa-se que no EHL 14 utilizando o Tween 20/Span 80 a formulação não se manteve estável no teste da centrifuga. Em contrapartida quando o tensoativo foi o Gelucire 44/14 no mesmo EHL (EHL 14) observou-se a estabilidade da composição. Este comportamento pode estar relacionado principalmente com a maior viscosidade da formulação. O aumento da viscosidade diminui a velocidade de sedimentação das gotículas mantendo-as em suspensão por maior período de tempo. Na Figura 14 pode-se observar que a formulação contendo o Gelucire 44/14 apresenta-se mais viscosa do que a preparada com Tween 20/ Span 80.

Outro fator interessante abordado por Silva e Soares (1996), é que apesar do sistema EHL ser útil, a afinidade química entre os componentes da fase oleosa e o agente emulsificante também são muito importantes. Desta forma, mesmo que uma formulação seja estável com um emulsificante de determinada classe química, com valor de EHL particular, a característica pode não ser mantida ao se alterar a classe de emulsificante, mesmo que apresente o mesmo EHL.

Para ampliar o estudo, preparou-se formulações com tensoativos diferentes, conforme descrito na Tabela 8, mantendo o EHL entre 14 e 16 considerando os resultados anteriores. Nesta etapa avaliou-se em conjunto a influência do método de homogeneização (manual e ultra-turrax), realizando o teste de estabilidade preliminar, o qual compreende: a avaliação macroscópica, centrifugação, estresse térmico, microscopia óptica e reologia (este último apresentado na Figura 14). Estes testes visam acelerar o processo de degradação da formulação para estimar qual formulação pode se manter estável por um maior período de tempo. De acordo com Realdon et al. (2002), os procedimentos de manipulação, como energia de agitação, nível de dispersão, tempo de homogeneização e temperatura de preparação, podem influenciar significativamente as características e a estabilidade da emulsão, sendo indispensável associar ao estudo diferentes métodos de homogeneização.

Tabela 8 – Descrição dos tensoativos utilizados nas formulações com os respectivos valores de EHL.

Código	Tensoativos	EHL
F	Gelucire [®] 44/14	14,0
G	Tween 80	15,0
H	Steareth 20	15,3
I	Tween 20 + Span 80	16,0

Os resultados da análise macroscópica e do teste de centrifugação das formulações desenvolvidas (Tabela 8) com a finalidade de determinar o valor de EHL requerido para a lecitina de soja encontram-se descritos na Tabela 9. De acordo com a análise macroscópica, todas as formulações se mantiveram estáveis após o período de 24 horas. É desejável que o estudo de estabilidade seja realizado entre o período de 24 a 48 horas após o preparo da formulação, considerando que antes deste período a mesma pode não ter tido oportunidade de equilibrar-se plenamente, devido a instabilidade intrínseca do sistema (MASSON, 2005).

No ensaio de centrifugação observa-se que todas as formulações preparadas manualmente sofreram pequenas alterações de estabilidade na primeira etapa (106,2 xg/ 15 minutos), exceto a formulação que utilizou Gelucire[®] 44/14 como tensoativo (F). O processo de homogeneização por ultra-turrax gerou estruturas mais estáveis para as formulações F (Gelucire[®] 44/14) e I (Tween 20 + Span 80) até a segunda etapa de centrifugação (663,8 xg/ 15 minutos). No último estágio (1301 xg/ 15 minutos) todas as formulações sofreram alterações significativas.

Tabela 9 – Análise macroscópica e teste de centrifugação das emulsões com lecitina de soja desenvolvida em função da determinação do valor de EHL.

Código	Análise Macroscópica				Centrifugação			
	Manual	Ultra	106,2 xg		663,8 xg		1301 xg	
			Manual	Ultra	Manual	Ultra	Manual	Ultra
F	N	N	N	N	M	N	M	LM
G	N	N	LM	N	M	LM	M	LM
H	N	N	LM	N	M	LM	M	LM
I	N	N	LM	N	M	N	M	LM

Onde, N= Normal (estável); LM= Levemente Modificada e M= Modificada; - = não testada. F: Gelucire® 44/14; G: Tween 80; H: Steareth 20 e I: Tween 20/Span 80.

5.2.3. Estresse térmico

As formulações foram analisadas macroscopicamente, apresentando coloração marrom claro (bege). Na Figura 15, apresenta-se fotografias das formulações antes e após a exposição a altas temperaturas. O estresse térmico foi realizado expondo a formulação a temperaturas de 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80 °C com auxílio de banho termostatzado. Os resultados do teste envolvendo o estresse térmico estão apresentados na Tabela 10. Pode-se observar que as formulações F e H preparadas pelo processo de ultra-turrax mantiveram sem alterações visíveis de cor e separação de fase até 55 °C e apresentaram instabilidades visíveis a partir de 60 °C (Tabela 10). Um comportamento distinto foi visualizado para as formulações G (Tween 80) e I (Tween 20 + Span 80) que apresentaram alterações de cor e instabilidades a 55 °C.

Figura 15 – Aparência das formulações antes e após estresse térmico, onde: F: Gelucire® 44/14; G: Tween 80; H: Steareth 20 e I: Tween 20/Span 80 antes (esquerda) e após (direita) a exposição à temperatura.**Tabela 10** – Avaliação do comportamento das formulações durante estresse térmico.

Formulação	Estresse térmico (° C)																	
	40		45		50		55		60		65		70		75		80	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
F	N	N	N	N	N	N	N	N	M	LM	M	M	-	-	-	-	-	-
G	N	N	N	N	N	N	LM	LM	M	M	M	M	-	-	-	-	-	-
H	N	N	N	N	N	N	N	N	M	LM	M	M	-	-	-	-	-	-
I	N	N	N	N	N	N	LM	LM	M	M	M	M	-	-	-	-	-	-

N= Normal (estável); LM= Levemente Modificada e M= Modificada; - = não testada. F: Gelucire® 44/14; G: Tween 80; H: Steareth 20 e I: Tween 20/Span 80; 1: Manual; 2: Ultraturrax.

Segundo Moraes (2006), para se obter um sistema estável, além do EHL a concentração do tensoativo também é um fator importante, uma vez que o tensoativo forma uma película ao redor da gotícula de óleo. Assim, é provável que a redução do tamanho das gotículas pelo processo de homogeneização por alta velocidade e a característica físico-química dos tensoativos (Gelucire 44/14 e Steareth 20), possam ter formado um filme mais firme e compacto em volta da gotícula de óleo, conferindo uma maior proteção ao sistema, aumentando o tempo necessário para a desestabilização do mesmo à temperaturas elevadas.

5.2.4. Microscopia óptica

A análise de microscopia óptica das formulações foi realizada com o objetivo de avaliar a forma e a distribuição de tamanho dos glóbulos formados. A análise microscópica das amostras das formulações pode ser observada na Figura 16. As formulações preparadas pelo processo de ultra-turrax apresentaram glóbulos pequenos e homogêneos (Figura 16 - I, III, IV e V). Com o preparo manual (Figura 16 – II, IV, VI e VIII) observou-se uma menor homogeneidade, com glóbulos grandes quando comparados as demais formulações. Macroscopicamente foi possível verificar que com o aumento da velocidade de agitação as emulsões tornaram-se gradativamente mais aeradas, comportamento observado também na análise microscópica.

De acordo com os resultados obtidos no teste centrifugação, no estresse térmico e microscopia óptica observa-se que a formulação contendo Gelucire® 44/14 preparada pelo processo de homogeneização por ultra-turrax foi a que se manteve mais estável quando comparada às demais. De acordo com a equação de Stokes, a velocidade de sedimentação de uma partícula é diretamente proporcional ao tamanho das partículas na fase interna. Portanto, pode-se concluir que a redução do tamanho das gotículas é de grande importância para a manutenção da estabilidade física do sistema emulsionado. No entanto, além da redução do tamanho, é também importante manter a uniformidade de distribuição do tamanho das gotículas na fase interna.

Figura 16 – Fotografia da microscopia óptica das formulações no aumento de 100 x, onde: (I) Gelucire® 44/14 ultra-turrax (II) Gelucire® 44/14 manual; (III) Steareth 20 ultra-turrax; (IV) Steareth 20 manual; (V) Tween 80 ultra-turrax; (VI) Tween 80 manual; (VII) Tween/ Span ultra-turrax, (VIII) Tween/ Span manual.

O aumento da viscosidade da fase externa também contribuiu para o aumento da estabilidade da emulsão, dificultando a ocorrência de fenômenos físicos de instabilidade como

a presença de sedimentação, cristalização, cremeação, floculação e coalescência (SILVA; SOARES, 1996). Segundo Morais (2006), o aumento da velocidade de agitação ou da concentração de tensoativo são capazes de diminuir o tamanho das gotículas da fase oleosa, o que aumenta a viscosidade da emulsão. Há também de se considerar que incorporação de ar, proveniente de excesso de agitação, também pode ter contribuído para o aumento da viscosidade da formulação. No entanto, entre as formulações preparadas pelo mesmo processo, observou-se que o tensoativo foi o fator com maior influência para a homogeneidade e diminuição do tamanho das gotículas.

5.2.5. Homogeneização por alta pressão: análise macroscópica e teste de centrifugação

Na última etapa de estudo de formulação se avaliou o uso do homogeneizador de alta pressão. Um homogeneizador de alta pressão consiste de um gerador de alta pressão e sistema de válvulas de homogeneização, no qual a formulação passa sob alta pressão por uma seção convergente. O tamanho das partículas e as suas distribuições de tamanho se alteram de acordo com o número de ciclos e pressões usadas durante a homogeneização. Para que as gotas tornem-se pequenas, é necessário maiores quantidades de energia para que as gotículas sejam rompidas e tenham o seu tamanho reduzido (KOURNIATIS, 2008). Portanto, o estudo envolveu a caracterização da formulação submetendo-a a pressões de 100, 750 e 500 bar e a seis ciclos de passagem em cada pressão. A formulação que utilizou Gelucire[®] 44/14 foi a que se mostrou mais estável segundo os parâmetros avaliados nos testes anteriores (centrifugação, estresse térmico e análise microscópica), sendo portanto, selecionada para esse estudo. Os resultados da análise macroscópica e teste de centrifugação indicam que todas as amostras se mostraram estáveis (Tabela 11 e Figura 17).

Tabela 11 – Análise macroscópica e teste de centrifugação das emulsões com lecitina de soja em função da pressão empregada no processo de homogeneização.

Pressão (bar)	Ciclo	Análise macroscópica	Centrifugação (xg)		
			106,2	663,8	1301
1000	2	N	N	N	N
	3	N	N	N	N
	4	N	N	N	N
	5	N	N	N	N
	6	N	N	N	N
750	2	N	N	N	N
	3	N	N	N	N
	4	N	N	N	N
	5	N	N	N	N
	6	N	N	N	N
500	2	N	N	N	N
	3	N	N	N	N
	4	N	N	N	N
	5	N	N	N	N
	6	N	N	N	N

Onde, N= Normal (estável); LM= Levemente Modificada e M= Modificada; - = não testada.

Figura 17 – Fotografias das formulações obtidas pelos diferentes processos de homogeneização, onde: T0 = Pré-emulsão; MAN: Preparo manual; ULT: Preparo por ultra-turrax; (B) Homogeneizador de alta pressão à 1000 bar; (C) Homogeneizador de alta pressão pressão à 750 bar; (D) Homogeneizador de alta pressão à 500 bar.

5.2.6. Microscopia óptica

Durante o estudo utilizou-se um microscópio óptico o qual não permitiu visualizar a estrutura dos glóbulos das amostras obtidas pelo processo de homogeneização a alta pressão (aumento máximo de 500 x). Quando espalhadas na lâmina as amostras tiveram aspecto translúcido não sendo possível detectar os glóbulos. Muito provavelmente, esse comportamento se deve ao diminuto tamanho de partículas obtido por este processo. Conforme reportado na literatura, os homogeneizadores de alta pressão podem produzir emulsões com gotas de diâmetro muito pequeno, atingindo a escala nanométrica, além de uma estreita distribuição de tamanho de partículas (PERRIER-CORNET; GERVAIS, 2002; FLOURY, 2003).

5.2.7. Potencial zeta e tamanho de partícula

A carga elétrica do sistema e o tamanho da partícula foram analisados por potencial zeta e *light scattering*, os quais os resultados encontram-se expressos na Tabela 12. De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que o ultra-turrax gerou glóbulos de tamanhos submicrômicos (478 nm) e homogêneos. Quando a formulação foi homogeneizada manualmente sem agitação vigorosa (pré-emulsão) houve uma alta polidispersão (faixas diferentes de tamanho de gotículas) indicando uma baixa homogeneidade do sistema. As formulações submetidas ao processo de homogeneização por alta pressão não apresentaram diferenças significativas em cada ciclo ou pressão. No entanto, os resultados obtidos para as amostras do homogeneizador de alta pressão não estão de acordo com os estudos reportados na literatura científica, e provavelmente se deve a erros de leitura causados pela metodologia utilizada.

Em geral, o espalhamento de luz dinâmico é aplicado na caracterização de partículas, emulsões e moléculas previamente dispersas em um líquido. O feixe de luz é aplicado sobre a amostra, e o movimento browniano das partículas faz com que a luz laser seja espalhada com intensidades diferentes. A análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do movimento browniano a partir do qual é possível se determinar o tamanho de partícula através da relação Stokes-Einstein (PECORA, 1985). Portanto, o preparo da amostra é uma etapa importante para que o resultado seja confiável. Quanto ao potencial zeta não houve influência significativa de acordo com o processo. O valor de cargas elétricas está próximo ao reportado para a lecitina de soja (anfótera).

Tabela 12 – Potencial zeta e tamanho médio de partículas das formulações líquidas.

Processo	Ciclo	Zeta (mV)	Tamanho (nm)
<i>Ultra-turrax</i>	-	-3,62	478
<i>Pré-emulsão</i>	-	-2,06	4028 (59,7%)/1281 (26,8%)/ 377 (13,5)
<i>Manual</i>	-	-3,76	1765
<i>Homogeneizador de alta pressão 500 bar</i>	2		2182
	3		2124
	4	-1,96	4442 (92,8%)/ 740 (7,2%)
	5		2157
	6		2782
<i>Homogeneizador de alta pressão 750 bar</i>	2		1979
	3		3258
	4	-2,25	2478
	5		1819
	6		1846
<i>Homogeneizador de alta pressão 1000 bar</i>	2		1777
	3		3687(63,6%)/ 959,1 (36,4%)
	4	-2,14	2776
	5		1428
	6		1252

5.3. Secagem por *spray drying* e avaliação das propriedades físico-químicas do produto

5.3.1. Teor de umidade e atividade de água (A_a)

Em produtos biológicos, a presença de água facilita a ocorrência de reações de hidrólise e aumenta a probabilidade de ocorrência de outras reações de degradação, podendo levar à deterioração do produto, reduzindo assim seu tempo de prateleira. Além disso, os níveis de umidade podem influenciar em propriedades farmacotécnicas do produto como no grau de compressibilidade e na tendência de aglomeração das partículas (RATTES; OLIVEIRA, 2007; SOUZA; OLIVEIRA, 2012).

Baixos teores de umidade foram observados para os produtos secos, que variou de 0,3 a 1,79 %. O nível de umidade do produto sofre influência da natureza do material, caracterizado pelo tipo de interação do mesmo com as moléculas de água (TEWA-TAGNEA;

BRIANC; FESSI, 2007). O processo e condições de secagem também influem significativamente no teor de umidade e atividade de água. Em geral, o teor de umidade e a atividade de água tendem a diminuir com o incremento da temperatura de secagem (TEWATAGNEA; BRIANC; FESSI, 2007; CORTES-ROJAS, 2011; SOUZA; OLIVEIRA, 2012). Contudo, neste estudo este comportamento não foi observado confirmado pela análise de variância dos resultados experimentais ($p \geq 0,05$), que mostra que as diferenças observadas não foram significantes.

O teor de umidade indica a quantidade total de água presente no produto. Entretanto, nem toda água presente encontra-se disponível para crescimento microbiano ou para a participação em reações químicas como a hidrólise. A atividade de água é um indicativo da quantidade de água que se encontra disponível (TONON, 2009). Em produtos biológicos, níveis acima de 0,5 não são desejados por favorecerem o crescimento de microrganismos e a ocorrência de reações de degradação (KEEY, 1992). Os valores experimentais de atividade da água foram inferiores a 0,22 com pequena variação entre as amostras. Em estruturas amorfas a atividade de água é um parâmetro importante quando se considera a preservação da microestrutura, pois a água livre age como plastificante reduzindo a temperatura de transição vítrea e induz o processo de cristalização (ALVES; SANTANA, 2004). A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos em todas as secagens realizadas.

A nomenclatura utilizada para interpretação das figuras e tabelas relaciona as variáveis empregues no estudo, as quais se encontram descrito à seguir:

- ❖ **L100A:** adjuvante lactose secagem a 100 °C adicionado durante o preparo da formulação;
- ❖ **L100D:** adjuvante lactose secagem a 100 °C adicionado após o preparo da formulação ;
- ❖ **L120A:** adjuvante lactose secagem a 120 °C adicionado durante o preparo da formulação;
- ❖ **L120D:** adjuvante lactose secagem a 120 °C adicionado após o preparo da formulação;
- ❖ **L150A:** adjuvante lactose secagem a 150 °C adicionado durante o preparo da formulação;
- ❖ **L150D:** adjuvante lactose secagem a 120 °C adicionado após o preparo da formulação;
- ❖ **T100A:** adjuvante trealose secagem a 100 °C adicionado durante o preparo da formulação;
- ❖ **T100D:** adjuvante trealose secagem a 100 °C adicionado após o preparo da formulação;
- ❖ **T120A:** adjuvante trealose secagem a 120 °C adicionado durante o preparo da formulação;
- ❖ **T120D:** adjuvante trealose secagem a 120 °C adicionado após o preparo da formulação;
- ❖ **T150A:** adjuvante tralose secagem a 150 °C adicionado durante o preparo da formulação,
- ❖ **T150D:** adjuvante trealose secagem a 150 °C adicionado após o preparo da formulação.

Tabela 13 – Temperatura do ar de saída, teor de umidade e atividade de água das dispersões lipídicas obtidas na secagem por *spray drying*.

Amostra	T _{gs} (°C)	Xp (%)	A _a (-)
L100A	77,7 ±1,2	0,82±0,19	0,158±0,008
L100D	75,3 ±0,5	0,97±0,49	0,167±0,007
L120A	87,7 ±0,5	1,61±0,20	0,175±0,006
L120D	90,0 ±0,8	0,30±0,17	0,121±0,004
L150A	104,3 ±0,5	1,54±0,31	0,217±0,003
L150D	102,0 ±0,5	1,25±0,18	0,208±0,006
T100A	75,7 ±1,2	0,50±0,48	0,139±0,002
T100D	77,3 ±0,5	0,88±0,01	0,175±0,005
T120A	85,3 ±0,9	0,72±0,07	0,169±0,009
T120D	90,3 ±0,5	1,24±0,32	0,126±0,010
T150A	111,0 ±2,2	1,79±0,27	0,221±0,001
T150D	114,0 ±0,9	1,50±0,09	0,185±0,004

T_{gs}: temperatura do gás de saída (°C); Xp: teor de umidade (%); A_a: atividade de água (-).

5.3.2. Tamanho médio de partícula e distribuição granulométrica

O tamanho da partícula e a distribuição granulométrica dos produtos secos foi determinado por microscopia óptica e análise de imagens, utilizando-se o *software* Image Pro-Plus® 7.0. A Figura 18 apresenta a distribuição granulométrica do produto em função da temperatura do ar de secagem (100, 120 e 150 °C) e do tipo de adjuvante de secagem utilizado (trealose e lactose). A partir destes dados, determinou-se a faixa de diâmetro correspondente a 10 (d₁₀), 50 (d₅₀) e 90 % (d₉₀) da distribuição granulométrica, e sua polidispersão (Span). A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos.

Figura 18 – Distribuição granulométrica acumulada obtida por microscopia óptica e análise de imagens.

Tabela 14 – Efeito das condições de processamento nas características de tamanho das partículas.

Amostra	d_m	d_{10}	d_{50}	d_{90}	Span
L100A	9,84 $\pm$ 5,90	2,94	9,03	18,24	1,69
L100D	8,04 $\pm$ 4,94	2,51	7,07	14,69	1,72
L120A	10,00 $\pm$ 6,64	2,59	8,57	19,94	2,02
L120D	9,15 $\pm$ 6,11	2,59	7,84	17,01	1,84
L150A	13,65 $\pm$ 8,46	3,93	11,75	26,05	1,88
L150D	14,25 $\pm$ 9,47	3,95	12,12	24,49	1,98
T100A	8,79 $\pm$ 5,32	2,47	7,97	15,66	1,65
T100D	8,67 $\pm$ 4,96	2,71	7,96	15,43	1,60
T120A	8,13 $\pm$ 5,22	1,97	7,23	15,05	1,81
T120D	9,16 $\pm$ 5,74	2,46	8,19	16,89	1,76
T150A	8,99 $\pm$ 6,07	2,71	7,36	17,97	2,07
T150D	9,81 $\pm$ 5,18	2,51	8,12	18,77	2,02

d_m : diâmetro médio (μm); d_{10} ; d_{50} ; d_{90} são correspondentes ao tamanho de partícula a 10, 50 e 90 % da distribuição; SPAN = polidispersibilidade

O tamanho de partícula é influenciado por diversos fatores durante um processo de desidratação. As condições de secagem por *spray dryer* como a temperatura de gás de entrada (T_{ge}), a vazão de alimentação da composição de secagem e a vazão e pressão do ar de atomização são os principais responsáveis pela morfologia e tamanho de partícula formada. O adjuvante também desempenha um papel muito importante nas características finais do produto (TEWA-TAGNEA; BRIANC; FESSI, 2007; CORTES-ROJAS, 2011; SOUZA; OLIVEIRA, 2012). Pode-se observar que utilizando a lactose como adjuvante (L150A), o diâmetro médio da partícula sofreu alteração à temperatura de entrada do gás de secagem de 150 °C. Entretanto, não se observou alterações significativas nas mesmas condições de secagem utilizando a trealose. Os diâmetros médios da partícula para todas as formulações foram muito semelhantes, em média de $8,97 \pm 0,67$, e a amplitude de variação foi de $5,66 \pm 0,58$, exceto a L150A que apresentou tamanho médio de 13,65, e amplitude de variação de 8,46. A polidispersividade das partículas, representada aqui pelo valor de Span, sofreu influência direta da temperatura, aumentando proporcionalmente com a temperatura de secagem para todas as formulações (Tabela 14).

Alves e Santana (2004), investigaram as propriedades físicas de uma dispersão líquida de fosfatidilcolina de soja produzida por *spray dryer* para a obtenção de partículas lipídicas sólidas. Os autores usaram como adjuvantes o manitol e a temperatura do ar de entrada de 90 °C, obtendo partículas com diâmetros na faixa de 0,5 a 19,5 μm . De acordo com os autores, o comportamento dos pós produzidos pode estar associado às propriedades físicas e químicas da solução de alimentação e varia de acordo com as condições do processo. Chougule, Padhi e Misra (2007), produziram partículas para liberação pulmonar encapsulando tacrolimus

avaliando as características físicas dos pós comparando a lactose e trealose. Para a lactose as partículas obtidas tiveram tamanho médio de 12,5 μm e polidispersão 1,5; para a trealose 9,46 e Span de 1,4. Estes estudos corroboram com os resultados aqui encontrados, salientando que as variações podem ocorrer de acordo com o equipamento, condições operacionais e composição da formulação.

5.3.3. Morfologia

Os aspectos morfológicos das micropartículas se relacionam principalmente com a cinética de secagem e composição da formulação (TEWA-TAGNEA; BRIANC; FESSI, 2007; CORTES-ROJAS, 2011). A microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.) é uma ferramenta importante por ser capaz de visualizar estruturas em escala nanométrica e de mostrar em detalhes aspectos da superfície e da morfologia. A importância desta análise está no fato de que a funcionalidade e as propriedades de fluxo dos pós, assim como outras propriedades citadas anteriormente como solubilidade, higroscopicidade, armazenamento, entre outras estarem diretamente relacionadas com a estrutura da partícula (AULTON, 2005).

A Figura 19 apresenta fotomicrografias obtidas em M.E.V., onde se pode observar aspectos morfológicos da estrutura e da superfície das dispersões lipídicas contendo lactose e trealose secas em diferentes temperaturas de secagem, e dos adjuvantes puros. A análise das imagens evidencia partículas de forma arredondadas, o que é uma característica particular do processo *spray drying*, mas que pode sofrer alterações de acordo com o adjuvante utilizado. Na secagem por *spray drying*, as gotas atomizadas quando exposta a corrente de ar quente é instantaneamente desidratada, em geral conservando a forma das gotas nebulizadas, apenas reduzindo o tamanho das partículas devido ao encolhimento. Como a superfície exterior é mais exposta ao calor, ocorre a formação de uma crosta de característica plástica e de baixa porosidade (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Com algumas exceções, as partículas obtidas foram predominantemente rugosas e sem a presença visível de porosidades. O produto seco apresentou partículas com aparência fundida e aglomerada, provavelmente devido à higroscopicidade do produto, em função da composição empregada.

Resultados semelhantes foram obtidos por Lo, Tsai e Kuo (2004), ao investigar os efeitos de dissacarídeos, dentre eles lactose e trealose, na obtenção de microcápsulas com superóxido dismutase em *spray dryer*. Tewa-Tagnea, Brianc e Fessi (2007), analisaram a influência do adjuvante de secagem na estrutura morfológica de partículas lipídicas e verificaram que a lactose proporciona partículas de superfície lisa e arredondada. Rosenberg, Kopelman e Talmon (1990), citado por Tonon (2009), mostraram que adjuvantes com baixas propriedades de encapsulação originam microcápsulas com superfícies muito porosas, ásperas

e quebradiças, o que está de acordo com os resultados aqui apresentados. Com base nos resultados obtidos nesse estudo e relatos da literatura, é possível concluir que o tipo de adjuvante utilizado no processo de secagem pode alterar significativamente a microestrutura do produto, podendo afetar as características do produto final, como por exemplo a retenção de ativos, propriedades de liberação entre outras (LO; TSAI; KUO, 2004; TONON, 2009; FU et al., 2011, WU et al., 2011).

Continua

Continuação

Figura 19 – Micrografias obtidas por M.E.V. formulações contendo lactose e trealose secas em diferentes temperaturas de secagem, e dos excipientes puros. Onde: A, B e C: Formulação com lactose a 100, 120 e 150 °C respectivamente; D, E e F: Formulação com trealose a 100, 120 e 150 °C; G e H: excipientes trealose e lactose monohidratada, respectivamente.

5.3.4. Propriedades de fluidez dos pós (determinação da densidade aparente e de compactação, fator de Hausner e índice de compressibilidade)

Os dados experimentais da densidade aparente e de compactação foram obtidos para todas as formulações obtidas por *spray dryer*. No geral, o produto apresentou baixa densidade sendo em média 0,22 a 0,37 g/cm³ para densidade aparente e 0,25 ±0,41 g/cm³ a de compactação). A partir dos resultados obtidos de densidade foram determinados o Fator de Hausner (FH) e o Índice de Carr (IC), apresentados na Tabela 15. FH e IC são medidas indiretas que podem prever o comportamento de fluxo e de compressão dos pós em uma aplicação industrial, tais como o enchimento de cápsulas e produção de comprimidos. Na

Tabela 16, pode ser encontrada uma classificação do comportamento dos pós segundo estes índices (USPXXX, 2014).

Tabela 15 – Propriedades de fluidez e compactação das formulações obtidas por *spray dryer*.

Amostra	d_a (g/cm ³)	d_c (g/cm ³)	FH (-)	IC (-)
L100A	0,37 ±0,01	0,41 ±0,00	1,04	9,68
L100D	0,43 ±0,00	0,48 ±0,01	1,00	6,90
L120A	0,28 ±0,03	0,32 ±0,01	1,04	12,50
L120D	0,32 ±0,01	0,35 ±0,00	1,03	6,45
L150A	0,22 ±0,01	0,25 ±0,00	1,07	12,50
L150D	0,27±0,01	0,31±0,01	1,15	14,81
T100A	0,37 ±0,00	0,41 ±0,01	1,07	9,68
T100D	0,32 ±0,02	0,38 ±0,01	1,07	11,76
T120A	0,30 ±0,01	0,34 ±0,01	1,07	12,50
T120D	0,29 ±0,03	0,32 ±0,02	1,04	10,00
T150A	0,26 ±0,01	0,29 ±0,02	1,04	9,68
T150D	0,25±0,02	0,30±0,01	1,20	20,00

D_a : densidade aparente; d_c : densidade de compactação; FH: Fator de Hausner e IC: Índice de Carr.

Tabela 16 – Classificação das propriedades de fluidez de pós associada ao FH e IC de acordo com a Farmacopéia dos Estados Unidos (2014).

Propriedade de fluxo	FH	IC
Excelente	1,00-1,11	<10
Bom	1,12-1,18	11-15
Razoável	1,19-1,25	16-20
Tolerável	1,26-1,34	21-25
Ruim	1,35-1,45	26-31
Muito ruim	1,46-1,59	32-37
Extremamente ruim	>1,60	>38

FH: Fator de Hausner e IC: Índice de Carr.

Analisando resultados apresentados na Tabela 15, observa-se que para todas as formulações secas o fluxo dos pós pode ser classificado como de excelente fluidez, uma vez que o FH manteve de 1,00 a 1,07. O IC foi de 6,45 a 12,5, também considerado excelente. O FH está relacionado com o atrito das partículas e consequentemente com seu fluxo.

O fluxo de um pó está diretamente relacionado com as propriedades da partícula como a adesão e a coesão. A adesão pode ser considerada como uma força molecular que ocorre entre superfícies diferentes. Estas forças são principalmente decorrentes das interações de van der Waals e aumentam inversamente ao tamanho de partícula (AULTON, 2005). Neste caso, considera-se que o produto obtido, independente do processo de emulsificação e do

adjuvante (lactose ou trealose), possui baixa força de coesão e baixa interação entre as superfícies o que facilita o processo de compressão e do fluxo do pó.

Características farmacotécnicas como solubilidade e fluidez estão diretamente relacionadas com o tamanho da partícula. Quanto menor o tamanho da partícula menor será a fluidez obtida e maior a solubilidade (AULTON, 2005). Desta forma, pode-se dizer que as propriedades de fluidez das partículas formadas, apresentam valores interessantes para um posterior processamento industrial. Além disso, a forma da partícula pode ter influenciado nesta característica, pois quanto mais arredondada é uma partícula, menores serão os espaços de ar dentro das misturas de pós, facilitando assim o seu rolamento e consequentemente seu escoamento (USPXXX, 2014; AULTON, 2005).

5.3.5. Difração de Raios-X

Entre as técnicas cristalográficas, a difração de raio-x é a mais empregada no setor farmacêutico devido a sua utilidade, simplicidade e rapidez. A técnica permite observar a interação dos componentes numa mistura (complexação) e o tipo de estrutura molecular formado (amorfo ou cristalino). A Figura 20 apresenta o perfil de difração de raio-x dos componentes isolados da formulação (PCH90, lactose e trealose). A fosfatidilcolina de soja (Figura 20-A) apresentou um pico em aproximadamente 20° com característica estrutural amorfa, observado pela presença de um pico largo. Cada substância em particular possui um arranjo molecular específico e que pode ser visualizado através de gráficos gerados no difratograma (CAO et al., 2005). De acordo com a literatura, o pico encontrado neste perfil de difração é característico das fosfatidilcolinas, dipalmitoilfosfatídilcolina (DPPC) e distearoilfosfatídilcolina (DSPC) (ALVES; SANTANA, 2004; KIKUCHI; YAMAUCID; HIROTA, 1991). Os gráficos obtidos para a lactose monohidratada (Figura 20-B) e a trealose (Figura 20-C) demonstram características cristalinas caracterizada pelos picos estreitos e longos. No entanto, a lactose apresenta uma menor intensidade de picos, o que indica uma menor cristalinidade quando comparada à trealose (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006; ROOS, 2002; JAIN; ROY, 2009).

Figura 20 – Difrátogramas dos componentes isolados da formulação, onde: (A) PCH90 (lecitina de soja hidrogenada); (B) Lactose e (C) Trealose.

Na Figura 21 apresenta-se o perfil dos difratogramas obtidos a partir das formulações secas por *spray dryer* em função da temperatura do ar de entrada (100, 120 e 150°C) e do tipo de adjuvante empregado (lactose e trealose). Ao comparar o perfil difratométrico dos componentes separados e da formulação seca pode-se observar que tanto a lactose como a trealose foram totalmente incorporadas na formulação. Segundo Cao, Guo e Ping (2005), as diferenças nas amostras analisadas, como o surgimento ou desaparecimento de picos ou mudanças nas intensidades relativas, constituem indícios de formação de complexos. A indicação de homogeneidade assegura que todos os componentes estão presentes na matriz lipídica formando uma única estrutura com características particulares, como por exemplo, de solubilidade e ressuspensão.

Figura 21– Difratoograma das formulações em função da temperatura do ar de secagem e dos adjuvantes, onde: (A) Trealose a 100 °C; (B) Trealose a 120 °C; (C) Trealose a 150 °C; (D) Lactose a 100 °C; (E) Lactose a 120 °C e (F) Lactose a 150 °C.

Durante o processo de secagem por *spray drying* avaliou-se a influência da temperatura do ar de secagem no arranjo molecular da partícula do produto. De acordo com o arranjo molecular, as substâncias no estado sólido podem ser classificadas como cristalinas, amorfas ou uma combinação das duas. A forma cristalina é definida por uma organização das moléculas segundo uma ordem definida e que se repete por toda a partícula. Quando as moléculas não apresentam este arranjo definido e repetido denomina-se como amorfo (AULTON, 2005). Nos difratogramas, a repetição dos picos em sinais estreitos e longos

caracterizam um maior grau de cristalinidade das estruturas. Picos largos ou pequenos indicam a presença de domínios amorfos (desordenamento) (BLEICHER; SASAKI, 2014; CANO CHAUCA et al., 2005). O arranjo molecular da estrutura de um produto é de fundamental importância, pois pode influenciar várias propriedades físicas dos pós secos, tais como estabilidade, viscosidade, porosidade, solubilidade e capacidade de fluxo (AULTON, 2005). Assim conhecer os efeitos do processo de secagem sobre a cristalinidade, tais como as propriedades da atomização, tempo de residência das gotículas na câmara de secagem, viscosidade da solução de alimentação e do tipo de adjuvante de secagem são de fundamental importância, sendo previamente reportados por diversos autores (ALVES; SANTANA, 2004; GARCIA; PEREIRA; DIAS, 2012; CORTÉS-ROJAS; OLIVEIRA, 2012).

Pode-se observar através das características dos difratogramas que as estruturas do produto foram mais dependentes do adjuvante utilizado do que da temperatura da secagem, uma vez que nas mesmas condições se obteve estruturas diferentes de acordo com o adjuvante utilizado (Figura 21). Os produtos secos gerados a partir da composição contendo trealose e lactose na secagem a 100 °C (Figura 21 – A e D) evidenciam a formação de um pico largo, de intensidade semelhante, característico de estruturas amorfas. No entanto, para a composição à base de trealose, o aumento da temperatura do ar de secagem acarretou um aumento no número de picos, que indicam a formação de uma estrutura semi-cristalina. Nas formulações contendo lactose o perfil amorfo foi mantido nas três faixas de temperatura.

Este fato pode estar relacionado à temperatura de transição vítrea da formulação alimentada, pois o grau de cristalinidade de um produto depende tanto das condições de secagem como das propriedades da composição alimentada (CORTÉS-ROJAS; OLIVEIRA, 2012). A fosfatidilcolina possui uma transição vítrea de 55 °C, e o uso do adjuvante pode elevar a temperatura de transição vítrea da mistura, permitindo assim utilizar elevadas temperaturas de secagem. Os adjuvantes incorporados na formulação, trealose e lactose, possuem uma temperatura de transição vítrea de 117 e 101°C, respectivamente (ROOS, 2002; JAIN; ROY, 2009). Possivelmente, nas secagens a 120 e 150 °C a temperatura de transição vítrea foi ultrapassada favorecendo a reorganização das moléculas e cristalização da estrutura. Isso é explicado pela Teoria de Williams-Lendell-Ferry, o qual descreve o processo de cristalização de polímeros, que sugere que a cristalização ocorre mais rapidamente acima da temperatura de transição vítrea (WILLIAMS; LANDEL; FERRY, 1955; CHIOU; LANGRISH, 2007). Segundo Chiou e Langrish (2007), o processo de cristalização é afetado pelo peso molecular e estrutura da molécula. Resultados similares foram reportados por Cortez-Rojas e Oliveira (2012), em estudo que avaliaram as propriedades físico-químicas de composições fitofarmacêuticas secas em *spray dryer* em função de diferentes adjuvantes de

secagem. Como a lactose possui uma estrutura molecular com menor grau de cristalinidade que a trealose, a organização da estrutura foi menor.

Na Figura 22 encontram-se os difratogramas das formulações que tiveram o adjuvante adicionado após o preparo. Pode-se observar que as formulações contendo lactose (Figura 22 – A, C e E) mantiveram os picos característicos da estrutura do adjuvante isolado. Esse fato demonstra que a lactose não foi totalmente incorporada na formulação. A trealose, independente da forma pela qual foi adicionada na formulação, a temperatura de 100 °C, levou a formação de uma nova estrutura organizacional. Esses resultados provavelmente têm relação com a solubilidade (ou insolubilidade) dos excipientes empregados.

Figura 22 – Difratograma das formulações com a adição do adjuvante de secagem após o preparo, onde: (A) Lactose a 100 °C; (B) Trealose a 100 °C; (C) Lactose a 120 °C; (D) Trealose a 120 °C; (E) Lactose a 150 °C e (F) Trealose a 150 °C.

Os sólidos amorfos são ditos mais solúveis e menos estáveis do que seus cristais correspondentes (AULTON, 2005). A solubilidade é uma característica importante, que está intimamente relacionada com a capacidade de ressuspensão do produto. Entretanto, também se é necessário avaliar o impacto da estrutura sobre a estabilidade e funcionalidade do produto.

5.3.6. Eficiência de encapsulação (EE)

O resultado da análise de variância revela que a eficiência de encapsulação da cafeína foi afetada pela forma de preparo da formulação e pela temperatura do ar de secagem (Figura 23) apresentando significância estatística ($p \leq 0,05$). De forma geral, para as catequinas EGCG e ECG não se observa diferenças significativas na retenção dos ativos mantendo em média, considerando todas as condições avaliadas para EGCG e ECG, $71,3 \pm 5$ e $71,33 \pm 5,38$, respectivamente.

Na Figura 23, pode-se observar que a retenção de EGC e EGCG sofrem pequena influência das condições de processamento. Observa-se entretanto uma pequena diferença de acordo com a estrutura da catequina, com valores superiores para EGCG (média de $76,3 \pm 5,2$) em comparação com EGC (média de $72,5 \pm 5,4$), considerando todas as condições estudadas. A interação dos compostos bioativos com a formulação pode ser afetada por vários fatores, tais como característica do lipídeos, adjuvante de secagem e o tipo de tensoativo. Cortés-Rojas, Souza e Oliveira (2014), observaram diferenças significativas durante a encapsulamento de eugenol e acetato eugenol em dispersões lipídicas em função da concentração e do tipo de tensoativo, além de outros fatores como adjuvante de secagem, justificando as necessidades de trabalhos que avaliem os efeitos de composição na EE. Os resultados de EE obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura corrente de encapsulação por *spray drying*, que reportam valores de EE variando de 70 a 95 %, para vários tipos de materiais (CHOUGULE; PADHI; MISRA, 2007; SOUZA; OLIVEIRA, 2012; AGHBASHLO et al., 2012).

Figura 23 – Eficiência de encapsulação (EE%) das dispersões lipídicas secas obtidas por *spray dryer* em função das variáveis do processo, onde: (A) EE% da EGCG; (B) EE% da cafeína; (C) EE% da ECG.

5.3.7. Redispersão

As dispersões lipídicas secas obtidas por *spray drying* apresentaram alta capacidade de redispersão em água. Quando redispersa em água nas concentrações originais, a formulação se apresentou homogênea e sem separação de fases no período avaliado de 30 dias. Qualitativamente, a composição redispersa foi similar a formulação preparada originalmente, não apresentando quaisquer sinais organolépticos de instabilidade. Esta avaliação demonstra que a formulação desenvolvida inicialmente é prontamente redispersível e capaz de recuperar as mesmas características iniciais, ou seja, antes do processo de secagem. A viabilidade deste estudo está em considerar que o produto pode ser comercializado na forma de pó favorecendo a vida de prateleira, transporte e armazenamento. Além disso, os pós são mais facilmente dosados e manuseados para preparações, podendo ser administrado de forma direta ou utilizado na preparação de outras formas farmacêuticas e/ou em produtos alimentícios (AULTON, 2005; OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009).

5.3.8. Desempenho da secagem

O desempenho da secagem por *spray dryer* foi avaliado através da recuperação do produto (R), estimado pela razão entre a massa do pó recolhido e a massa total de sólidos alimentados no equipamento (SOUZA, 2003). A aderência do material nas paredes na câmara do secador é um dos principais obstáculos encontrados durante a secagem de composições lipídicas (SKALKO-BASNET; PAVELIC; BECIREVIC-LACAN, 2000). Vários métodos tem sido propostos para reduzir a aderência do produto durante a secagem, incluindo a adição de adjuvantes de secagem. Os resultados apresentados na literatura têm comprovado os bons resultados do uso de dissacarídeos como a sacarose, lactose e trealose na estabilização de sistemas lipídicos durante a secagem (VICTORIA; ANANINGSIH; WEIBIAO, 2011; INGVARSSON et al., 2011; INGVARSSON et al., 2013). Neste estudo, a trealose e a lactose foram adicionadas com função principal de adjuvante de secagem e para preservar a estrutura dos lipídeos durante o processo de desidratação, posterior armazenamento e reconstituição do produto.

Os valores experimentais de recuperação do produto foram na faixa de 47 a 56,5 % (Figura 24), exceto para as formulações que foram secas a 150 °C as quais praticamente não foram recuperadas aderindo ao equipamento. Os valores de recuperação do produto obtidos neste trabalho (média $51,3 \pm 3,5$ %) estão de acordo com os resultados encontrados em literatura para secadores (*spray drying*) de bancada, onde é possível encontrar valores de recuperação na faixa de 30 a 80% para os mais diversos tipos de materiais (RATES; OLIVEIRA, 2007; CORTES-ROJAS, 2011; FERNANDES, 2013).

A análise estatística dos dados experimentais apresentaram significância ($p \leq 0,05$) com tendência de diminuição de R com o aumento da temperatura de secagem. De forma geral, houve tendência de maior recuperação na secagem realizada à 100 °C utilizando a trealose como adjuvante. Uma das principais funções dos adjuvantes é elevar a temperatura de transição vítrea do material a ser seco, reduzindo assim sua tendência à aglomeração durante a secagem e armazenamento do produto (OLIVEIRA; FREITAS; FREIRE, 2009). No entanto, o aumento da temperatura de transição vítrea do produto também depende da característica dos componentes da formulação. O fosfolipídio utilizado nas formulações apresenta temperatura de transição vítrea de aproximadamente 55 °C, a lactose 101 °C, a trealose 117 °C; e o ponto de fusão dos excipientes lipídicos utilizados são aproximadamente de 120 °C, 44 °C e 148 °C, respectivamente, para a fosfatidilcolina de soja hidrogenada, Gelucire® 44/14 e o colesterol. Assim, se pode esperar uma maior recuperação para menores temperaturas de secagem, de acordo com resultados obtidos neste trabalho.

A trealose é o excipiente de escolha na maioria dos estudos reportados na literatura envolvendo materiais lipídicos e biológicos. Trata-se de um dissacarídeo não redutor que apresenta uma boa interação com o lipídio através de ligações de hidrogênio (CROWE; CROWE; CHAPMAN, 1984; CROWE; CROWE, 1995). A trealose é normalmente usada em estudos comparativos, em parte devido à sua alta temperatura de transição vítrea e baixo peso molecular (INGVARSSON et al., 2011). Entretanto, os resultados obtidos nesse trabalho mostram que a lactose gerou resultados similares aos obtidos com a trealose. A lactose também é um excipiente muito utilizado no setor farmacêutico devido ao seu baixo custo, quando comparado à trealose, e boas propriedades como aglutinante, agente de enchimento e/ou fluidez (ROWE; SHESKEY; POWEN, 2006).

Figura 24 – Recuperação (%) da formulação seca pelo processo de *spray drying*.

Na Figura 25, pode-se observar o aspecto visual das dispersões lipídicas secas de chá-verde obtidas por secagem em *spray drying*.

Figura 25 – Fotografias das formulações após o processo de *spray drying* no tempo zero, onde: L100A: adjuvante Lactose adicionada durante o preparo da emulsão e seca a 100°C, L: Lactose - T: Trealose; A e D: se refere à adição do excipiente durante e após o preparo da emulsão, respectivamente; 100, 120 e 150: temperaturas de secagem utilizadas (°C).

5.4. Avaliação da estabilidade oxidativa em Rancimat®

5.4.1. Avaliação da dose-resposta

Os antioxidantes podem apresentar diferentes comportamentos de acordo com a concentração utilizada, podendo atuar como antioxidante ou até mesmo como pró-oxidante induzindo a ocorrência do processo de oxidação (RAMALHO; JORGE, 2006). O comportamento antioxidante do produto em função da sua concentração no óleo de soja, foi avaliado de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1988). O estudo abrangeu concentrações do antioxidante de 100, 200, 300, 400 e 500 ppm. Na Figura 26, apresenta-se uma análise comparativa entre os antioxidantes avaliados relacionando-se o FP em função da concentração.

Figura 26 – Relação do fator de proteção do antioxidante com relação à concentração avaliada.

O tempo necessário para a ocorrência da taxa máxima de oxidação do óleo de soja (PI), sem adição de antioxidantes (controle) foi de $5,97 \pm 0,007$ horas. Os padrões de referência avaliados foram o BHT e o BHA, os quais apresentaram efeito antioxidante considerando que o FP foi maior que 1. No entanto, observa-se que independente da concentração, não houve aumento significativo da efetividade dos antioxidantes, mantendo em média o FP igual a $1,26 \pm 0,07$ e $1,24 \pm 0,14$, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados na literatura (MENDONÇA, 2009).

O extrato liofilizado de chá-verde demonstrou efetividade semelhante aos antioxidantes sintéticos BHT e BHA, obtendo em média um fator de proteção de $1,19 \pm 0,05$ nas concentrações avaliadas. Quando comparada a média do FP do extrato liofilizado ao da formulação (extrato encapsulado) na concentração de 200 ppm, observa-se que houve uma aumento considerável no FP, atingindo uma efetividade 52,9 % maior. Para o L100A os resultados demonstram que o aumento da concentração do produto de 50 para 100 ppm de extrato aumentou sua efetividade em 26,4 %, e de 100 para 200 ppm cerca de 11,7 %, concluindo que a concentração ideal de uso permanece entre 50 e 100 ppm.

Para melhor elucidar a influência do processo de encapsulação do extrato em sua atividade antioxidante, foram analisados separadamente a atividade antioxidante da lecitina de soja e da formulação (branco) na concentração de 200 ppm, sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 27. Pode-se observar que a lecitina de soja (PCH 90) possui atividade

antioxidante semelhante ao extrato liofilizado de *Camellia sinensis* na proporção utilizada na formulação que é de 28,2 %. Atualmente a lecitina é utilizada como antioxidante, sendo admitido o seu uso na concentração máxima de 2000 ppm (BRASIL, 1988). No entanto, o extrato encapsulado demonstrou maior atividade do que a formulação e à lecitina isolada, aumentando em 52,9 % a atividade do extrato liofilizado, apresentando portanto, um efeito sinérgico ou aditivo quando associado à lecitina de soja.

Figura 27 – Análise comparativa do fator de proteção da formulação e de seus componentes isolados.

As catequinas isoladas demonstram grande potencial antioxidante, apresentando na menor concentração avaliada, atividade 21 % maior que o extrato liofilizado. No entanto, no extrato liofilizado existem muitos compostos que são capazes de agir sinergicamente, ou seja, atuar simultaneamente potencializando a atividade do extrato. Por este motivo, uma concentração de extrato onde o teor é de apenas 15,3 % $\pm$ 1,2 EGCG, possui atividade próxima ao da EGCG isolada. No estudo realizado por Moraes (2009), foi adicionada a concentração de catequinas na proporção encontrada no extrato de chá-verde para avaliar se a atividade antioxidante era provinda apenas das catequinas. O estudo demonstrou que nem toda ação antioxidante do extrato é somente devida às catequinas, evidenciando que possivelmente existam outros componentes antioxidantes atuando de forma aditiva ou sinérgico.

5.4.2. Efeito sinérgico

Um antioxidante deve reunir inúmeras vantagens para ser incorporado em um produto alimentício, dentre os quais pode-se citar a ausência de toxicidade, não influir nas características organolépticas do produto e ainda ser efetivo em baixas concentrações. No entanto, é muito difícil encontrar um antioxidante que reúna todas as características desejadas, sendo necessário recorrer a outras estratégias. Alguns ativos demonstram possuir um efeito sinérgico quando associado a outras moléculas, podendo aumentar a atividade dos

antioxidantes primários, sendo uma interessante estratégia substituir ou combinar estes compostos diminuindo sua quantidade nos alimentos (JORGE; RAMALHO, 2006; MORAES, 2009; GALVAN et al., 2014; BORSATO et al., 2014). Para avaliar o sinergismo entre os antioxidantes foi realizado um planejamento através de combinações observando o comportamento individual e associado na concentração de 200 ppm das misturas de chá-verde, formulação, BHA e BHT, evidenciados na Figura 28.

Figura 28 – Gráfico comparativo evidenciando efeito sinérgico entre os antioxidantes.

De forma geral, pode-se observar que em nenhum dos gráficos apresentados na Figura 28, houve maior atividade na associação entre os antioxidantes. Esse dado mostra que não há efeito sinérgico na associação destas matrizes.

Na literatura é reportado que o BHA e o BHT são sinérgicos entre si, sendo que o BHA age sequestrando os radicais peróxidos e o BHT regenerando os radicais BHA (JORGE; RAMALHO, 2006). Entretanto este relato diverge do evidenciado neste estudo, que estão de acordo com resultados observados por Galvan et al. (2014), em estudos envolvendo biodiesel. Pode-se supor que dependendo da matriz em estudo pode haver influência no mecanismo de

degradação envolvido, alterando a efetividade do antioxidante (JORGE; RAMALHO, 2006; PRADO, 2009; GALVAN et al. 2014).

5.4.3. Tempo de prateleira (*shelf life*)

Existem vários métodos para quantificar a estabilidade de óleos e gordura, tendo como finalidade estimar o tempo de prateleira do material. O Rancimat é um método acelerado e atualmente é o método oficial para a determinação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras estabelecido pela American Oil Chemists' Society (AOCS). O método possibilita estimar o tempo de prateleira por uma extrapolação até a temperatura ambiente (AOCS, 2003; GORTZI, et al., 2008; PEREIRA, 2010). Na Tabela 17, apresentam-se as equações obtidas com os coeficientes de correlação e o tempo estimado de armazenamento a 20 °C para o óleo de soja sem aditivos e após a adição do extrato liofilizado de *Camellia sinensis* e na forma encapsulada (L100A). O padrão de referência foi o óleo de soja comercial Liza®, de forma a obter uma avaliação comparativa mais efetiva, através de um produto de mercado.

Tabela 17 – Estimativa do período de armazenamento do óleo de soja a 20 °C, dos padrões e formulações teste, com as equações e os respectivos coeficientes de correlação.

Amostra	Concentração (ppm)	Equação	r^2	<i>Shelf life</i> a 20°C (anos)
Chá-verde	200	$t = 27489,55.e^{(-0,075.T)}$	0,997	0,70
L100A	100*	$t = 45665,43.e^{(-0,077.T)}$	0,996	1,12
Óleo de soja	-	$t = 19294,05.e^{(-0,073.T)}$	0,999	0,51
Óleo Liza®	-	$t = 44540,98.e^{(-0,0786.T)}$	0,994	1,06

* Concentração de extrato liofilizado de chá-verde contido na formulação; *t*: *Shelf life*; *e*: função exponencial; *T*: temperatura de armazenamento.

De acordo com os valores apresentados na Tabela 17, considerando a extrapolação, observou-se que o óleo de soja (sem antioxidante) a 20 °C, apresenta um tempo de armazenamento de aproximadamente 6 meses (0,51 anos). Com a adição de 200 ppm de extrato liofilizado de chá-verde, observou-se que o tempo máximo de estocagem aumentou 3 meses, passando para 8,4 meses (0,8 anos). Quando comparado ao extrato encapsulado (L100A) houve um aumento no tempo de prateleira de 7,44 meses, sendo 2,19 vezes maior do que o extrato antes do processo de encapsulação, com expectativa semelhante ao padrão (Óleo Liza®) que atingiu um tempo de prateleira estimado em 12,73 meses (1,06 anos).

A partir dos resultados obtidos, observa-se que houve um aumento progressivo no período de indução oxidativa do óleo de soja quando utilizou-se o chá-verde encapsulado.

Desta forma, avalia-se se os objetivos propostos do trabalho de pesquisa, como obter um sistema estável e eficiente, foram alcançados. Os resultados encontrados demonstram uma maior efetividade do extrato encapsulado provavelmente pela maior solubilidade proporcionada pelo agente encapsulante, além da maior preservação dos ativos contra a degradação térmica e exposição ao oxigênio. De acordo com a literatura, estas são as principais características que influenciam na efetividade e, portanto, na escolha do antioxidante para cada produto (JORGE; RAMALHO, 2006; PRADO, 2009; GALVAN et al. 2014).

6. Conclusões

6. Conclusões

6.1 Estudo da formulação

O estudo da formulação demonstrou a importância do uso do sistema co-solvente para a solubilização da lecitina de soja selecionando-se o álcool n-butilico. O EHL, o tipo de tensoativo e a técnica de preparo (manual, ultra-turrax e homogeneização por alta pressão) da formulação influenciam diretamente a estabilidade do sistema. Para a formulação estudada, o tensoativo que conferiu uma maior estabilidade a formulação foi o Gelucire® 44/14, sendo selecionado para prosseguimento com o processo de secagem.

6.2 Processo de secagem

O desempenho do processo foi adequado e os resultados demonstraram que a lactose possui potencial de emprego como adjuvante de secagem para carreadores lipídicos, em substituição à trealose. O rendimento do processo atingiu em média $51,3 \pm 3,5\%$, típico para secadores do tipo *spray dryer* em escala laboratorial.

A temperatura ideal nas condições de secagem utilizada neste estudo foi de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, obtendo-se partículas arredondadas e de superfície rugosa, independente das variáveis estudadas. O aumento da temperatura de secagem provocou um ligeiro aumento no diâmetro médio de partícula quando a lactose foi utilizada como adjuvante de secagem ($9,8 \pm 5,9\text{ }\mu\text{m}$ para $13,65 \pm 8,4\text{ }\mu\text{m}$).

Os pós obtidos apresentaram baixa densidade e ótimas propriedades de fluxo e de compressão (fator de Hausner $< 1,25$ e índice de Carr $< 15\%$). O produto foi prontamente redispersível, recuperando facilmente sua consistência e características originais.

6.3 Estabilidade oxidativa em Rancimat®

A avaliação da estabilidade oxidativa acelerada utilizando Rancimat demonstrou que o processo de encapsulação conferiu uma maior solubilidade e proteção dos compostos bioativos, levando ao aumento da atividade antioxidante, evidenciando um efeito sinérgico entre a formulação e o extrato de chá-verde.

6.4 Conclusões gerais

Os resultados obtidos nesse estudo confirmam a viabilidade da encapsulação de compostos bioativos a partir de dispersões lipídicas pelo processo *spray drying*. Durante o desenvolvimento do projeto foi possível avaliar e otimizar o uso de excipientes e condições de produção avaliando os possíveis impactos no processo e nas características finais do

produto. Através do estudo de estabilidade oxidativa foi confirmada a viabilidade do estudo, demonstrando as vantagens conferidas ao chá-verde após a encapsulação dos compostos bioativos, revelando um produto com potencial para ser utilizado na produção de formas de dosagem orais, nutracêuticos e produtos cosméticos, podendo ser administrado de forma direta ou utilizado como ingrediente bioativo.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em: < <http://www.abiove.com.br> >. Acesso em: 09 de novembro 2014.

ABISMAIL, B.; CANSELIER, J.P.; WILHELM, A.M.; DELMAS, H.; GOURDON, C. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 6, p. 75-83, 1999.

AGHBASHLO, M.; MOBLI, H.; RAFIEE, S.; MADADLOU, S. Optimization of emulsification procedure for mutual maximizing the encapsulation and energy efficiencies of fish oil microencapsulation. **Powder Technology**, v. 225, p. 107-117, 2012.

ALVES, G.P.; SANTANA, M.H.A. Phospholipid dry powders produced by spray drying processing: structural, thermodynamic and physical properties. **Powder Technology**, v. 145, p. 139-148, 2004.

AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of Green tea catechins in a b-carotene-linoleate model system. **Journal of Food Lipids**, v. 2, p. 47-56, 1995.

ANANINGSIH, V. K.; SHARMA, A.; ZHOU, W. Green tea catechins during food processing and storage: a review on stability and detection. **Food Research International**, v. 50, p. 469-479, 2013.

ANSEL, H.C., POPOVICH, N.G., ALLEN, L.V. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**, 6 ed. São Paulo: Editorial Premier, 1999.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183-198, 2002.

ANVISA. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. 2ª edição. Brasília: Anvisa, 2008. 120 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/material/guia_cosmetico.pdf> Acesso em: 05 de novembro de 2014.

AOCS. American Oil Chemists Society. Official methods and recommended practices of the AOCS. Champaign: AOCS, 2003.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos: teoria e prática**, 3 ed. Viçosa: UFV, 2004. 478 p.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

AZZINI, R.G. **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo* de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos**. São Paulo, 1999. 169 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BALENTINE, D.A.; WISEMAN, S.A.; BOUWENS, L.C.M. The chemistry of tea flavonoids. **Food Science Nutrition**, v. 37, p. 693-704, 1997.

- BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 167-179, 2007.
- BERGONZI, M.C.; HAMDOUN, R.; MAZZACUVA, F.; ISACCHI, B.; BILIA, A. R. Optimization, characterization and in vitro evaluation of curcumin microemulsions. **Food Science and Technology**, v. 59, p. 148-155, 2014.
- BERTAN, L.C. **Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco**. 2003. 149 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2003.
- BETAGIRI, J.V.; JENKINS, S.A.; PARSONS, D.L. **Liposomes Drug Delivery System**. Lanchester, Basel, Switzerland: Technomic Publishing Co. Inc; 1993, p. 7-20.
- BLEICHER, L.; SASAKI, J.M. Introdução à difração de raios-x em cristais. Disponível em: <<http://www.fisica.ufc.br/raiosx/LBRX.html>. Acesso em 10 de maio de 2014.
- BORSATO, D.; CINI, J.R.M.; SILVA, A.C.; COPPO, R.L.; ANGILELLI, K.G.; MOREIRA, I.; MAIA, E.C.R. Oxidation kinetics of biodiesel from soybean mixed with synthetic antioxidants BHA, BHT and TBHQ: Determination of activation energy. **Fuel Processing Technology**, v. 127, p. 111-116, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Brasília, DF, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de novembro de 1988. Brasília, DF, 1988.
- BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L.B.; FRAGA, M.; KOESTER, L.S.; TEIXEIRA, H.F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.
- CABRERA, C.; ARTACHO, R. GIMENEZ, R. Beneficial effects of green tea- A Review. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 25, n. 2, p. 79-99, 2006.
- CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n. 4, p. 420-428, 2005.
- CAO, F.; GUO, J.; PING Q. The physico chemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetra component complexes. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 31, n. 8, p. 747-56, 2005.
- CHAMPAHNE, C.P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 184-190, 2007.
- CHANCHAL, D.; SWARNLATA, S. Herbal photoprotective formulations and their evaluation. **The Open Natural Products Journal**, v. 2, p. 71-76, 2009.

CHARNVANICH, D.; VARDHANABHUTI, N.; KULVANICH, P. Effect of cholesterol on the properties of spray-dried lysozyme-loaded liposomal powders. **AAPS Pharmaceutical Science Technology**, v. 11, n. 2, p. 832-42, 2010.

CHARNVANICH, D.; VARDHANABHUTI, N.; KULVANICH, P. Effect of cholesterol on the properties of spray-dried lysozyme-loaded liposomal powders. **AAPS Pharmaceutical Science Technology**, vol. 11, n. 2, 2010.

CHEN, Z.Y.; CHAN, P.T.; MA, H.M.; FUNG, K.P.; WANG, J. Antioxidative effect of ethanol tea extracts on oxidation of canola oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, p. 375–380, 1996.

CHENGJIU, H. A., RHODES, D.G. Proniosomes: A novel drug carrier preparation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.185, p. 23-35, 1999.

CHIOU, D.; LANGRISH, T.A.G. Crystallization of amorphous components in spray-dried powders. **Drying Technology**, v. 25, n. 9, p. 1427–1435, 2007.

CHORILLI, M.; RIMÉRIO, T. C.; OLIVEIRA, A. G. Estudo da estabilidade de lipossomas compostos de fosfatidilcolina de soja e fosfatidilcolina de soja hidrogenada adicionados ou não de colesterol por método turbidimétrico. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 31-7, 2007.

CHOUGULE, M.; PADHI, B.; MISRA, A. Nano-liposomal dry powder inhaler of tacrolimus: Preparation, characterization, and pulmonary pharmacokinetics. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n. 4, p. 675–688, 2007.

CORTÉS-ROJAS, D.F. **Extratos secos padronizados de *Bidens pilosa* L.: desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade biológica**. 2011. 165 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

CORTÉS-ROJAS, D.F.; OLIVEIRA, W.P. Physicochemical properties of phytopharmaceutical preparations as affected by drying methods and carriers. **Drying Technology**, v. 30, n. 9, p. 921-934, 2012.

CORTÉS-ROJAS, D.F.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Encapsulation of eugenol rich clove extract in solid lipid carriers. **Journal of Food Engineering**, v. 127, p. 34-42, 2014.

COURRIER, H.M.; BUTZ, N.; ANDAMME, F. Pulmonary drug delivery systems: developments and prospects. **Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 4-5, p. 425-498, 2002.

CRNKOVIC, C.M. **Obtenção de produtos microparticulados a partir de *Camellia sinensis* (chá-verde) pelo processo *spray drying*: influência de adjuvantes tecnológicos e condições de secagem sobre propriedades físico-químicas, atividade antioxidante e estabilidade do produto**. Relatório final de Iniciação Científica CNPq, 2012, 32 p.

CROWE, J.; CROWE, L.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**, v. 223, n. 4637, p. 701-703, 1984.

CROWE, L.M.; CROWE, J.H. **Liposomes, new systems and new trends in their applications**; Puisieux, F.; Couvreur, P.; Delattre, J.; Devissaguet, J. P., eds.; Editions de Santé: France, 1995, cap. 8.

CROWE, L.; CROWE, J. Trehalose and dry dipalmitoylphosphatidylcholine revisited. **BBA – Biomembranes**, v. 946, n. 2, p. 193-201, 1988.

DALLUGE, J.J.; NELSON, B.C. Determination of tea catechins. **Journal of Chromatography Analytical**, v. 881, p. 411-424, 2000.

DUARTE, M.R.; MENARIM, D.O. Morfodiagnose da anatomia foliar e caulinar de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 4, p. 545-551, 2006.

FAISCA, I.M.C. **Obtenção de extractos a partir de Murta (*Myrtus communis* L.)**. Avaliação da sua atividade antioxidante, Lisboa, 1998.

FALLER, A.L.K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 211-218, 2009.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols a review. **Trends in Food Science Technology**, v. 21, p. 510-523, 2010.

FERNANDES, M. R. V. **Obtenção, padronização e avaliação biológica de extratos secos a partir da espécie *Psidium guajava* L. pelo processo *spray drying***. 2013. 237 f. Dissertação (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

FERRARA, L.; MONTESANO, D.; SENATORE, A. The distribution of minerals and flavonoids in the tea plant (*Camellia sinensis*). **IL Farmaco**, v. 56, p. 397-401, 2001.

FERREIRA NETO, C.J.; FIGUEIREDO, R.M.F.; QUEIROZ, A.J.M. Avaliação sensorial e da atividade de água em farinhas de mandioca temperadas. **Ciências agrotecnicas**, Lavras, v. 29, n. 4, p. 795-802, 2005.

FIDORRA, M.; DUELUND, C. L.; A.C. SIMONSEN; BAGATOLLI, L.A. Absence of fluid-ordered/fluid-disordered phase coexistence in ceramide/popc mixtures containing cholesterol. **Biophysical Journal**. v. 90, p. 4437- 4451, 2006.

FLOURY J. Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier. **Journal of Food Engineering**. v. 58, p. 227– 238, 2003.

FRANKEL, E.N. Lipid oxidation. 2 ed. Inglaterra: Bridgewater The Oily Press, 2005.

FU, N.; ZHOU, Z.; JONES, T.B.; TAN, T.T.; WU, W.D.; LIN, S.X.; CHEN, X.D.; CHAN, P.P. Production of monodisperse epigallocatechin gallate (EGCG) microparticles by spray drying for high antioxidant activity retention. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 413, p. 155-166, 2011.

FUKINO, Y.; IKEDA, A.; MARUYAMA, K.; AOKI, N.; OKUBO, T.; ISO, H. Randomized controlled trial for an effect of green tea-extract powder supplementation on glucose abnormalities. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 953-60, 2008.

- GALVAN, D.; ORIVES, J.R.; COPPO, R.L.; RODRIGUES, C.H.F.; SPACINO, K.R.; PINTO, J.P.; BORSATO, D. Estudo da cinética de oxidação de biodiesel B100 obtido de óleo de soja e gordura de porco: determinação da energia de ativação. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 244-248, 2014.
- GARCIA, A.Q.R.; PEREIRA, T.C.B.; DIAS, I.L.T. Study of the flow in the development of acetaminophen powder dispensed into sachet. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 93, n. 4, p.469-475, 2012.
- GEORGE, S.D.; CENKOWSKI, S. Dehydration processes for nutraceuticals and functional foods. In: **Advances in Food Dehydration**. Taylor & Francis Group, p. 285-313, 2009.
- GOLDBACH, P.; BROCHART, H.; STAMM, A. Spray-drying of liposomes for a pulmonary administration. I. Chemical stability of phospholipids. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 19, n. 19, p. 2611-2622, 1993.
- GONÇALVES, H.B.; JORGE, J.A.; OLIVEIRA, W.P.; SOUZA, C.R.F.; GUIMARÃES, L.H.S. Extracellular-fructofuranosidase from *Fusarium graminearum*: stability of the spray-dried enzyme in the presence of different carbohydrates. **Journal of Microencapsulation**, v. 1, p. 1-8, 2013.
- GORDON, M.H. The development of oxidative rancidity in foods. In: OKORNY, J.; YANISHLIEVA-MASLAROVA, N.V.; GORDON, M.H. **Antioxidants in food – practical applications**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001. 380 p.
- GORTZI, O.; LALA, S.; CHINO, I.; TSAKNIS, J. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of *Origanum dictamnus* extracts before and after encapsulation in liposomes. **Molecules**, v. 5, p. 932-945, 2007.
- GORTZI, O.; LALAS, S.; CHINO, I. TSAKNIS, J. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 583–590, 2008.
- GRAHAM, H.N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. **Preventive Medicine**, v. 21, n. 3, p. 334–350, 1992.
- GRIT, M.; CROMMELIN, D. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 64, n. 1-3, p. 3-18, 1993.
- HARA, Y. **Green tea: health benefits and application**. New York: CRC, 2001, 33-37.
- HASHIDA, M.; KAWAKAMI, S.; YAMASHITA F. Lipid carrier systems for targeted drug and gene delivery. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 871-880, 2005.
- HE, Q.; YAO, K.; JIA, D.; FAN, H.; LIAO, X.; SHI, B. Determination of total catechins in tea extracts by HPLC and spectrophotometry. **Natural Product Research**, v. 23, n. 1, p. 93-100, 2009.
- HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. R50-R57, 2010.

IAC – Instituto Agronômico de Campinas. Pesquisa de Cultivares de chás. Disponível em <<http://www.iac.sp.gov.br/>>. Acesso em: 11.10.12.

IDSON, B. Stability testing of emulsions, I. **Drug Cosmetics Industry**, v. 151, n. 1, p. 27-28, 30, 1993.

INGVARSSON, P.T.; SCHMIDT, S.T.; CHRISTENSEN, D.; LARSEN, N.B.; HINRICHS, W.L.; ANDERSEN, P.; RANTANEN, J. NIELSEN, H.M.; YANG, M. FOGED, C. Designing CAF-adjuvanted dry powder vaccines: Spray drying preserves the adjuvant activity of CAF01. **Journal of Controlled Release**, v. 167, p. 256–264, 2013.

INGVARSSON, P.T.; YANG, M.; NIELSEN, H.M.; RANTANEN, J; FOGED, C. Stabilization of liposomes during drying. **Expert Opinion Drug Delivery**. v. 8, n. 3, p. 375-388, 2011.

JAFARI, S.M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, p.816–835, 2008.

JAIN, N.K., ROY, I. Effect of trehalose on protein structure. **Protein Science**. v. 18, n. 1, p. 24–36, 2009.

JANIN, V.; MUSAKHANIAN, J.; MARCHAUD, D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. **Advanced Drug Delivery reviews**, v. 60, p. 734-746, 2008.

JIAN, L.; XIE, L.P.; LEE, A.H.; BINNS, C.W. Protective effect of green tea against prostate cancer: a case-control study in southeast China. **International Journal of Cancer**, v. 5, p. 108-130, 2004.

KEEY, R.B. **Drying of Loose and Particulate Solids Materials**. New York: Hemisphere Publishing Co, 1992.

KIKUCHI, H., YAMAUCID, H., HIROTA, S. A spray-drying method for mass production of liposomes. **Chemical Pharmaceutical**, v. 39, n. 6, p. 1522-1527, 1991.

KOKETSU, M.; SATOH, Y. Antioxidative activity of green tea polyphenols in edible oils. **Journal of Food Lipids**, v. 4, p. 1–9, 1997.

KOLAKOWSKA, A. Lipid Oxidation in Food Systems. In: SIKORSKI, Z.E.; KOLAKOWSKA, A. **Chemical and Functional Properties of Food Lipids**. Boca Raton: CRC PRESS, 2003.

KOURNIATIS, L. R. **Avaliação de nanoemulsões preparadas em homogeneizador de alta pressão**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano – IMA. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

LAVELLI, V.; VANTAGGI, C.; COREY, M.; KERR, W. Formulation of a dry green tea-apple product: study on antioxidant and color stability. **Journal of Food Science**, v. 75, p. C184–C190, 2010.

- LEE, S.C.; LEE, K.E.; KIM, J.J.; LIM, S.H. The effect of cholesterol in the liposome bilayer on the stabilization of incorporated Retinol. **Journal of Liposome Research**. v. 15, p. 157-66, 2005.
- LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000, 356-358.
- LEITE, J.T.C.; MURR, F.E.X.; PARK, K.J. Transições de fases em alimentos: influência no processamento e na armazenagem. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 7, n. 1, p. 83-96, 2005.
- LI, C.L.; DENG, Y.J.; CUI, J.X. Liposome Technology. *In: Preparation of liposomes and oily formulations by freeze-drying of monophasic solutions*. v. 1. 3 ed. p. 35-53. 2006.
- LIMA, E.M. **Estudo da encapsulação do diclofenaco em lipossomas unilamelares e avaliação da toxicidade tissular após administração intramuscular**. 1998. 118 f. Dissertação (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- LIMA, J.D.; MAZZAFERA, P.; MORAES, W.S.; SILVA, R.B. Tea: aspects related to the quality and prospects. **Ciência Rural Santa Maria**, v. 39, n. 4, p. 1270-1278, 2009.
- LO, Y.; TSAI, J.; KUO, J. Liposomes and disaccharides as carriers in spray-dried powder formulations of superoxide dismutase. **Journal of Controlled Release**, v. 94, p. 259– 272, 2004.
- MAESTRI, D.M.; NEPOTE, V.; LAMARQUE, A.L.; ZYGADLO, J.A. Natural products as antioxidants. *In: F. Imperato, Phytochemistry: Advances in research*. Kerala, India: Research Signpost. 2006, p. 105-135.
- MAHMOOD, T.; AKHTAR, N.; KHAN, B.A. The morphology, characteristics, and medicinal properties of *Camellia sinensis* tea. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 4, n. 19, p. 2028-2033, 2010.
- MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 230S-242S, 2005.
- MARTÍNEZ, M.L; PENCI, M.C.; IXTAINA, V.; RIBOTTA, P.D.; MAESTRI, D. Effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of walnut oil under different storage conditions. **Food Science and Technology**, v. 51, p. 44-50, 2013.
- MASSON, D.S.; MORAIS, G.G.; MORAIS, J.M.; ANDRADE, F.F.; SANTOS, O.D.H.; OLIVEIRA, W.P.; ROCHA-FILHO, P.A. Polyhydroxy alcohols an peach oil addition influence on liquid crystal formation and rheological behavior of O/W emulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 4, p. 463-468, 2005.
- MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 401-407, 2006.
- MAZZA, G. *Camellia sinensis*. Disponível em: < <http://www.photomazza.com/?Camellia-sinensis&lang=en> > Acesso em 08 de agosto de 2013.

MCCLEMENTS, D.J.; LI, J. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 159, p. 213–228, 2010.

MELONI, P.L.S. **Desidratação de frutas e hortaliças**. Instituto de Desenvolvimento da Fruticultura e Agroindústria, 2003. Disponível em: <http://www.eteavare.com.br/arquivos/20_1959.pdf> Acesso em: 05 de novembro de 2014.

MENDONÇA, A. C. **Atividade antioxidante de poliaminas e comparação com produtos naturais e sintéticos**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

MITSUMOTO, M.; O'GRADY, M.N.; KERRY, J.P.; BUCKLEY, D.J. Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. **Meat Science**, v. 69, p. 773–779, 2005.

MOHAMMED, A.; BRAMWELL, V.; COOMBES, A.; PERRIE, Y. Lyophilisation and sterilisation of liposomal vaccines to produce stable and sterile products. **Methods**, v. 40, n. 1, p. 30-38, 2006.

MORAES, M.; CARVALHO, J.M.P.; SILVA, C.R.; CHO, S.; SOLA, M. R. , PINHO, S. C. Liposomes encapsulating beta-carotene produced by the proliposomes method: characterisation and shelf life of powders and phospholipid vesicles. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 1, p. 274–282, 2013.

MORAIS, G.G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 158f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

NAWAR, W.W. Lipids. In: O. R. Fennema, **Food chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996, p. 225-319.

NIVEN, R.W. Delivery of biotherapeutics by inhalation aerosol. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 12, p. 151-231, 1995.

O'SULLIVAN, C.M.; LYNCH, A.; LYNCH, P.B.; BUCKLEY, D.J.; KERRY, J.P. Use of antioxidants in chicken nuggets manufactured with and without the use of salt and/or sodium tripolyphosphate: effects on product quality and shelf-life stability. **International Journal of Poultry Science**, v. 3, p. 345–353, 2004.

ÓBON, J.M.; CASTELLAR, M.R.; ALACID, M.; FERNANDES-LÓPES, J.A. Production of a red-puple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by *spray drying* and its application in food model systems. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 471 – 479, 2009.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, W. P.; FREITAS, L. A. P.; FREIRE, J. T. Secagem de produtos farmacêuticos. In: FREIRE, J. T.; SILVEIRA, A. M. **Fenômenos de transporte em sistemas particulados: fundamentos e aplicações**. São Carlos: Suprema, 2009. cap. 10.

- PANDEY, M.; GUPTA, S. Green tea and prostate cancer: from bench to clinic. **Frontiers Bioscience**, v.1, p. 13-25, 2009.
- PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; ROMEROB, A.R.; SAAVEDRA, G.; MURCIA, M.A.; JIMENEZ, A.M.; CODINA, C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. **Life Sciences**, v. 73, 1667–1681, 2003.
- PARKS, E.J.; HELLERSTEIN, M.K. Thematic review series: patient-oriented research. recent advances in liver triacylglycerol and fatty acid metabolism using stable isotope labeling techniques. **Journal of Lipid Research**, v. 47, p. 1651-1660, 2006.
- PECORA, R. **Dynamic Light Scattering** – Applications of Photon Correlation Spectroscopy, chapter 8, Plenum Press: New York, 1985, p. 305.
- PEREIRA, M.O.S. **Estudo Comparativo de Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante de Compostos Bioativos**. Dissertação (Mestrado) Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. 2010.
- PERRIER-CORNET, J.M.; GERVAIS, P. Influence of major parameters in emulsification mechanisms using a high-pressure jet. **Journal of Food Engineering**. v. 53, p. 43–51, 2002.
- PIETTA, P.; MINOGGIO, M.; BRAMATI, L. Plant polyphenols: structure, occurrence and bioactivity. *In: Studies in Natural Products Chemistry*. Atta-ur-Rahman: Elsevier, 2003.
- PIETZYK, B.; HENSCHKE, K. Degradation of phosphatidylcholine in liposomes containing carboplatin in dependence on composition and storage conditions. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 196, n. 2, p. 215-218, 2000.
- PINCHUK, I.; SHOVAL, H.; DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 165, p. 638–647, 2012.
- PORRAS, M.; SOLANS, C.; GONZÁLEZ, C.; MARTÍNEZ, A.; GUINART, A.; GUTIÉRREZ, J.M. Studies of formation of W/O nanoemulsions. **Colloids and Surfaces**, v. 249, p. 115-118, 2004.
- PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2009.
- PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian 1995. v. 2.
- QUN, L.; DI-CAI, L.; JIAN-GUO, J. Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, p.13004-13011, 2011.
- RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E.N.; LAKSHMINARASIAH, U.; GOPAS, J.; NISHIGAK, I. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332–347, 2014.

- RAMADAN, M. F. Antioxidant characteristics of phenolipids (quercetin-enriched-lecithin) in lipid matrices. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 363–369, 2012.
- RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755–760, 2006.
- RAMOS, D.N. **Desenvolvimento de produtos particulados a partir de *Maytenus ilicifolia* por *spray drying*: Influência de adjuvantes tecnológicos e condições de processo nas propriedades físicas, químicas e biológica do produto**. 2011. 44 f. Relatório final de atividades PIBIC CNPq/USP. FCFRP-USP, 2011.
- RASHIDINEJAD, A.; BIRCH, E.J.; SUN-WATERHOUSE, D.; EVERETT, D.W. Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. **Food Chemistry**, v. 156, p. 176–183, 2014.
- RATTES, A.L.R.; OLIVEIRA, W.P. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. **Powder Technology**, v. 171, p. 7–14, 2007.
- REALDON, N.; PERIN, F.; MORPURGO, M.; RAGAZZI, E. Influence of processing conditions in the manufacture of O/W creams: I. Effect on dispersion grade and rheological characteristics. **Il Farmaco**, v. 57, p. 341–347, 2002.
- ROOS, Y.H. Importance of glass transition and water activity to spray drying and stability of dairy powders. **Lait**, v. 82, n. 4, p. 475–484, 2002.
- ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J. TALMON, Y. Factors affecting retention in spray drying microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 5, p. 1288–1294, 1990.
- ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S.C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6 ed. Association Pharmaceutical Press and American Pharmacists: Londres, England, 2006, vol. 1, 374–750.
- SAITO, S.T. **Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante de chá-verde brasileiro (*Camellia sinensis* var. *assamica*) cultivar IAC-259**. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Farmácia. UFRGS, 2007.
- SANTOS, O.D.H.; MIOTTO, J.V.; MORAIS, J.M.; OLIVEIRA, W.P.; ROCHA-FILHO, P.A. Attainment of emulsions with liquid crystal from marigold oil using the required HLB method. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 243–249, 2005.
- SARAF, A.S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, p. 680–689, 2010.
- SCHMIDT, M.; SCHMITZ, H.-J.; BAUMGART, A.; GUEDON, D.; NETSCH, M.I.; KREUTER, M.-H.; SCHMIDLIN, C.B.; SCHRENK, D. Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 307–14, 2005.
- SENANAYAKE, S.P.J.N. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – a review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1529–1541, 2013.

- SENGER, A.E.V.; SCHWANKE, C.H.A.; GOTTLIEB, M.G.V. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. **Scientia Medica**, v. 20, n. 4, p. 292-300, 2010.
- SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Antioxidants: regulatory status. In: *F. Shahidi, Bailey's industrial oil and fat product*. New York: John Wiley & Sons, 2005, p. 491-512.
- SHARMA, V.; GULATI, A.; RAVINDRANATH, S.D.; KUMAR, V.A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC. **Journal of Composition and Analysis**, v. 18, p. 583-94, 2005.
- SILVA, E.C.; SOARES, I.C. Tecnologia de emulsões. **Cosmetics & Toietries**, v. 8, n. 5, p. 37-46, 1996.
- SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1. p. 94 – 103, 1999.
- SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 91-103.
- SIRIPATRAWAN, U.; NOIPHA, S. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 102–108, 2012.
- SKALKO-BASNET, N.; PAVELIC, Z.; BECIREVIC-LACAN, M. Liposomes containing drug and cyclodextrin prepared by the one-step spray-drying method. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 12, p. 1279-1284, 2000.
- SOUZA, C.R.F. **Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos spray-dryer e leito de jorro**. 2003. 179 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas Ribeirão Preto, USP, 2003.
- SOUZA, C.R.F. **Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras: estudo da viabilidade técnica e econômica do processo em leito de jorro**. 2007. 219 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Microencapsulation of ketoprofen in blends of acrylic resins by spray drying. **Drying Technology**, v. 30, n. 3, p. 263–275, 2012.
- TAN, A; RAO, S.; PRESTIDGE, C.A. Transforming lipid-based oral drug delivery systems into solid dosage forms: an overview of solid carriers, physicochemical properties, and biopharmaceutical performance. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 12, p. 2993-3017, 2013.
- TANG, S.; KERRY, J. P.; SHEEHAN, D.; BUCKLEY, D.J. A comparative study of tea catechins and a-tocopherol as antioxidants in cooked beef and chicken meat. **European Food Research and Technology**, v. 213, p. 286–289, 2001.
- TEIXEIRA, C.C.C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos a partir de rizomas de *Curcuma longa* L. e avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral**. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

- TEWA-TAGNEA, P.; BRIANC, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterization. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 30, p. 124–135, 2007.
- TINAHONES, F.J.; RUBIO, M.A.; GARRIDO-SÁNCHEZ, L.; RUIZ, C.; GORDILLO, E.; CABRERIZO, L.; CARDONA, F. Green tea reduces LDL oxidability and improves vascular function. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 27, p. 209-213, 2008.
- TIROSH, O.; KOHEN, R.; KATZHENDLER, J.; ALON, A; BARENHOLZ, Y. Oxidative stress effect on the integrity of lipid bilayers is modulated by cholesterol level of bilayers. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 87, n. 1, p. 17- 22, 1997.
- TONON, R. V. **Secagem por atomização do suco de açaí: influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto**. Tese (doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos Campinas, Universidade Estadual de Campinas, 2009.
- UNNO, T.; TAGO, M.; SUZUKI, Y.; NOZAWA, A.; SAGESAKA, Y.M.; KAKUDA, T.; EGAWA, K.; KONDO, K. Effect of tea catechins on postprandial plasma lipid responses in human subjects. **European Journal of Nutrition**. v. 93, p. 543-307, 2005.
- USPXXX. **American Pharmacopeia – United State Pharmacopeial Convention**. Rockville, USA: 2014.
- VICTORIA, K.; ANANINGSIH, A. S.; WEIBIAO, Z. Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 469-479, 2011.
- WANASUNDARA, U.N.; SHAHIDI, F. Antioxidant and prooxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry**, 63, 335–342, 1998.
- WANG, Q.M.; GONG, Q.Y.; YAN, J.J.; ZHU, J.; TANG, J.J.; WANG, M.W.; YANG, Z.J.; WANG, L.S. Association between green tea intake and coronary artery disease in a Chinese population. **Circulation Journal**, v. 74, p. 294-300, 2010.
- WANG, R.; ZHOU, W. Stability of tea catechins in the bread making process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8224–8229, 2004.
- WEC, V.; CROMMELIN, D.J. Long term stability of freeze-dried, lyoprotected doxorubicin liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 43, n. 3, p. 295 -307, 1997.
- WILLIAMS, M.L.; LANDEL, R.F.; FERRY, J.D. Mechanical properties of substances of high molecular weight. 19. The temperature dependence of relaxation mechanisms in amorphous polymers and other glass forming liquids. **Journal of the American Chemical Society**. v. 77, p. 3701–3707, 1955.
- WISUITIPROT, W.; SOMSIRI, A.; INGGANINAN, K.; WARANUCH, N. In vitro human skin permeation and cutaneous metabolism of catechins from green tea extract and green tea extract-loaded chitosan microparticles. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 6, p. 572–579, 2011.

WU, C.H.; LU, F.H.; CHANG, C.S.; CHANG, T.C.; WANG, R.H.; CHANG, C.J. Relationship among habitual tea consumption, percent body fat, and body fat distribution. **Obesity Research**, v. 11, p. 1088-1095, 2003.

YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.M. Stabilization of edible oils with natural antioxidants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 103, p. 752-767, 2001.

YILMAZ, Y. Novel uses of catechins in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 64-71, 2006.

YOKOTA, D.; MORAES, M.; PINHO, S.P. Characterization of lyophilized liposomes produced with non-purified soy lecithin: a case study of casein hydrolysate microencapsulation. **Brazilian J. Chemical Eng.**, v. 29, n. 02, p. 325-335, 2012.

YOUNGSON, R. **Como Combater os Radicais Livres: O Programa de Saúde dos Antioxidantes**. Rio de Janeiro: Campos, 1995. 168p.

ZAMPIÉR, M. N. **Desenvolvimento, padronização e avaliação biológica de extratos nebulizados de *Dalbergia ecastaphyllum***. 2012. 172 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2012.

ZAVERI, N.T. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. **Life Sciences**, v. 78, p. 2073-2080, 2006.

ZHANG, Y.; YANG, L.; ZU, Y.; CHEN, X.; WU, T.; WANG, F. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. **Food Chemistry**, v. 118, p. 656-662, 2010.

ZHU, Q. Y.; Zhang, A.; Tsang, D.; Huang, Y.; Chen, Z.Y. Stability of green tea catechins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 4624-4628, 1997.

Anexo

Anexo A - Fluxograma das etapas desenvolvidas durante o mestrado.

Figura 29 – Fluxograma das atividades desenvolvidas no projeto.