

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de micropartículas lipídicas sólidas
contendo óleo de café verde por *spray congealing***

Anna Beatriz Frejuello Limoli Nosari

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de micropartículas lipídicas sólidas
contendo óleo de café verde por *spray congealing***

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: Anna Beatriz Frejuello Limoli Nosari

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas

Ribeirão Preto

2012

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.

Nosari, Anna Beatriz Frejuello Limoli
Desenvolvimento de micropartículas lipídicas sólidas contendo óleo de café verde por *spray congealing*.

116 p.; 30cm.

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

Orientador: Freitas, Luis Alexandre Pedro de

1. *Hot melt*. 2. Atividade fotocatalítica 3. Estabilidade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Anna Beatriz Frejuello Limoli Nosari

Desenvolvimento de micropartículas lipídicas sólidas contendo óleo de café verde por *spray congealing*

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. Luis Alexandre Pedro de Freitas

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicat6ria

*Aos meus pais **Taymir** e **Ana Maria** que me propiciaram uma vida digna, acreditando que tudo é possível desde que sejamos honestos e que sonhar e concretizar os sonhos só depende de nossa vontade.*

*Ao meu marido **Samuel** pelo amor, apoio e pelo constante incentivo e compreensão.*

*Aos meus irmãos **Veridiana**, **Christiano** e **Anna Carolina** pelo amor, amizade e incentivo.*

Agradecimientos

À Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir em frente, dando-me coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

Aos meus pais Taymir e Ana Maria pela educação base para minha vida, pelo apoio incondicional e incentivo para a realização dos meus sonhos.

Ao meu orientador Luis Alexandre Pedro de Freitas pela confiança, amizade, paciência e por trazer luz e esclarecimento nas horas de dúvidas e preocupações.

Ao meu marido Samuel por todo amor, compreensão e principalmente por entender e incentivar as minhas escolhas.

À minha família por todo apoio. Mesmo à distância, a presença de vocês foi sempre constante.

Aos amigos do Laboratório de Física Industrial: Simone, Marcela, Luciana, Ana Rita, Rodrigo e Wellington pelos momentos juntos, por todo carinho e amizade.

Às amigas da Faculdade: Silvia, Taísa e Tamara pela ajuda e amizade.

À técnica Rita do Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da UNICAMP pela amizade, paciência e grande colaboração nos estudos cromatográficos.

Aos técnicos Luiz Henrique Cenzi, José Orestes, Henrique e Rodrigo por toda ajuda e paciência.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação Eleni Angeli Passos, Rafael Braga Poggi e Rosana F. L. S. Florêncio pela dedicação e imprescindível assistência.

Ao professor Osvaldo Antônio Serra e à sua aluna de doutorado Juliana Fonseca de Lima pela disponibilidade e grande ajuda nos estudos de atividade fotocatalítica.

Aos professores Jairo Kenupp Bastos, Patrícia Maria B. G. Maia Campos, Renata F. Vianna Lopez, Kamilla Swiech e Pedro Alves da Rocha Filho pelas valiosas sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Aos amigos Felipe e Giseli pela amizade, por se preocuparem comigo e por estarem ao meu lado comemorando as conquistas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que participaram da minha jornada e contribuíram para a concretização deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu tamanho
original”*

Albert Einstein

RESUMO

Nosari, A. B. F. L. **Desenvolvimento de micropartículas contendo óleo de café verde por *spray congealing***. 2012. 116f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Os carreadores micro e nanoparticulados como os lipossomos, nanopartículas poliméricas e micropartículas e nanopartículas lipídicas sólidas são investigadas por suas vantagens em relação às formulações tradicionais, tais como: liberação sustentada dos ativos, minimizar efeitos colaterais, aumentar estabilidade físico-química das moléculas lábeis, diminuir a toxicidade entre outras. As micropartículas lipídicas sólidas produzidas neste trabalho são compostas de cera de abelha e óleo de café verde, este óleo é um produto rico em ácidos graxos, esteróis, di e triterpenos e tocoferóis. Para a produção destas micropartículas foi escolhida a técnica de *spray congealing*, que é considerada rápida e ambientalmente correta, uma vez que não utiliza nenhum tipo de solvente. As misturas fundidas contendo concentrações determinadas de óleo de café verde e cera de abelha foram atomizadas numa câmara de resfriamento onde houve a solidificação e formação das micropartículas. Foi utilizado um planejamento experimental do tipo Box-Behnken, que auxiliou na avaliação dos resultados obtidos, verificando a influência das diversas variáveis do processo. As micropartículas foram caracterizadas por análise térmica, microscopia de varredura eletrônica, tamanho, atividade fotocatalítica, eficiência de encapsulação e estabilidade. A avaliação das micropartículas mostrou que a concentração do óleo de café verde foi a variável que mais influenciou no processo. Em concentrações maiores, este óleo aumenta a viscosidade da mistura fundida atomizada, aumentando o tamanho da partícula formada e provocando maiores imperfeições em sua superfície, o que foi confirmado por um estudo reológico das misturas de cera de abelhas e óleo de café verde. Os tamanhos das micropartículas obtidas em diferentes condições de *spray congealing* variaram de 50 a 140 μm , e estão adequadas para que não ocorra a sua penetração cutânea. O estudo de atividade fotocatalítica demonstrou que o óleo de café verde microencapsulado apresenta propriedades de proteção antioxidante ao óleo de rícino muito maiores do que o óleo puro. A composição do óleo de café verde em relação ao ácido linoléico, palmítico, oléico e esteárico, determinada por cromatografia a gás com espectrometria de massa está de acordo com o encontrado na literatura. As micropartículas formadas a partir de misturas contendo 40% de óleo de café verde apresentaram melhor estabilidade e melhor ação na proteção de outras substâncias contra a oxidação. No teste de estabilidade acelerada, usando o ácido linoléico como marcador químico, as perdas corresponderam a 27, 6 e 3% para as micropartículas encapsuladas com 20, 30 e 40% de óleo de café verde, respectivamente. No mesmo teste, a perda de ácido linoléico foi de 45% para o óleo não encapsulado. Os resultados demonstram que a microencapsulação do óleo de café verde pode ser uma excelente alternativa para a proteção deste contra a oxidação e que o processo de *spray congealing*, bem como a cera de abelhas foram escolhas adequadas para a sua preparação.

Palavras-chaves: óleo de café verde, micropartículas lipídicas sólidas, *spray congealing*.

ABSTRACT

NOSARI, A. B. F. L. **Development of microparticles containing green coffee oil by spray congealing**. 2012. 116f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The micro and nanoparticulate carriers such as liposomes, polymeric nanoparticles and solid lipid nanoparticles and microparticles are investigated for their advantages over traditional formulations such as sustained release of the drugs, minimize side effects, increase physical and chemical stability of labile molecules, decrease toxicity among others. The solid lipid microparticles produced in this work are composed of beeswax and green coffee oil, this oil is a product rich in fatty acids, sterols, tocopherols and di and triterpenes. For the generation of microparticles was chosen spray congealing technique, which is considered fast and environmentally friendly, since it does not use any type of solvent. The molten mixtures containing certain concentrations of green coffee oil and beeswax were atomized in a cooling chamber where there was solidification and formation of microparticles. We used an experimental design like Box-Behnken, who assisted in the evaluation of the results, checking the influence of various process variables. The microparticles were characterized by thermal analysis, scanning electron microscopy, size, photocatalytic activity, encapsulation efficiency and stability. The evaluation of the microparticles showed that the green coffee oil concentration was the variable that most influenced the process. At higher concentrations, this oil increases the viscosity of the molten mixture atomized, increasing the size of the particle formed and causing major imperfections on its surface, which was confirmed by a study of the rheological mixture of beeswax and green coffee oil. The sizes of the microparticles obtained at different spray congealing conditions ranged from 50 to 140 μm , and are not suitable for your skin penetration occurs. The study showed that the photocatalytic activity of green coffee oil microencapsulated has properties antioxidant protection to castor oil much higher than the pure oil. The composition of green coffee oil relative to linoleic, palmitic, oleic and stearic acids, determined by gas chromatography with mass spectrometry is consistent with findings in the literature. The microparticles formed from mixtures containing 40% of green coffee oil showed better stability and better action in protecting other substances from oxidation. In accelerated stability test, using linoleic acid as a chemical marker, the losses amounted to 27, 6 and 3% for the microparticles containing 20, 30 and 40% green coffee oil, respectively. In the same test, the loss of linoleic acid was 45% for the unencapsulated oil. The results show that the microencapsulation of green coffee oil can be an excellent alternative for protection against this oxidation and that the spray congealing process, as well as beeswax were appropriate choices for their preparation.

Keywords: green coffee oil, solid lipid microparticles, spray congealing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral de um triacilglicerídeo.....	26
Figura 2. Tipos de ácidos graxos.....	27
Figura 3. Esquema geral da reação de autooxidação lipídica.....	28
Figura 4. Esquema geral do teste Rancimat.....	30
Figura 5. Fases do desenvolvimento dos grãos de café.....	32
Figura 6. Planta do café.....	33
Figura 7. Principais ácidos graxos presentes no OCV.....	34
Figura 8. Estruturas dos principais diterpenos presentes no óleo de café.....	35
Figura 9. Esquema geral das reações que ocorrem na hidroesterificação.....	38
Figura 10. Estrutura dos diferentes tipos de micropartículas.....	39
Figura 11. Etapas do processo de microencapsulação por coacervação.....	42
Figura 12. Esquema das adaptações feitas no <i>spray dryer</i> para o uso da técnica de <i>spray congealing</i>	43
Figura 13. Alguns tipos de CA comercializados.....	47
Figura 14. Breve esquema da classificação reológica dos fluidos.....	49
Figura 15. Representação esquemática dos pontos de um Planejamento Box-Behnken.....	53
Figura 16. Mini Spray dryer 0.5, Labmaq do Brasil.....	60
Figura 17. Sistema para simular equipamento Rancimat.....	63
Figura 18. Gráfico de superfície de resposta do rendimento em função da vazão do ar de resfriamento (VAR) e vazão de dispersão (VD).....	69
Figura 19. Fotomicrografias das micropartículas contendo apenas CA (A), 20%OCV (B), 30%OCV (C) e 40%OCV (D).....	72
Figura 20. Fotomicrografias das micropartículas contendo 20% OCV (a), 30% OCV (b), 40% OCV (c), apenas CA (d).....	73
Figura 21. Gráfico de superfície de resposta do aumento do tamanho das micropartículas em função da VD e C.....	75
Figura 22. Distribuição do tamanho de partículas, nas diferentes concentrações de OCV.....	76
Figura 23. Perfil calorimétrico das micropartículas contendo apenas CA e daquelas contendo CA mais 20, 30 e 40 % de OCV.....	77
Figura 24. Gráfico de viscosidade x temperatura das misturas fundidas à 80°C.....	79
Figura 25. Reogramas das amostras contendo apenas OCV, apenas CA e das misturas contendo 20, 30 e 40% de OCV, à temperatura de 80°C.....	80

Figura 26. Viscosidades obtidas em máximo cisalhamento.....	81
Figura 27. Gráfico da condutividade em função do tempo das amostras contendo somente CA; somente OCV; e as misturas contendo 20, 30 e 40% de OCV. Controle: óleo de rícino.....	83
Figura 28. Gráfico do índice de atividade fotocatalítica em função do tempo.....	85
Figura 29. Cromatograma do OCV.....	86
Figura 30. Comparação entre os espectros de massa do primeiro pico obtido no OCV com o encontrado na biblioteca.....	87
Figura 31. Comparação entre os espectros de massa do segundo pico obtido no OCV com o encontrado na biblioteca.....	87
Figura 32. Comparação entre os espectros de massa do terceiro pico obtido no OCV com o encontrado na biblioteca.....	88
Figura 33. Comparação entre os espectros de massa do quarto pico obtido no OCV com o encontrado na biblioteca.....	88
Figura 34. Curva analítica preparada a partir de amostras contendo concentrações conhecidas de CA e OCV.....	89
Figura 35. Gráfico boxplot para concentração de OCV em cada lote de micropartículas.....	91
Figura 36. Gráfico boxplot para eficiência de encapsulação nas concentrações de OCV estudadas.....	92
Figura 37. Gráfico de superfície para a eficiência de encapsulação das micropartículas.....	94
Figura 38. Gráfico da porcentagem de ácido linoleico perdida após teste de estabilidade preliminar.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferenças na composição química do café arábica e robusta...	33
Tabela 2. Lista de alguns produtos contendo café verde.....	36
Tabela 3. Alguns estudos utilizando <i>spray congealing</i>	45
Tabela 4. Terminologias e conceitos básicos em reologia.....	48
Tabela 5. Breve descrição da classificação do comportamento de escoamento dos fluidos.....	50
Tabela 6. Planejamento experimental do tipo Box-Behnken, com as variáveis não codificadas (numéricas) e codificadas.....	59
Tabela 7. Rendimento do processo.....	68
Tabela 8. Nível de significância dos rendimentos obtidos.....	69
Tabela 9. Tratamento estatístico para o teor de umidade.....	71
Tabela 10. Valores obtidos para d50 e suas respectivas variáveis feitas no planejamento.....	74
Tabela 11. Análise de variância do tamanho médio das micropartículas contendo OCV.....	75
Tabela 12. Variações de entalpia a fusão das micropartículas contendo 20, 30 e 40% de OCV e naquelas contendo apenas CA.....	78
Tabela 13. Viscosidade das amostras no ponto máximo de cisalhamento.	81
Tabela 14. Diferenças significativas entre os valores de viscosidade obtidos em cisalhamento máximo.....	82
Tabela 15. Índice de atividade fotocatalítica em função do tempo e a média do índice para cada amostra.....	85
Tabela 16. Porcentagem dos principais ácidos graxos presentes no OCV.	89
Tabela 17. Porcentagem de ácido linoleico presente nas micropartículas..	90
Tabela 18. Eficiência de encapsulação das micropartículas produzidas....	93
Tabela 19. Análise de variância da eficiência de encapsulação das micropartículas contendo OCV.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIHPEC	Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
AG	Ácidos Graxos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOM	Método do Oxigênio Ativo
C	Concentração
CA	Cera de Abelha
CG	Cromatografia Gasosa
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EE	Eficiência de Encapsulação
EXP	Experimento
I_{afc}	Índice da Atividade Fotocatalítica
ICO	Organização Internacional do Café
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MLS	Micropartículas Lipídicas Sólidas
MP	Micropartículas
OCV	Óleo de Café Verde
PF	Ponto de Fusão
R•	Radicais Livres
REND	Rendimento
ROO•	Radical Peróxido
ROOH	Hidroperóxidos
TG	Triglicerídeos
T°	Temperatura
VAR	Vazão do ar de resfriamento
VD	Vazão de dispersão
ΔH	Variação de entalpia

Sumário

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Cosméticos e Inovação Tecnológica	20
1.2. O Óleo de Café Verde	21
1.3. Micropartículas e os Cosméticos.....	22
1.4. Métodos de Produção de Microestruturas Contendo Lipídios	23
2. REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1. Os óleos vegetais e a oxidação lipídica.....	26
2.1.1. Avaliação da estabilidade oxidativa em óleos e gorduras	29
2.2. O café e o óleo de café verde	31
2.3. Quantificação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa	37
2.4. Sistemas microparticulados.....	39
2.4.1. Técnicas utilizadas para a produção das micropartículas	41
2.5. Spray congealing.....	43
2.5.1. Matérias primas utilizados em <i>spray congealing</i>	45
2.5.2. Estudos reológicos e suas influências.....	47
2.6. Planejamento Experimental.....	51
3. OBJETIVO	56
3.1. Objetivo Geral	56
3.2. Objetivos Específicos	56
4. MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1. Matérias-primas.....	58
4.2. Reagentes e solventes	58
4.3. Equipamentos e acessórios	58
4.4. Métodos.....	59
4.4.1. Preparo das micropartículas contendo OCV verde por spray congealing	59
4.4.2. Determinação do teor de umidade	61
4.4.3. Morfologia das MLSS.....	61

4.4.4. Determinação do tamanho e distribuição das micropartículas	61
4.4.5. Estudo do comportamento térmico.....	61
4.4.6. Estudos Reológicos.....	62
4.4.7. Estudo da atividade fotocatalítica	62
4.4.8. Caracterização cromatográfica do OCV	64
4.4.9. Quantificação de OCV nas micropartículas.....	65
4.4.10. Estabilidade Preliminar.....	65
4.4.11. Forma de análise dos resultados.....	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
5.1. Preparo das micropartículas do óleo de café verde por spray congealing	68
5.2. Determinação do teor de umidade	70
5.3. Morfologia das MLSs.....	71
5.4. Determinação do tamanho e da distribuição das micropartículas	74
5.5. Estudo do comportamento térmico.....	77
5.6. Estudos Reológicos.....	78
5.7. Atividade fotocatalítica.....	83
5.8. Caracterização cromatográfica do OCV	86
5.9. Quantificação de OCV nas micropartículas.....	89
5.10. Estabilidade Preliminar.....	95
6. CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS.....	102
APÊNDICE 1 - Depósito de pedido de patente no INPI sobre micropartículas e nanopartículas lipídicas.....	113

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cosméticos e Inovação Tecnológica

Dentre as variáveis relacionadas ao desenvolvimento, pode-se dizer que a tecnologia exerce um dos papéis mais importantes na competitividade de um determinado setor. Atualmente as empresas estão se nivelando quanto aos aspectos de qualidade e produtividade, sendo assim, a gestão da tecnologia passou a ser um importante diferencial para esta competitividade (AVELAR; SOUZA, 2006). A inovação tecnológica permite um aumento da eficiência de um processo produtivo ou o desenvolvimento de um produto novo ou aprimorado.

A indústria de cosméticos é um dos inúmeros setores que veem adotando estratégias tecnológicas para o desenvolvimento de novos produtos ou processos. Desde tempos imemoriáveis os seres humanos fazem uso de produtos cosméticos, seja para perfumar, embelezar ou cuidar da pele. Nos últimos anos houve um aumento da preocupação de mulheres e homens com a aparência o que levou a um maior cuidado com a pele, no intuito de corrigir imperfeições ou tentar prevenir ou retardar o aparecimento de sinais de envelhecimento, tornando os cosméticos um investimento em qualidade de vida e bem estar, melhorando a autoestima. Com essa nova postura, o mercado de produtos cosméticos vem aumentando, estimando-se um crescimento de 7,4% no setor em 2012 (KUMAR, 2005; SCHMALTZ; SANTOS; GUTERRES, 2005; BRANDT; CAZZANIGA; HANN, 2011).

O crescimento da indústria de cosméticos é marcante também no Brasil, que segundo uma pesquisa feita em 2011 pela Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), ocupa o primeiro lugar na América Latina no mercado consumidor de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos e o terceiro lugar no mercado mundial, perdendo apenas para Estados Unidos e Japão, sendo estimado um faturamento anual maior que R\$ 27 bilhões.

O crescimento deste setor e o aumento da competitividade exigem das empresas a busca constante por produtos inovadores ou a reformulações de embalagens e processos. Esse fato leva as indústrias de ponta do setor a investirem em pesquisas o que traz inúmeros avanços na área cosmetológica permitindo a formulação de produtos mais eficazes e estáveis e também torna possível a produção de novos sistemas de liberação. Dessa forma considera-se que o marco fundamental para este setor está centralizado em pesquisas feitas para o

desenvolvimento de novos sistemas para a incorporação de ativos cosméticos (SCHMALTZ; SANTOS; GUTERRES, 2005).

Dentre os avanços tecnológicos existentes na área de cosméticos destaca-se a produção de sistemas micro e nanoparticulados. Segundo Marcato (2009) estes sistemas são investigados por apresentarem diversas vantagens com relação às formulações tradicionais, dentre elas: obter uma liberação controlada de ativos, minimizar efeitos colaterais, solubilizar ativos lipofílicos, aumentar estabilidade físico-química de moléculas lábeis, diminuir a toxicidade entre outras.

1.2. O Óleo de Café Verde

Como exemplo de uso dos óleos vegetais em produtos cosméticos, temos o óleo de café verde (OCV), o qual é extraído das sementes do café (*Coffea arábica* L.) não amadurecido, ou verde. Esta planta arbórea da família Rubiaceae é mundialmente conhecida por seus frutos elipsóides ou oblongos que fornecem uma das bebidas mais consumidas do mundo. A planta do café é um arbusto pequeno que atinge de 3 a 4 metros de altura, encontrada nas regiões tropicais da América do Sul, Ásia e África. Pertence ao gênero *Coffea* e à família das Rubiáceas. Essa família abriga mais de 10 mil espécies, dentre elas, as duas com maior importância comercial são *Coffea arábica* Linn. e *Coffea canephora* Pierre, conhecidas respectivamente como arábica e robusta (LAGO, 2001).

Recentemente o óleo extraído das sementes de grãos verdes de café vem sendo bastante estudado por suas propriedades sobre a pele (PEREDA *et al.*, 2009; SAVIAN *et al.*, 2011). Outra vantagem para o uso deste óleo é o fato de poder ser extraído por processos mecânicos não utilizando nenhum tipo de solvente orgânico, sendo portanto uma técnica ambientalmente amigável.

Cremes e óleos de café verde são utilizados há muito tempo no Canadá e Estados Unidos, porém no Brasil, apesar de ser um grande produtor de café, produtos com este óleo chegaram ao mercado há pouco tempo e ainda existe uma escassez de dados publicados sobre este assunto em nosso país. Este óleo é rico em fitosteróis que promovem excelente hidratação, rápida penetração e boa aderência, além de ser rico em ácidos graxos essenciais (PEREDA *et al.*, 2009; SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006).

Estudos recentes mostraram que esse óleo tem efeito regenerativo e hidratante da pele e por ter efeito estimulante pode ser usado também em

formulações para redução de celulite, além de proteger a pele contra os danos causados pelas radiações solares, através da sua ação antioxidante, podendo aumentar o fator de proteção dos filtros solares (PEREDA *et al.*, 2009).

A propriedade de proteção da pele contra as radiações solares e ressecamento provavelmente se deve ao fato do óleo de café verde (OCV) ser rico em ácidos graxos insaturados com propriedades hidratantes. O OCV é extraído do grão que por sua vez é constituído de proteínas, açúcares e uma fração lipídica. Segundo Poisson (1979), esta fração lipídica pode ser dividida em três categorias: ácidos graxos derivados de glicerídeos e fosfolipídios; constituintes da matéria insaponificável, esteróis, di e triterpenos e tocoferóis e constituintes da cera que recobre o grão.

De acordo com Maier, Mätzel (1982) e Folstar (1985), a fração lipídica do café tem como principais componentes os triglicerídeos (75,2%), ésteres de álcoois diterpênicos e ácidos graxos (18,5%), álcoois diterpênicos (0,4%), ésteres de esteróis (3,2%), esteróis (2,2%), tocoferóis (0,04 a 0,06%), fosfatídeos (0,1 a 0,5%) e derivados de triptamina (0,6 a 1,0%). Segundo Pereda, *et al* (2009) no óleo de café verde são encontrados os seguintes ácidos graxos: ácido palmítico (33%), ácido esteárico (9,1%), ácido oleico (9,0%), ácido linoleico (42,9%), ácido linolênico (1,27%) e ácido araquídico (3,9%).

Muitos destes compostos apresentam efeito protetor contra danos causados à pele, tais como queimaduras solares e fotoenvelhecimento, por isso têm sido sérios candidatos a ativos em composições dermocosméticas (NAKAYAMA *et al*, 2003; BOELSMA; HENDRIKS; ROZA, 2001).

1.3. Micropartículas e os Cosméticos

O uso das micropartículas (MP) para o preparo de formulações cosméticas não se restringe apenas ao desenvolvimento de novos sistemas de liberação, podendo ser utilizadas também para minimizar efeitos colaterais, solubilizar ativos lipofílicos, aumentar estabilidade, diminuir a toxicidade ou proteger ativos contra a oxidação (MARCATO, 2009; CAO-HOANG; FOUGÈRE; WACHÉ, 2011). Substâncias oleosas líquidas também são microencapsuladas por matrizes que podem protegê-las contra a peroxidação lipídica que é a principal causa de deterioração dos materiais graxos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). As micropartículas lipídicas sólidas (MLSs) são um sistema de transporte de fármacos

muito promissor devido à utilização de lipídios como carreadores, estes possuem biocompatibilidade favorável e menor toxicidade em comparação com muitos polímeros (PASSERINI *et al.*, 2010).

Para a obtenção de sistemas microparticulados podem ser utilizadas matrizes de origem natural, como por exemplo as ceras naturais com diferentes graus de purificação ou ultra refinação como a cera de abelha, cera de carnaúba, cera de cupuaçu, entre outras, ou podem ser sintéticas tais como polietilenoglicol, parafina, vaselina, Gelucires[®], monoestearato de glicerila, polivinilpirrolidona, ácido esteárico, entre outras. Dentre estas destaca-se a cera de abelha purificada, um produto de origem natural que apresenta características físico-químicas apropriadas para a produção das micropartículas contendo óleo de café verde.

1.4. Métodos de Produção de Microestruturas Contendo Lipídios

Existem diversos métodos para produção de micropartículas tais como o leito fluidizado, a coacervação, o *spray drying*, o *spray congealing*, entre outras. Dentre estes métodos destaca-se o *spray congealing*, pois trata-se de uma técnica que garante inúmeras vantagens quando comparada às tradicionais, uma vez que é segura, rápida, econômica e ecologicamente correta pois dispensa o uso de qualquer tipo de solvente, sejam eles aquosos ou orgânicos.

O *spray congealing* é definido como um processo pelo qual há formação de micropartículas a partir da pulverização do ativo dissolvido ou disperso num carreador fundido (geralmente 10°C acima do ponto de fusão do carreador) em uma câmara de resfriamento onde as gotículas pulverizadas entram em contato com o ar frio, causando a solidificação do material e a formação das micropartículas (MCCARRON; DONNELLY; AL-KASSAS, 2008). É um método conveniente para transformar matérias-primas fundidas em fluxo livre de partículas de tamanho controlado, sendo uma técnica rápida que produz micropartículas em uma única etapa (PASSERINI *et al.*, 2006). Apesar de suas inúmeras vantagens o *spray congealing* ainda é muito pouco estudado no Brasil o que torna importante o estudo desta técnica no país, uma vez que encontra aplicação na indústria química, alimentícia, farmacêutica e de cosméticos.

Espera-se que as micropartículas contendo OCV aliem as valiosas propriedades cosméticas dos constituintes da fração lipídica deste óleo com as vantagens dos sistemas microparticulados. Os lipídios fazem parte da composição

da membrana extracelular do extrato córneo e podem ser carreadores apropriados para ativos dermocosméticos.

Sendo os sistemas microestruturados alternativas para a proteção de ativos oleosos e uma possibilidade para o desenvolvimento de um novo sistema de liberação se faz necessário estudos nesta área uma vez que o uso de óleos naturais é muito comum na indústria cosmética (KAUR; SARAF, 2010; SAVIAN, *et al.*, 2011; PARDAUIL *et al.*, 2011). Porém estudos utilizando sistemas microparticulados contendo esses óleos naturais ainda são muito pouco encontrados na literatura científica. Sendo assim pesquisas como esta podem trazer inúmeros benefícios, incluindo o desenvolvimento de novos produtos e/ou novos processos e avanços tecnológicos permitindo o crescimento e a competitividade deste setor tão importante para a economia deste país.

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Os óleos vegetais e a oxidação lipídica

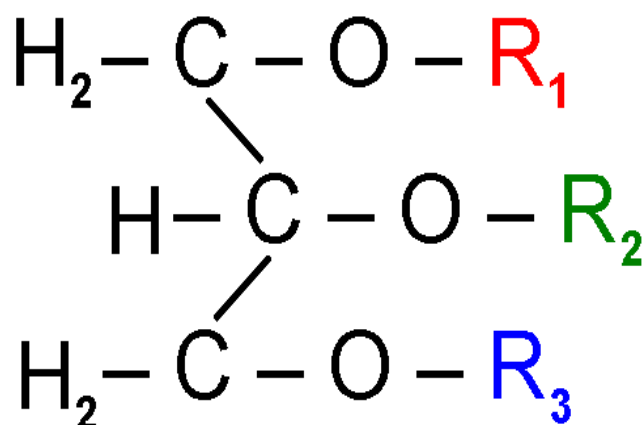
Devido a um importante papel na formulação de produtos, os óleos vegetais são amplamente utilizados principalmente na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia. Estes lipídios podem agir como emulsionantes, emolientes lubrificantes ou modificadores de viscosidade em produtos cosméticos (GASSENMEIER *et al.*, 1998).

Muitos ácidos graxos (AG) estão presentes nos óleos vegetais como os ácidos linoleico e linolênico que, segundo Beveridge *et al.* (1999), apresentam propriedades terapêuticas para o alívio do eczema crônico e da dermatite.

Os óleos vegetais representam alguns dos principais produtos extraídos de plantas da atualidade, são constituídos principalmente por triacilgliceróis (> 95 %) e mono e diacilgliceróis em menores quantidades. A obtenção pode ser feita por métodos físicos como prensagem a frio das sementes ou químicos usando um solvente extrator (REDA; CARNEIRO, 2007).

São insolúveis em água (hidrofóbicas) e formados principalmente por ésteres de triacilgliceróis (TG), produto resultante da esterificação entre o glicerol e três ácidos graxos (MORETTO; FETT, 1998).

Os triacilgliceróis (Figura 1) são compostos insolúveis em água e em temperatura ambiente possuem uma consistência de líquido para sólido. Quando são sólidos à temperatura ambiente são chamados de gorduras e quando estão sob forma líquida são chamados de óleos (GIESE, 1996).

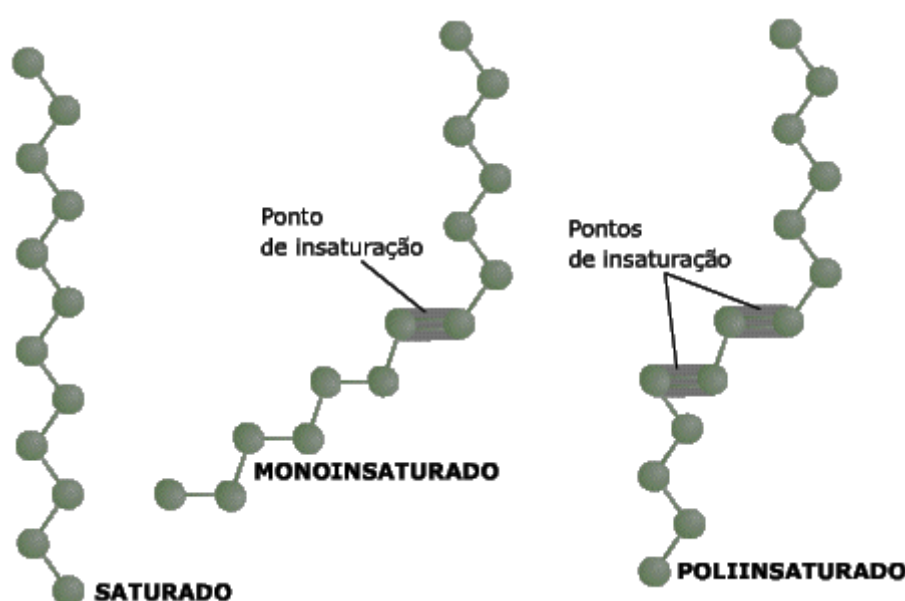


Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Triacilglicerol>

Figura 1. Estrutura geral de um triacilglicerídeo (tri-éster oriundo da combinação entre glicerol e ácidos graxos).

Os óleos vegetais apresentam constituintes lipídicos não saponificáveis, tais como hidrocarbonetos, tocoferóis, esteróis, álcoois terpenos, além de compostos fenólicos que podem atuar como agentes antioxidantes (BOSKU; MORTON, 1976).

Estes óleos podem ser classificados de acordo com a quantidade de insaturações (duplas ligações) presentes na cadeia carbônica: saturados, não possuem dupla ligação; mono-insaturados, uma dupla ligação e poli-insaturados, duas ou mais ligações duplas (ASADAUSKAS; PEREZ; DUDA, 1996). A Figura 2 mostra a estrutura dos tipos de ácidos graxos.



Fonte: http://www.azeite.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1414:acidos-graxos-definicao-e-classificacao&catid=71:referencias-cientificas&Itemid=115

Figura 2. Tipos de ácidos graxos

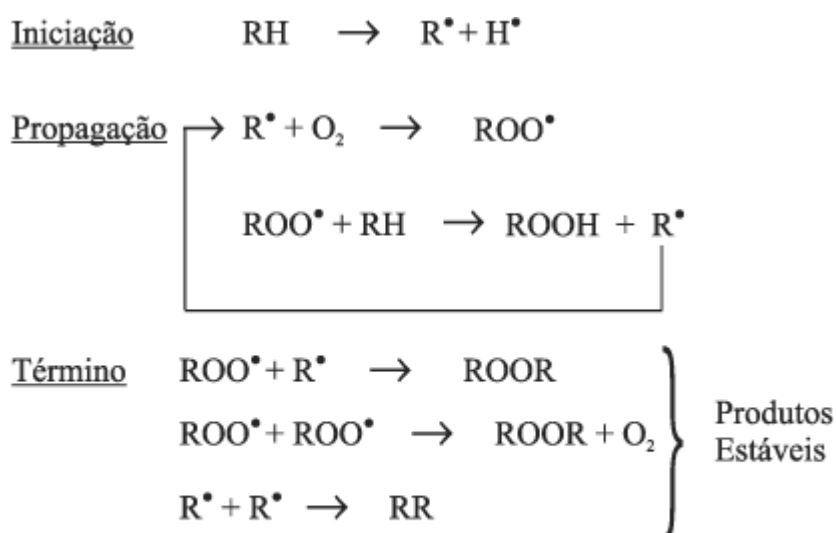
Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeia longa, que podem aparecer livres ou esterificados em uma molécula de glicerol. Os ácidos graxos saturados apresentam apenas ligações simples entre os carbonos e possuem pouca reatividade química. Por outro lado, os ácidos graxos insaturados apresentam uma ou mais ligações duplas em sua cadeia carbônica, sendo mais reativos e mais suscetíveis à oxidação (GIESE, 1996).

Quando expostos a altas temperaturas ou armazenados em atmosfera de oxigênio, os óleos e gorduras se deterioram, promovendo alterações como: autooxidação, oxidação térmica, além de modificações físicas, químicas e nutricionais (HELLIN; CLAUSELL, 1984). Sendo assim a oxidação dos ácidos graxos ocorre por diferentes vias, dependendo do meio e dos catalisadores, por meio de mecanismos

químicos, como a fotoxidação e a autoxidação, ou por mecanismos enzimáticos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

A presença de triglicerídeos com insaturações aumenta a velocidade de oxidação nos óleos vegetais. Esta oxidação pode ocorrer pelo mecanismo do radical livre, devido à decomposição de peróxidos e hidroperóxidos nos ácidos e aldeídos, sendo esse processo acelerado quando exposto a altas temperaturas. A rancidez oxidativa é um dos principais tipos de oxidação estudados em óleos (Souza *et al*, 2004).

A rancidez oxidativa é o resultado de complexos processos na oxidação de um lipídio. A Figura 3 ilustra a autoxidação lipídica, que ocorre em cadeia e está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados, ocorrendo em três etapas:



onde: RH - Ácido graxo insaturado; R[•] - Radical livre;
ROO[•] - Radical peróxido e ROOH - Hidroperóxido

Fonte: Ramalho; Jorge, 2006

Figura 3. Esquema geral da reação de autoxidação lipídica.

- Iniciação: esta fase ocorre quando um átomo de hidrogênio é retirado de uma molécula de ácido graxo, formando radicais livres (R[•]), em condições favorecidas por luz e calor.
- Propagação: envolve a reação dos radicais livres (R[•]), estes são muito susceptíveis ao ataque do oxigênio molecular e atmosférico formando outros radicais e, conseqüentemente, o aparecimento dos produtos primários de oxidação (peróxidos

e hidroperóxidos). O radical peróxido ($\text{ROO}\cdot$) pode capturar um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo insaturado e propagar uma reação em cadeia. Os hidroperóxidos (ROOH) produzidos podem formar outros radicais como a hidroxila ($\text{HO}\cdot$) e alcóxil ($\text{RO}\cdot$), capazes de propagar ainda mais a oxidação. Esses fatores resultam em um processo autocatalítico.

• **Término:** ocorre com a reação entre dois radicais, com a formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) (RAMALHO; JORGE, 2006).

Existem vários fatores que influenciam a taxa de oxidação de um lipídio, entre eles: qualidade do óleo ou gordura, condições de armazenamento (luz, calor), área superficial exposta ao oxigênio atmosférico, entre outros.

Segundo Jorge, Gonçalves (1998) a autooxidação de óleos e gorduras pode ser evitada pela diminuição da incidência dos fatores que a favorecem, como por exemplo:

- Manterem mínimos os níveis de energia (temperatura e luz) responsáveis pelo desencadeamento do processo de formação de radicais livres;
- Evitar a presença de traços de metais no óleo;
- Evitar o contato com oxigênio;
- Bloquear a formação de radicais livres por meio de antioxidantes.

Os óleos vegetais contêm diferentes variedades de antioxidantes e estabilizantes naturais como tocoferóis e esteróis que apresentam um papel importante na inibição da degradação lipídica. Alguns óleos vegetais apresentam melhores ações contra a degradação do que outros, devido a uma composição especial de ácidos graxos, antioxidantes e estabilizantes (BELINATO, 2010).

2.1.1. Avaliação da estabilidade oxidativa em óleos e gorduras

A luz e o oxigênio são alguns dos fatores que induzem as reações de oxidação levando a uma modificação nas propriedades físicas e químicas de substâncias, entre elas os óleos e as gorduras. Os lipídeos contêm vários ácidos graxos que diferem não apenas por suas propriedades químicas e físicas, como também na susceptibilidade à oxidação. Esta oxidação pode ser influenciada também pela energia térmica, presença de ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, metais de transição, peróxidos, pigmentos e antioxidantes (CHOE; MIN, 2006).

Dessa forma, o desenvolvimento de compostos indesejáveis provenientes da

oxidação lipídica é um problema a ser resolvido, com a finalidade de prolongar a vida útil de óleos e gorduras (GORDON, 2001).

Testes feitos para avaliar a estabilidade oxidativa e a atividade antioxidante de óleos e gorduras são ferramentas indispensáveis para o estudo e solução dos problemas relacionados à oxidação lipídica.

Para avaliar a oxidação e, conseqüentemente, os antioxidantes presentes em óleos e gorduras, podem ser utilizados testes acelerados de estabilidade oxidativa. Dentre estes testes destaca-se o Rancimat, que possui ampla aceitação devido à facilidade de uso, baixo custo, reprodutibilidade, além de operar sem a utilização de reagentes químicos, sendo considerado um importante método para a determinação da oxidação térmica em lipídios (JAIN, SHARMA, 2010; MENDONÇA, 2009).

O Rancimat foi desenvolvido com base no método do oxigênio ativo (AOM). Neste método a oxidação é induzida por meio de uma corrente de ar e pelo aquecimento da amostra, ilustrado na Figura 4.

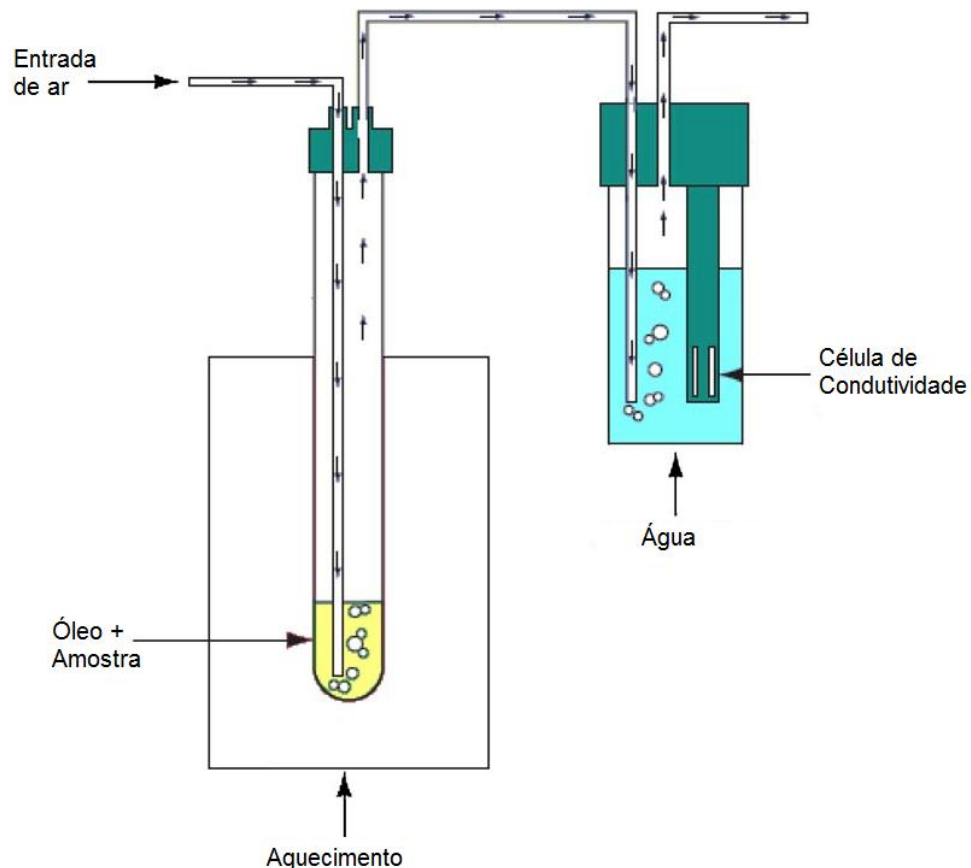


Figura 4. Esquema geral do teste Rancimat (adaptado de Jain, Sharma, 2010)

Durante o processo de oxidação, são liberadas substâncias voláteis que são expelidas para um frasco contendo água destilada e um eletrodo, para medir sua condutividade, que aumenta de acordo com a quantidade de substâncias voláteis adicionadas.

De acordo com Silva e colaboradores (1999), a avaliação do teor de ácidos voláteis é feita usualmente por condutometria. Esta análise é feita através do registo das variações da condutividade da água destilada, na qual se faz a coleta dos compostos voláteis produzidos. Normalmente estes compostos são formados após iniciação forçada da oxidação, em temperaturas entre 110 à 130°C e com corrente de ar ou de oxigênio.

Este equipamento é comumente utilizado para o estudo da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras, sendo considerado o principal teste feito nas indústrias de cosméticos e alimentos (PARDAUIL *et al.*, 2011). O Rancimat também é muito utilizado para avaliar a estabilidade oxidativa em biodiesel, assim como descrito por Focke *et al.* (2011).

Uma adaptação deste aparelho foi utilizada com sucesso por Peverari (2007) e Lima *et al.* (2009), onde nanopartículas compostas de cério foram produzidas e avaliadas quanto à sua atividade fotoprotetora. Nestes trabalhos o comportamento das nanopartículas foi avaliado na presença de um óleo vegetal, calor, agitação e exposição à luz, onde a oxidação e/ou degradação do óleo em questão foi acompanhada pela variação da condutividade da água, assim como feito nos testes Rancimat.

Segundo Esquivel, Ribeiro e Bernardo-Gil (2009), encontrar novas formas de controle da degradação dos lipídios em alimentos e em sistemas biológicos é um dos grandes desafios nas indústrias de alimentos e cosméticos. Os antioxidantes, presentes nos óleos vegetais ou adicionados à ele, podem retardar o processo de oxidação, aumentando a vida útil destes produtos. Dessa forma o Rancimat é um teste importante para a avaliação da estabilidade destes óleos em altas temperaturas (até 220° C).

2.2. O café e o óleo de café verde

No século VI pastores da Abissínia (Etiópia) descobriram os grãos de café, nome proveniente da província de Keffa. Os efeitos reparadores do café foram conhecidos e difundidos pelo mundo Islâmico no século XIII, mas foi apenas

duzentos anos mais tarde que o café começou a ser comercializado na Europa, onde a bebida passou a fazer parte da vida e costumes dos ocidentais (YANAGIMOTO *et al.*, 2004).

Hoje o café é uma cultura agrícola de grande importância econômica, sendo um dos produtos básicos mais negociados nos mercados internacionais. De acordo com uma estimativa feita pela Organização Internacional do Café (ICO), as exportações mundiais deste produto somaram cerca de 7,11 milhões de sacas de 60kg em outubro de 2011, destas a produção de café no Brasil contribuiu com 3,1 milhões de sacas.

A Figura 5 ilustra as principais fases do desenvolvimento dos grãos de café, desde os grãos ainda verdes até a fase em que se encontram totalmente maduros.



Fonte: <http://coffeetraveler.net/selecionar-e-o-segredo>

Figura 5. Fases do desenvolvimento dos grãos de café.

A planta do café (Figura 6) é um arbusto pequeno que chega a 3 ou 4 metros de altura e é nativa das regiões tropicais da América do Sul, Ásia e África. Pertence ao gênero *Coffea* da família *Rubiaceae*. Este gênero é composto por cinco grupos distintos, porém apenas o grupo *Eucoffea* contém espécies que apresentam grande importância comercial para o cultivo. Estas são *Coffea arabica* Linn (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (café robusta) (PEREDA, *et al.*, 2009; YANAGIMOTO *et al.*, 2004; LAGO, 2001).



Fonte: <http://www.rondonia.ro.gov.br/noticias.asp?id=7546&tipo=Mais%20Noticias>

Figura 6. Planta do café.

Segundo Lago, Freitas (2006) os lipídios presentes no café são obtidos industrialmente por processo de prensagem dos grãos, porém existem outras técnicas de extração como extração supercrítica e extração com etanol comercial.

Os grãos de café arábica diferem em cor e tamanho, quando comparados a espécie robusta, sendo o primeiro mais valioso por oferecer um maior teor de lipídios, conforme observado na Tabela 1 (LAGO, 2001; CLIFFORD, 1985).

Tabela 1. Diferenças na composição química do café arábica e robusta.

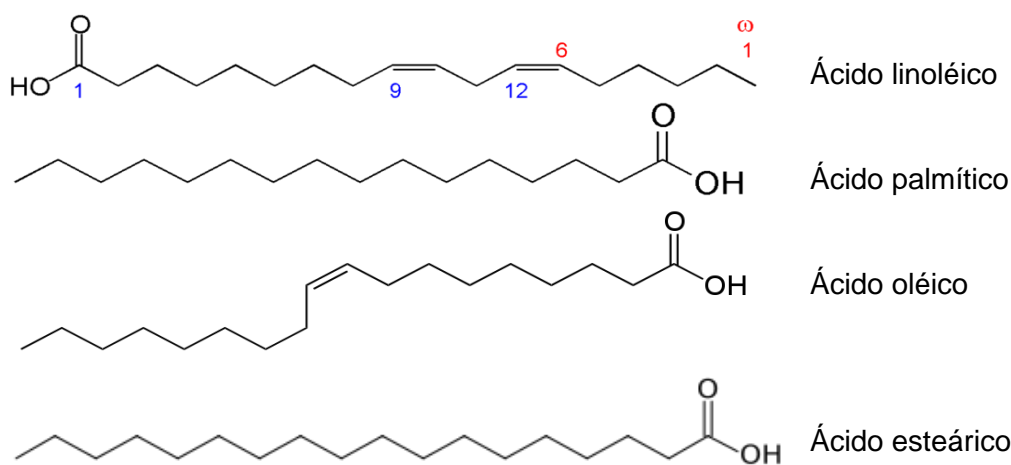
Composto	<i>C. arábica</i>	<i>C. robusta</i>
Cafeína	0,8-1,4%	1,7-4,0%
Carboidratos	50-55%	37-47%
Trigonelina	1-1,2%	0,6-0,7%
Lipídeos	12-18%	9-13%
Ácidos clorogênicos	5-8%	7-10%
Proteínas	11-13%	11-13%
Minerais	3,0-4,2%	4,0-4,5%

Fonte: (LAGO, 2001)

A maioria dos lipídios do café está presente na forma líquida no endosperma do grão. Segundo Folstar (1985) apenas 0,2-0,3% dos lipídios cobre o grão como

um filme fino, que são conhecidos como cera do café.

Os principais componentes dos lipídios do café são os triacilgliceróis (75%), ésteres diterpênicos (até 18%), ésteres de esteróis (1,4-3,4%), esteróis livres (1,5%), diterpenos livres (0,1-1,2%), fosfatídios (vestígios), cafeína (0,3%), tocoferóis (0,3-0,7%). Dentre os ácidos graxos presentes os principais são: linoléico (43,1%), palmítico (31,1%), oléico (9,6%) e esteárico (9,6%). As estruturas destes ácidos graxos principais estão representadas na Figura 7 (FOLSTAR, 1985; KÖLLING-SPEER; STROHSCHNEIDER; SPEER, 1999).



Fonte: <http://www.google.com.br/imghp?hl=pt-BR&ie=UTF-8&tab=wi>

Figura 7. Principais ácidos graxos presentes no OCV, sendo dois ácidos graxos insaturados (linoléico e oléico) e dois ácidos graxos saturados (palmítico e esteárico).

O óleo de café se destaca pelo alto teor de matéria insaponificável que é de 9 a 14,4%, enquanto que os óleos vegetais apresentam em média valores abaixo de 1% (FOLSTAR, 1985).

Segundo Lago (2001) os principais constituintes da porção insaponificável são dois álcoois diterpênicos, o cafestol e o caveol, constituintes lipídicos típicos que não foram encontrados em nenhum outro alimento, suas estruturas estão representadas na Figura 8.

Estes diterpenos podem ocorrer na forma livre ou como monoésteres de ácidos graxos, sendo esterificado principalmente com os ácidos palmítico e linoléico (FOLSTAR, 1985; LAGO, 2001). Segundo Lago (2001) o teor de diterpenos em café verde arábica é de 1,3% e no robusta é 0,2%.

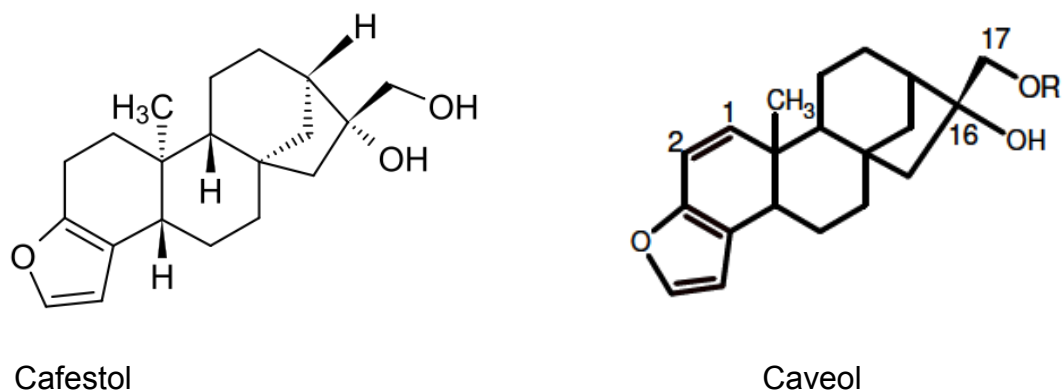


Figura preparada com pesquisa usando a ferramenta: <http://www.google.com.br>

Figura 8. Estruturas dos principais diterpenos presentes no óleo de café (LAGO, 2001).

Os diterpenos cafestol e caveol são estudados para o uso em formulações de filtros solares pois apresentam propriedades quimioprotetoras contra toxinas de ação carcinogênica e proteção contra os raios solares (CAVIN; HOLZHAUSER; SCHARF, 2002; FOLLIER; PLESSIS 1988).

O cafestol também apresenta propriedades anti-inflamatórias. Pode ser utilizado em quantidades efetivas em uma combinação tópica farmacêutica ou cosmética para a prevenção e ou tratamento de doenças que afetam a barreira lipídica da pele, tornando-a deficiente ou danificada, como por exemplo: pele seca, psoríase, queimaduras, bolhas e feridas. Pode ser utilizada também misturas contendo cafestol e caveol para aplicações cosméticas (BERTHOLET, 1988; PELLE, 1999; BERTHOLET, 1987).

Além dos estudos feitos sobre o uso cosmético e farmacêutico do cafestol e caveol, outros componentes deste óleo são estudados e utilizados por sua ampla aplicação.

O OCV apresenta propriedades valiosas para a formulação de produtos cosméticos. Tem sido muito utilizado como antioxidante, na proteção UVB e também como auxiliar na manutenção da umidade natural de pele. Segundo pesquisas seu principal ácido graxo (linoleico) proporciona alívio para eczemas e apresenta propriedades terapêuticas no tratamento contra dermatites (WAGEMAKER, 2011; BEVERIDGE, 1999).

Por apresentar uma rica composição, o café verde é utilizado por vários fabricantes na formulação de inúmeros produtos cosméticos, conforme dados da Tabela 2.

Tabela 2. Lista de alguns produtos contendo café verde, com seus respectivos fabricantes.

Nome Comercial	Fabricante
Creme alisante tioglicolato com óleo de café verde	Salon Line
Máscara hidratante Exxa com óleo de argan e café verde	Salon Line
Shampoo Exxa com óleo de argan e café verde	Salon Line
Condicionador Exxa com óleo de argan e café verde	Salon Line
Chronos sérum corporal bio-redutor	Natura
Caffe Green creme gel facial - diurno	Biolab
Caffe Green creme gel facial - noturno	Biolab
Caffe Green mousse de limpeza facial	Biolab
Caffe Green emulsão hidratante corporal	Biolab
Creme de massagem corporal com centella e café verde	Aromassagem
Kolene condicionador com óleo de café verde	Macleny
Reduxcel plus crio active duo – redutor de celulite e gordura localizada	Adcos
Bálsamo anti celulite com café verde	Essencial
Eyebright eyecream - redutor de olheiras e rugas ao redor dos olhos	Gourmet Body Treats
Posto Protect - fluido protetor solar FPS 30	Sol de Janeiro
Posto Protect - loção protetora solar FPS 15	Sol de Janeiro
Posto Protect - protetor solar hidratante para o rosto FPS 60	Sol de Janeiro
Sabonete vegetal café verde	Kapeh
Creme hidratante Chanty cream	VitaDerm
Ginkolis gel revitalizante para olhos	Bioscreen
Body Sculpture creme para massagem e drenagem linfática	Mahogany
Green coffee sun screen FPS 50	SkinFood
Green coffee lip scrub - esfoliante e hidratante labial	SkinFood
Face essenace with green coffe – revitalizante e hidratante	Fresh

2.3. Quantificação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (CG) desde a sua origem, no início da década de 1950, tem sido indispensável para o estudo de misturas complexas de ácidos graxos (ACKMAN, 2002). Com o passar dos anos esta técnica foi se aprimorando e os avanços contribuíram para uma investigação mais detalhada da composição de ácidos graxos existentes nos diferentes tipos de óleos, incluindo a separação de alguns isômeros.

Preferencialmente, os ácidos graxos são analisados por CG sob a forma de ésteres metílicos. A eficiência da separação é dependente, principalmente, do comprimento da coluna e da temperatura de análise (LEDOUX; LALOUX; WOLFF, 2000).

Para que os ácidos graxos se tornem menos polares e mais voláteis, é necessário convertê-los em ésteres metílicos de ácidos graxos, o que é conseguido através de uma derivatização clássica (FUENTE; DE LA LUNA; JUAREZ, 2006). Estes ésteres metílicos são os derivados de ácidos graxos mais utilizados para a quantificação por CG, existindo muitos procedimentos disponíveis na literatura. (SHANTA; NAPOLITANO 1992; SIMIONATO *et al.*, 2010).

Nos óleos vegetais, a maioria dos ácidos graxos presentes aparece na forma de ésteres de ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol (triglicerídeos). O preparo dos ésteres metílicos de ácidos graxos a partir dos triglicerídeos pode ser feito, por exemplo, por reações de hidroesterificação (reações de hidrólise seguidas de reações de esterificação) (FUENTE; DE LA LUNA; JUAREZ, 2006; SHANTA; NAPOLITANO 1992; SIMIONATO *et al.*, 2010).

Basicamente, a reação de hidrólise irá ocorrer entre o triglicerídeo e a água, formando glicerina e ácidos graxos. Após a hidrólise os ácidos graxos gerados são esterificados com metanol. A Figura 9 ilustra, de uma forma geral, essas reações.

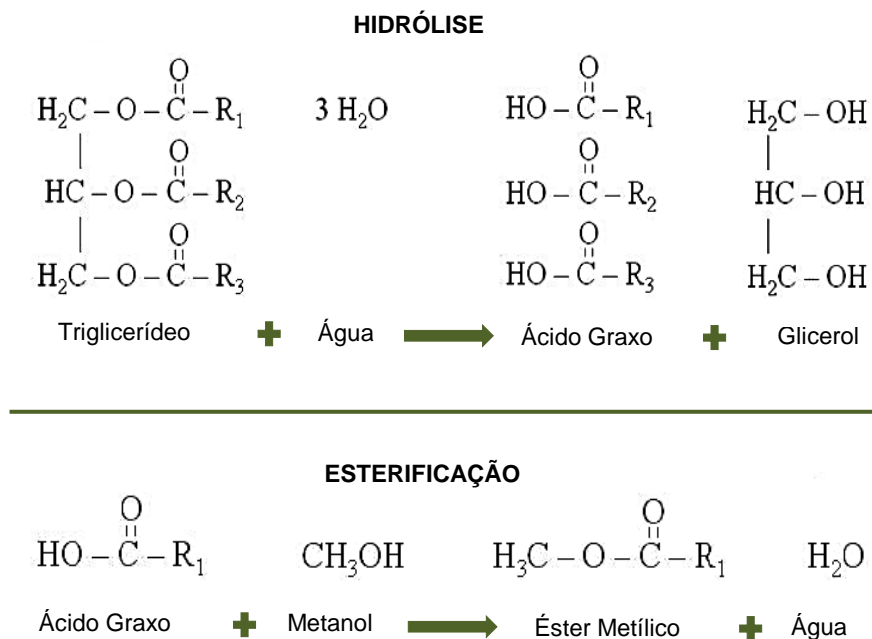


Figura 9. Esquema geral das reações que ocorrem na hidroesterificação.

O uso de padrões é comum para a identificação dos componentes da amostra. A análise com padrões pode ser feita através da comparação dos tempos de retenção ou pela adição de padrões internos que são injetados junto com a amostra.

Outra forma utilizada para a identificação e quantificação dos compostos presentes, é a utilização da espectrometria de massas, o que dispensa o uso de padrões (MENDHAM, 2002). A cromatografia gasosa com a espectroscopia de massa constitui uma técnica analítica altamente sensível (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Segundo Tabosa *et al.* (2000) a caracterização por cromatografia gasosa quando acoplado à espectrometria de massas dispensa o uso de padrões, uma vez que a comparação dos espectros de massas são feitos com o auxílio de bancos de dados espectrais via computador.

A análise de ácidos graxos tem se tornado cada vez mais importante devido sua importância associada a benefícios nutricionais e para saúde (LALL; PROCTOR; JAIN, 2009). Dessa forma, muitos autores descreveram a caracterização dos ácidos graxos por cromatografia gasosa, como por exemplo a caracterização do perfil de ácidos graxos presentes no azeite de oliva (CARDOSO *et al.*, 2010), composição da fração lipídica do óleo de café verde (WAGEMAKER *et al.*, 2011), conteúdo de ácidos graxos no óleo de girassol (ZHELJAZKOV *et al.*, 2009), conteúdo lipídico da

semente de romã (PARASHAR; SINHA; SINGH, 2010), caracterização da polpa de macaúba (AMARAL *et al.*, 2011), entre muitos outros.

2.4. Sistemas microparticulados

Nos sistemas microparticulados o ativo é distribuído dentro de pequenas partículas. As micropartículas podem ser denominadas microcápsulas se o sistema formado é um reservatório contendo a substância ativa revestida por uma membrana de espessura variada. Também podem ser denominadas microesferas quando o ativo se encontra uniformemente disperso e/ou dissolvido na matriz (SILVA *et al.*, 2003) e apresentam formato esférico. As microesferas são partículas sólidas e esféricas que apresentam tamanho microscópico, variando entre 1 a 1000 μm (SARALIDZE; KOOLE; KNETSCH, 2010).

Conforme ilustrado na Figura 10, as microcápsulas são consideradas sistemas reservatório onde é possível observar o núcleo contendo a substância ativa e a matriz (invólucro). O núcleo no interior da partícula pode apresentar-se dividido ou não, sendo denominados polinucleares e mononucleares, respectivamente. Já as microesferas são sistemas onde o fármaco encontra-se disperso e/ou dissolvido em uma matriz, podendo ser homogênea, quando a substância ativa encontra-se dissolvida, ou heterogênea onde o ativo encontra-se suspenso. Trata-se de um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado (SILVA *et al.*, 2003).

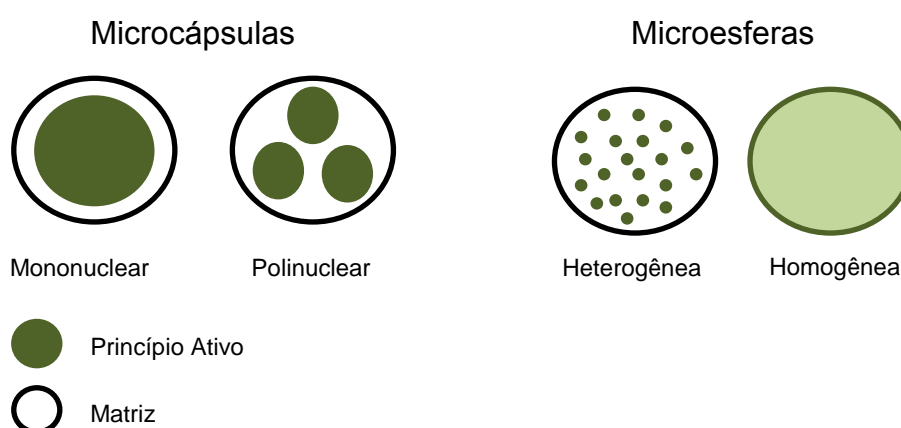


Figura 10. Estrutura dos diferentes tipos de micropartículas (Adaptado de Silva *et al.*, 2003)

A microencapsulação é uma tecnologia em que sólidos, líquidos ou gases podem ser recobertos formando partículas microscópicas pela formação de uma fina

camada ao redor da substância ativa, promovendo uma proteção completa ou parcial desses ativos contra a ação de fatores externos (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2007; CHAMBI *et al.*, 2008).

O uso das micropartículas visa melhorar as características de um ativo e suas formas farmacêuticas, como por exemplo: reduzir a frequência de dose, diminuir a toxicidade, aumentar a estabilidade, converter líquidos em sólidos, mascarar sabor, cor e/ou odor, controlar o tamanho das partículas, entre outros. Esses sistemas permitem ainda o controle da liberação desses ativos, além de oferecer proteção contra os efeitos deletérios causados pelo meio ambiente, provocados por ação da luz, calor e umidade, que podem levar, por exemplo, à oxidação do ativo (MAGILL, 1991; SILVA *et al.*, 2003).

Dessa forma, vários setores como o farmacêutico, cosmético, químico e alimentício têm utilizado sistemas microparticulados para o desenvolvimento de novos produtos, entre eles, protetores solar, vacinas e nutracêuticos (CHAMBI *et al.*, 2008).

Existem inúmeros materiais de revestimento que podem ser utilizados para a produção de micropartículas, tais como: polímeros naturais ou sintéticos, ceras, proteínas e polissacarídeos. Dessa forma, a escolha da matriz carreadora irá depender do método utilizado para a formação das micropartículas, bem como do tipo de aplicação do produto e de sua ação. A liberação do ativo pode ser por estímulo mecânico (rompimento por pressão) ou por outros estímulos como a variação de temperatura e pH, dependendo do meio em que se encontram as micropartículas (RÊ, 2000).

Essa grande variedade de materiais de revestimento permite a produção de sistemas diferenciados como as micropartículas lipídicas sólidas (MLS), que são partículas onde a matriz utilizada é um lipídio, sendo uma alternativa para a encapsulação de ativos lipofílicos. São sistemas promissores para o transporte de ativos principalmente por que são biodegradáveis, quimicamente estáveis e fisiologicamente compatíveis. São estudadas como alternativa ao uso dos polímeros, pois os lipídios apresentam biocompatibilidade favorável e menor toxicidade quando comparados a muitos polímeros (PASSERINI *et al.*, 2010; PERGE *et al.*, 2011; NANJWADE *et al.*, 2011).

As MLS são capazes de incorporar grande quantidade de ativos lipofílicos além de permitir uma produção em larga escala a um custo relativamente menor do

que os lipossomas (NANJWADE *et al.*, 2011).

O estudo das micropartículas produzidas com a finalidade de veicular ativos tópicos deve considerar as barreiras impostas pela pele, uma vez que esta age como uma barreira mecânica nanoporosa. Muitos fatores podem influenciar na distribuição desses ativos como o tamanho da micropartícula, o material de revestimento, a escolha da formulação, lipofilicidade, quantidade de carga, entre outros (BARRY, 2001; TOLL *et al.*, 2004). Dentre esses, um fator muito estudado é o tamanho das micropartículas, onde estudos mostraram que a penetração cutânea através dos apêndices da pele é proporcional ao seu tamanho (TOLL *et al.*, 2004). Segundo Schaefer *et al.* (1990) e Toll *et al.*, (2004) partículas que apresentam diâmetro em torno de 3 a 10 μ m são capazes de penetrar seletivamente nos folículos, enquanto que partículas maiores que 10 μ m permanecem na superfície da pele, não penetrando pelos orifícios foliculares ou pela camada córnea. Partículas com 7 μ m podem ser observadas no canal folicular, mas raramente conseguem penetrar o estrato córneo. No entanto, partículas menores que 3 μ m podem ter boa penetração nesse apêndice cutâneo e também nas camadas superficiais do estrato córneo, porém não são observadas na epiderme viável.

2.4.1. Técnicas utilizadas para a produção das micropartículas

Muitas técnicas são utilizadas para a produção das micropartículas, sendo que o método ideal deve ser simples, reprodutível, rápido e fácil de transpor para a escala industrial (GIUNCHEDI; CONTE, 1995). Alguns exemplos dessas técnicas são:

- **Coacervação:** consiste na obtenção de duas fases líquidas imiscíveis, uma fase de coacervado contendo concentração elevada de uma macromolécula e a outra fase de equilíbrio, onde a mesma está em baixa concentração. Pode ser induzida por alterações de condições, causando a dessolvatação da macromolécula (coacervação simples) ou pela criação de forças eletrostáticas (coacervação complexa). As microcápsulas se originam a partir da gelificação de cápsulas embriônicas formadas pela deposição do coacervado em volta das pequenas partículas insolúveis no líquido de equilíbrio. (SILVA *et al.*, 2003; KAS; ONER, 2000). A Figura 11 ilustra a representação esquemática das etapas do processo de microencapsulação por coacervação.

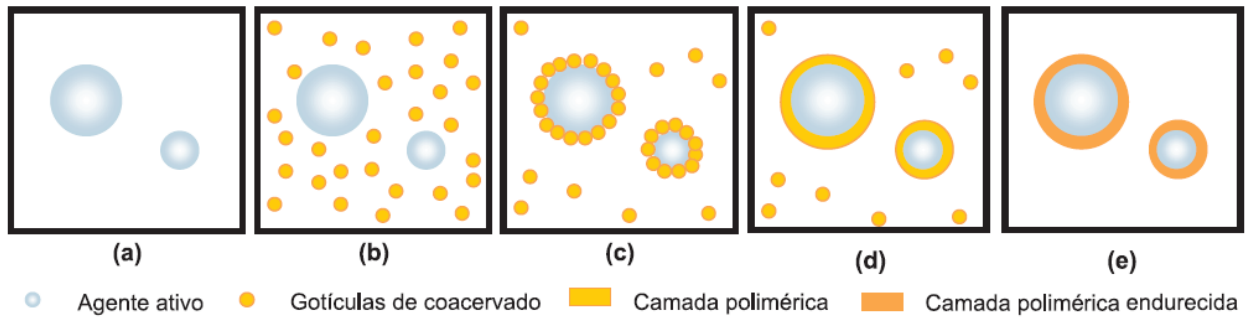


Figura 11. Etapas do processo de microencapsulação por coacervação (SUAVE *et al.*, 2006).

- **Leito Fluidizado:** Ocorre quando um fluxo ascendente de um fluido atinge velocidade suficiente para suspender as partículas sem expulsá-las da corrente do fluido. As partículas que irão compor o núcleo, contendo a substância ativa, são suspensas em uma câmara e o material de revestimento é atomizado, depositando-se sobre estas partículas (AZEREDO, 2005).
- **Hot Melt:** O material de revestimento é mantido a uma temperatura suficiente para sua fusão (forma líquida), com isso é preparada uma dispersão contendo a substância ativa e o material fundido. Esta dispersão é atomizada num processo de fluização ou sistema de jorro para a produção das micropartículas. É utilizada para o revestimento de alimentos e fármacos, e também para novas aplicações envolvendo a produção de granulados. (KULAH; KAYA, 2011; BORINI; ANDRADE; FREITAS, 2009).
- **Spray drying:** Consiste na atomização em pequenas gotas de um fluxo de líquido em uma câmara de secagem, onde são submetidas à interação com um gás aquecido em temperatura adequada (normalmente ar). Dessa forma, o solvente contido na dispersão de cada gotículas é vaporizado, resultando na formação de partículas sólidas. Recentemente, o *spray drying* está sendo utilizado também para o desenvolvimento de novos produtos, destacando a preparação de micropartículas de dispersão sólida (FREITAS *et al.*, 2010; KRZYSZTOF; KRZYSZTOF, 2010).
- **Spray congealing:** Consiste na atomização de um fluxo líquido composto pela substância ativa que pode estar dissolvida ou dispersa num veículo fundido. Esta atomização é feita em uma câmara de resfriamento, onde a temperatura é mantida abaixo do ponto de fusão do veículo. As gotículas fundidas se solidificam ao entrar em contato com o ar resfriado, produzindo assim as

micropartículas (PASSERINI et al, 2010). Por ser a técnica escolhida para o desenvolvimento das micropartículas produzidas no presente estudo, o *spray congealing* será revisado com mais detalhes.

2.5. Spray congealing

A técnica de *spray congealing* é semelhante à de *spray drying*, sendo os princípios básicos similares. Dessa forma, o mesmo equipamento pode ser utilizado desde que sejam feitas algumas adaptações (Figura 12), uma vez que o fluxo de energia é diferente. No *spray drying* o calor aplicado provoca a evaporação do solvente presente nas gotículas, ou seja, o calor é transportado do ar quente para as gotas atomizadas. Já no *spray congealing*, o ar resfriado remove calor das gotículas quentes, levando a solidificação do veículo fundido (ILIC et al., 2009; KILLEN, 1993).

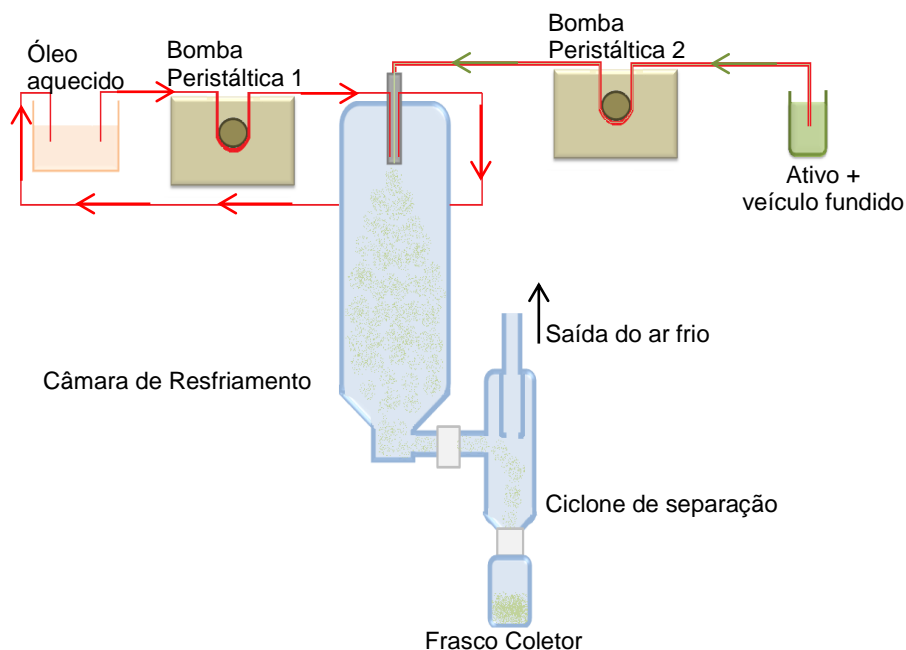


Figura 12. Esquema das adaptações feitas no *spray dryer* para o uso da técnica de *spray congealing*.

As modificações necessárias no equipamento de *spray dryer* para a técnica de *spray congealing*, são: (1) Para o transporte da mistura fundida até o bico atomizador é necessário que haja o aquecimento desta mangueira, que é feito através do recobrimento da mesma por uma fita aquecedora. Dessa forma, a temperatura se manterá constante por todo o percurso, evitando a solidificação da mistura e conseqüentemente o entupimento da mangueira. (2) Para manter o bico nebulizador aquecido, outra bomba peristáltica é responsável pela circulação de um

óleo aquecido em alta temperatura (acima do ponto de fusão do veículo), o que permitirá uma temperatura constante no bico evitando a solidificação da mistura e consequentemente o entupimento do bico.

De maneira geral, as etapas básicas do processo de produção das micropartículas por *spray congealing* consistem (ILIC *et al.*, 2009):

1. Fusão do veículo por aquecimento, em temperaturas ao menos 10°C acima do seu ponto de fusão;
2. Adição da substância ativa no veículo fundido (matriz carreadora), podendo estar dissolvida ou dispersa no carreador;
3. Com o auxílio de uma bomba peristáltica a mistura contendo o ativo e o veículo fundido é conduzida até o bico nebulizador, onde será atomizada numa câmara de resfriamento.
4. Ao entrar em contato com o ar resfriado dentro da câmara as gotículas do material fundido se solidificam. Essa solidificação deve ocorrer antes das gotículas entrarem em contato com as paredes da câmara.
5. Através do fluxo de ar essas partículas são levadas até um ciclone onde ocorrerá a separação das partículas e do fluxo de ar. As micropartículas produzidas são armazenadas em um frasco coletor.

A técnica de *spray congealing* é utilizada para a produção de microesferas, onde a substância ativa é distribuída uniformemente dentro de todo o volume da partícula. Por não envolver a evaporação do solvente, as micropartículas produzidas são, normalmente, densas e não porosas (ILIC *et al.*, 2009).

Existem inúmeras variáveis que podem influenciar no processo de produção das micropartículas por *spray congealing*, sendo as mais importantes: temperatura do material fundido, temperatura do ar de refrigeração, pressão e temperatura do ar de atomização e a vazão de alimentação do líquido (ILIC *et al.*, 2009).

O *spray congealing* tem atraído atenção crescente nos últimos anos. Trata-se de uma técnica ambientalmente amigável, pois não requer o uso de solventes orgânicos ou aquosos. Outras vantagens são o menor consumo de energia e tempo de processo, além de ser facilmente empregada em escala industrial, uma vez que pode ser operado continuamente (ALBERTINI *et al.*, 2009; EMAS; NYQVIST, 2000; PASSERINI *et al.*, 2009).

Esta técnica encontra aplicação principalmente nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, onde foi empregada com sucesso por muitos autores, conforme

alguns estudos descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Alguns estudos realizados com sucesso utilizando a técnica de *spray congealing*.

Estudo	Autor
Micropartículas contendo avobenzona (utilizado na fabricação de protetores solar)	ALBERTINI <i>et al.</i> , 2008
Produção de micropartículas contendo Vitamina E	ALBERTINI <i>et al.</i> , 2008
Micropartículas contendo nitrato de econazol para uso tópico	PASSERINI <i>et al.</i> , 2009
Produção de micropartículas contendo carbamazepina	MARTINS, R. M., 2010
Produção de micropartículas contendo dispersões sólidas de praziquantel	MACHADO, M. O., 2011

2.5.1. Matérias primas utilizados em *spray congealing*

Existem inúmeros excipientes que podem ser utilizados como matriz carreadora ou material de revestimento para a produção de micropartículas por *spray congealing*. As características ideais desses materiais devem assegurar que o carreador seja estável sob as condições típicas do *spray congealing*, a pulverização deve ser fácil e as temperaturas empregadas devem ser moderadas para evitar a degradação da substância ativa (ILIC *et al.*, 2009).

Os excipientes mais utilizados para este fim são os polioxilglicerídeos, poloxamer, polietilenoglicóis, éteres de polietilenoglicóis, além de cera de abelha, cera de carnaúba, cera microcristalina, parafina e ácido esteárico (ILIC *et al.*, 2009).

O uso das ceras como carreador é muito comum em técnicas que utilizam matrizes fundidas para a preparação de micropartículas. Estas apresentam uma composição ampla de substâncias químicas, tais como ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos e glicerídeos. São amplamente utilizadas para liberação controlada de ativos e apresentam boa estabilidade em variações de pH e níveis de umidade, além de ser biocompatível (RANJHA, KHAN, NASEEM, 2010). Dependendo de sua natureza as ceras apresentam diferentes pontos de fusão, sendo este um dos fatores que devem ser considerados na escolha do melhor carreador.

A escolha da cera de abelha (CA) para a produção das micropartículas produzidas no presente trabalho deve-se às vantagens que as ceras oferecem para

a microencapsulação de ativos, além de apresentar fusão em torno de 62 à 67°C (ZHU *et al.*, 2010), considerado apropriado para o estudo.

De um modo geral, as ceras se apresentam de forma parecida, umas com as outras, em seu aspecto físico, porém são muito diferentes em seu aspecto químico. Em especial, a cera de abelha é uma matéria prima usada há muito tempo na formulação de cosméticos, apresentando cor amarelada e consistência plástica (PEREIRA; ZOVARO, 2010; MICHALUN; MICHALUN, 2010).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (BRASIL, 2001), a cera de abelha é classificada em:

- Cera de abelha bruta, quando esta não tiver sofrido nenhum processo de purificação, apresentando coloração amarelada, untuosa ao tato, odor de mel, mole e plástica ao calor da mão.
- Cera de abelha branca ou pré-beneficiada, quando a CA tiver sido descolorida por ação da luz, ar ou processos químicos, apresentando coloração branca ou creme, é isenta de restos de mel, frágil, pouco untuosa e de odor acentuado.

A cera de abelha é um produto fisiológico produzido dentro da colmeia, através de glândulas cerígenas das abelhas. Para a sua elaboração as abelhas engolem e digerem o mel, transformam o alimento em gordura e em 24 horas começam a fornecer a cera. As glândulas cerígenas expelem a cera na forma líquida e esta se solidifica ao entrar em contato com a temperatura ambiente (PEREIRA; ZOVARO, 2010).

Após extração, a CA deve ser purificada, eliminando totalmente as impurezas, posteriormente esta pode ser clarificada, através de processos naturais (exposição aos raios solares), ou por processos químicos, onde após ser derretida são aplicados produtos químicos, como por exemplo, ácido clorídrico ou cloreto de cálcio (PEREIRA; ZOVARO, 2010).

A Figura 13 mostra algumas formas comercializadas da CA, tais como: amarela (13a), branca (13b e 13d) e clarificada (13c).

A cera de abelha branca apresenta grau cosmético, esta passa por processos de purificação tornando-a mais clara e apropriada para o uso em formulações cosméticas. Esta pode ser encontrada na forma de pedaços ou flocos (13b e 13d). A CA clarificada (13c) também passa por processos químicos de clareamento, porém seu uso é mais apropriado para aplicação em ceras depilatórias.



Fonte: <http://www.gmceras.com.br/cera-de-abelha-pura.html>

Figura 13. Alguns tipos de cera de abelha comercializados.

Tradicionalmente a CA é utilizada em cosméticos como emulsificante para emulsões água em óleo e também como agente de consistência. Esta é usada em formulações cosméticas como parte da composição de produtos sólidos e pastas (cremes, batons, pomadas). É insolúvel em água, muito pouco solúvel em etanol e é solúvel em clorofórmio e éter. Na superfície da pele a CA pode formar uma reticulação e não um filme, como ocorre com a parafina. Algumas propriedades são atribuídas para a CA, como anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriana e germicida, porém ainda não existem comprovações científicas. Como antioxidante a CA apresenta capacidade em sequestrar radicais livres. Esta matéria prima raramente causa sensibilidade e reações alérgicas são pouco intensas (MICHALUN; MICHALUN, 2010).

2.5.2. Estudos reológicos e suas influências

Estudos reológicos são essenciais para o entendimento do comportamento dos materiais. Sendo assim, são indispensáveis para o desenvolvimento de muitos produtos, tanto para a indústria de alimentos quanto farmacêutica e de cosméticos. Estes exercem um importante papel para o preparo e utilização de formas farmacêuticas e cosméticas (FERREIRA, 2008; NETZ; ORTEGA, 2002).

A viscosidade é a propriedade física que caracteriza a resistência dos fluidos ao escoamento, ou seja, é o atrito das camadas internas do fluido que impõe resistência a fluir. Sendo assim, a viscosidade descreve as propriedades de escoamento de um fluido.

A reologia é a ciência que estuda a deformação e o escoamento da matéria. Os estudos reológicos são feitos para verificar a maneira que os materiais respondem à aplicação de forças, que podem ser de tensão, compressão ou cisalhamento (STEFFE, 1996; TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005).

Alguns conceitos e terminologias usados em estudos reológicos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Terminologias e conceitos básicos em reologia.

	Definição	Fórmula	Unidade
Tensão de cisalhamento (shear stress)	Quantidade de força aplicada ao fluido, em uma área determinada.	$\tau = \frac{\text{força } F}{\text{área } A}$	Pa
Taxa de cisalhamento (shear rate)	Gradiente de velocidade de cisalhamento por uma determinada distância	$\gamma = \frac{\text{velocidade}}{\text{distância}}$	s ⁻¹
Viscosidade	Descreve as propriedades de escoamento do material	Viscosidade = $\frac{\text{Tensão de cisalhamento}}{\text{Taxa de cisalhamento}}$	Pa.s
Tensão de deformação inicial (yield stress)	Tensão mínima necessária para iniciar o fluxo do material		

Fonte: <http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/reologia%20brookfield.pdf>

A viscosidade pode ser utilizada para auxiliar a classificação dos fluidos. Em fluidos Newtonianos a viscosidade é influenciada apenas pela temperatura e composição do fluido, mantendo constante a relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento. Outros fluidos, que não apresentam este comportamento, são chamados de fluidos não-Newtonianos, nos quais a viscosidade é dependente da taxa de cisalhamento. Dessa forma, as propriedades dos fluidos não-Newtonianos são influenciadas pela temperatura, composição do fluido e também pela taxa de cisalhamento. Com isso, estes fluidos apresentam várias viscosidades aparentes, que são correspondentes a determinadas taxas de cisalhamento (RAO, 1999; TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005).

Além disso, os fluidos não-Newtonianos podem ser classificados em diferentes categorias. A Figura 14 mostra um esquema conciso desta classificação.



Adaptado de: http://www.setor1.com.br/analises/reologia/cla_ssi.htm

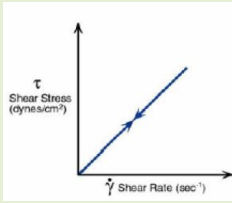
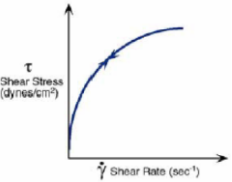

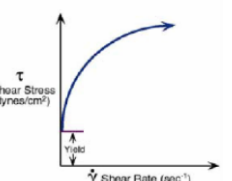
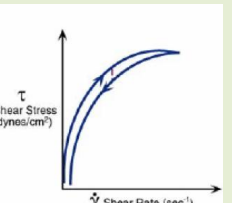
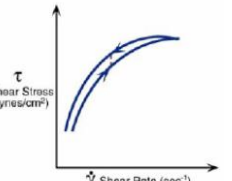
Figura 14. Breve esquema da classificação reológica dos fluidos

Dessa forma, os fluidos não-Newtonianos são divididos em duas categorias: dependentes e independentes do tempo (HOLDSWORTH, 1971; RAO, 1999). Quando para uma temperatura constante a viscosidade aparente depende somente da taxa de cisalhamento, os fluidos são classificados como independentes do tempo. Por outro lado, quando a viscosidade aparente depende também da duração do cisalhamento, estes são classificados como fluidos dependentes do tempo (RAO, 1999).

A Tabela 5 mostra os reogramas típicos para cada tipo de fluido, bem como faz uma breve descrição de cada comportamento de escoamento dos fluidos.

Conforme descrito na Tabela 5, na classificação dos fluidos não-newtonianos independentes do tempo, existem subdivisões que levam em consideração o aumento ou a diminuição da viscosidade aparente do material e se este exige uma tensão mínima para começar a fluir.

Tabela 5. Breve descrição da classificação do comportamento de escoamento dos fluidos

Descrição dos fluidos	
	<p>NEWTONIANO</p> <p>Viscosidade igual, independente da taxa de cisalhamento (medido em temperatura determinada).</p>
	<p>PSEUDOPLÁSTICOS (não-Newtoniano independente do tempo)</p> <p>A viscosidade decresce com o aumento da taxa de cisalhamento.</p>
	<p>DILATANTES (não-Newtoniano independente do tempo)</p> <p>A viscosidade aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento</p>
	<p>PLÁSTICOS (não-Newtoniano independente do tempo)</p> <p>Comporta-se como sólido em condições de repouso, começando a fluir após a aplicação de uma determinada força. Após o início, o fluxo pode ser newtoniano, pseudoplástico ou dilatante.</p>
	<p>TIXOTRÓPICOS (não-Newtoniano dependente do tempo)</p> <p>Sob condições constantes de taxa de cisalhamento, acontece uma diminuição da viscosidade em função do tempo.</p>
	<p>REOPÉTICOS (não-Newtoniano dependente do tempo)</p> <p>Sob condições constantes de taxa de cisalhamento, acontece um aumento da viscosidade em função do tempo.</p>

Portanto, os fluidos não-Newtonianos independentes do tempo podem ser subclassificados como fluidos pseudoplásticos, dilatantes e plásticos. Já os fluidos não-Newtonianos dependentes do tempo podem ser subclassificados em fluidos tixotrópicos e reopéticos (BRASEQ, 2011).

Existem equações matemáticas que podem relacionar as propriedades reológicas de um fluido com outras grandezas como concentração, temperatura ou pH. Estas são chamadas de modelos reológicos e são indispensáveis para o dimensionamento de equipamentos, estudos de processos e também para o controle de qualidade e de processo. Alguns exemplos destes modelos reológicos são: o modelo Newtoniano; o modelo de Bingham e o modelo de Herschel-Bulkley. A escolha do modelo ideal irá depender do tipo de material estudado (HOLDSWORTH, 1971).

Os estudos reológicos são feitos em instrumentos denominados reômetros. Existem dois tipos de reômetros, os rotacionais e os tubulares. Dentre os reômetros do tipo rotacional os mais conhecidos são: reômetro de cilindros concêntricos, onde a amostra está contida em um cilindro copo e um segundo cilindro, de diâmetro menor, é imerso no primeiro; reômetro cone e placa, composto por uma placa circular e um cone que quase toca a superfície da placa, ficando a amostra entre a placa e o cone (RAO, 1999; TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; HOLDSWORTH, 1971).

Estudos reológicos apresentam um papel importante para o entendimento dos fatores que afetam o processo e a formação das micropartículas por *spray congealing*, pois a reologia do material fundido pode afetar desde o tamanho das gotículas formadas na atomização até na sua adesão nas paredes da câmara. Dependendo da viscosidade estas gotículas podem aumentar ou diminuir a adesão na câmara, alterando o rendimento do processo. Além disso, a viscosidade da mistura pode influenciar também na morfologia e no tamanho das micropartículas.

2.6. Planejamento Experimental

As escolhas adequadas dos excipientes, das concentrações utilizadas e das condições do processo afetam o tamanho das partículas, a estabilidade do produto final durante o armazenamento, além de influenciar no comportamento de liberação e conseqüentemente na ação do ativo. Sendo assim, existe uma formulação ideal para cada ativo e sua forma farmacêutica. Esta condição ideal pode ser obtida

através da investigação das variáveis do processo, tendo em vista as condições desejadas (KHERADMANDNIA *et al.*, 2010).

Um planejamento de experimentos consiste em ensaios com a finalidade de investigar um processo produtivo ou um sistema. As variáveis de um processo são alteradas e as respostas obtidas são analisadas, com o objetivo de determinar as condições que mais influenciam neste processo (SEOLATO *et al.*, 2009).

Para lidar com vários fatores uma abordagem adequada é a realização de um experimento fatorial. Nesta estratégia experimental os fatores são variados em conjunto ao invés de um de cada vez (RIBEIRO FILHO, 2011).

Essas ferramentas permitem a otimização de processos, além de reduzir o número de experimentos que precisam ser executados e o consumo de materiais. Permitem também o desenvolvimento de modelos matemáticos que avaliam a pertinência, a significância estatística dos efeitos do fator estudado e os efeitos de interação entre os fatores (FERREIRA *et al.*, 2007).

Para essas metodologias estatísticas, são consideradas dois tipos de variáveis: as respostas e os fatores. As respostas são as variáveis dependentes, onde seus valores irão depender do nível dos fatores. Dessa forma, conhecendo a natureza das relações entre as respostas e os fatores (superfície de resposta), os valores ótimos destes fatores podem ser determinados (FERREIRA *et al.*, 2007).

Para um melhor esclarecimento, seguem as definições de alguns termos utilizados no planejamento estatístico de experimentos:

- Resposta: Variável dependente observada pelo resultado obtido nos testes realizados em um conjunto específico de níveis dos fatores.
- Fatores: Conjunto de variáveis independentes que possivelmente irá interferir na resposta de um processo ou sistema.
- Níveis: Conjunto de valores definidos para cada fator.

Existem planejamentos fatoriais completos e fracionados, onde os fatores estudados variam de forma planejada e constante, sendo representados por x^n , onde x representa os níveis e n o número de fatores.

Nos planejamentos completos então incluídos todas as combinações possíveis entre os diferentes fatores, sendo apropriado para experimentos menores, com baixo número de fatores e níveis.

Já planejamentos fatoriais fracionados são utilizados quando existem muitos fatores a serem investigados. Estes planejamentos permitem estudos maiores com

um menor número de ensaios realizados. Os ensaios no ponto central, feitos no mínimo em triplicata, permitem o cálculo do erro experimental e conseqüentemente a avaliação da reprodutibilidade do processo. Um modelo matemático pode ser elaborado para a obtenção da superfície de resposta, o que permite determinar as condições otimizadas, a qual é fornecida pela significância estatística das respostas (RODRIGUES; LEMMA, 2009).

Um exemplo de planejamento fatorial fracionado é o Box-Behnken que permite quantificar adequadamente uma resposta com um número reduzido de experimentos. Em geral, este planejamento requer três tipos de níveis para cada fator.

Dessa forma, o planejamento Box-Behnken, visto de um cubo (Figura 15), é caracterizado por um conjunto de pontos centrais de cada aresta, com replicatas no ponto central.

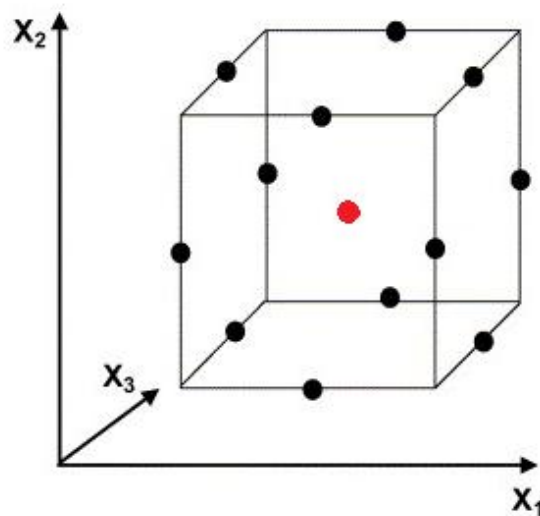


Figura 15. Representação esquemática dos pontos de um Planejamento Box-Behnken (adaptado de SOUZA, SANTOS, FERREIRA, 2005).

Este planejamento não contém combinações onde os fatores estão, simultaneamente, em seus níveis baixos ou altos, o que evita a realização de experimentos sob condições extremas, nas quais podem ocorrer resultados insatisfatórios (SOUZA; SANTOS; FERRERIA, 2005; FERREIRA *et al.*, 2007).

Diante do exposto, o estudo da produção de micropartículas contendo OCV por *spray congealing*, bem como a caracterização de suas características físico-químicas, farmacotécnicas e a avaliação de sua estabilidade, é de grande

importância, uma vez que trata-se de um óleo vegetal com uma rica composição e amplamente utilizado em cosméticos. Além disso, apesar de ser uma técnica bastante promissora, a produção de micropartículas por *spray congealing* ainda é pouco explorada em nosso país, o que justifica a realização de estudos com esta técnica. Estudos como este podem permitir avanços tecnológicos em diversos segmentos, como no caso de produtos cosméticos, onde poderão ser elaborados produtos mais eficazes, seguros e com maior proteção contra as ações do meio ambiente.

Objetivo

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi produzir e avaliar micropartículas lipídicas sólidas contendo óleo de café verde por *spray congealing* e verificar suas características físico-químicas, farmacotécnicas e sua estabilidade.

3.2. Objetivos Específicos

Estudar as variáveis do processo de produção das micropartículas sólidas contendo óleo de café verde através do Planejamento Experimental Box-Behnken. Além de determinar algumas propriedades físico-químicas das MLSs, como morfologia, tamanho de partícula e estabilidade.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matérias-primas

- Óleo de café verde - Distriol Comércio de Insumos Ltda (São Paulo, SP)
- Cera de abelha - Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (São Paulo, SP)

4.2. Reagentes e solventes

- Ácido sulfúrico - Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (São Paulo, SP)
- Água deionizada
- Cloreto de amônio - Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (São Paulo, SP)
- Cloreto de sódio - Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (São Paulo, SP)
- Etanol - Merck Química do Brasil (São Paulo, SP)
- Hidróxido de sódio - Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (São Paulo, SP)
- Metanol - Merck Química do Brasil (São Paulo, SP)
- n-Hexano - Vetec Química Fina LTDA (São Paulo, SP)

4.3. Equipamentos e acessórios

- Agitador de tubos - MA 162 (Marconi, Brasil)
- Analisador de tamanho de partícula - LS 13 320 (Beckman Coulter, EUA)
- Balança analítica - OHAUS Explorer (OHAUS Corporation, EUA)
- Balança eletrônica - OHAUS Explorer (OHAUS Corporation, EUA)
- Balança determinadora de umidade - MB45 (OHAUS Corporation, EUA)
- Bomba peristáltica - Masterflex 7524-50 (Cole Parmer, EUA)
- Condutivímetro - C708 (Analion, Brasil)
- Cromatógrafo a gás - GC-MS GCT Premier (Waters, EUA)
- Calorímetro de Varredura Diferencial - DSC 50 (Shimadzu, Japão)
- Estufa - 400/3ND (Nova Ética, Brasil)
- Lâmpada de Xenônio - Xenarc D-H4R-35W (OSRAM, Brasil)
- Microscópio Eletrônico de Varredura - FEG XL 30 (Philips, Holanda)
- Placa de aquecimento - TE0851 (Tecnal, Brasil)
- Reômetro - R/S-CPS (Brookfield, EUA)
- Spray dryer - MSD 0.5 (Labmaq do Brasil Ltda, Brasil)

4.4. Métodos

4.4.1. Preparo das micropartículas contendo óleo de café verde por spray congealing

Para a obtenção das micropartículas lipídicas sólidas foi idealizado um planejamento experimental do tipo Box-Behnken, onde cada fator é estudado em três níveis, nível alto (+1), nível médio (0) e nível baixo (-1), e três variáveis, X_1 , X_2 e X_3 , num total de 15 experimentos. As variáveis estudadas foram vazão de dispersão (VD), vazão do ar de resfriamento (VAR) e a concentração do óleo de café verde presente na mistura (C). O planejamento com as variáveis codificadas e não codificadas estão ilustrados na Tabela 6.

Tabela 6. Planejamento experimental do tipo Box-Behnken, com as variáveis não codificadas (VD, VAR e C) e codificadas (X_1 , X_2 , X_3).

EXP	VD (mL/min)	VAR (m ³ /min)	C (%)	X_1 (VD)	X_2 (VAR)	X_3 (C)
1	2	0,75	30	-1	-1	0
2	6	0,75	30	1	-1	0
3	2	1,25	30	-1	1	0
4	6	1,25	30	1	1	0
5	2	1,00	20	-1	0	-1
6	6	1,00	20	1	0	-1
7	2	1,00	40	-1	0	1
8	6	1,00	40	1	0	1
9	4	0,75	20	0	-1	-1
10	4	1,25	20	0	1	-1
11	4	0,75	40	0	-1	1
12	4	1,25	40	0	1	1
13	4	1,00	30	0	0	0
14	4	1,00	30	0	0	0
15	4	1,00	30	0	0	0

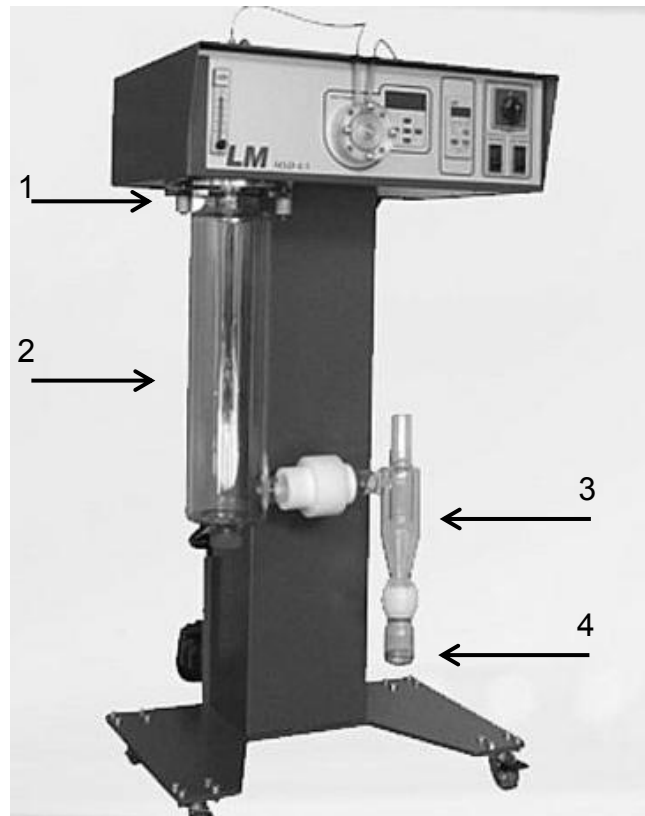
VD é vazão de dispersão (mL/min), VAR é vazão do ar de resfriamento (m³/min) e C é concentração do óleo de café verde (%). X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis codificadas para VD, VAR e C, respectivamente.

Os valores fixados no processo de microencapsulação foram:

- Pressão de atomização: 6 bar
- Vazão do ar de atomização: 50 mL/min
- Temperatura de saída: 23,5 ± 1,5°C
- Temperatura do óleo de aquecimento (circulação responsável pelo aquecimento do bico): 150°C

- Temperatura da fita aquecedora responsável por manter a mistura fundida: 80°C
- Temperatura da cera mais óleo: 80°C

Um aparelho de *spray dryer* (Figura 16) foi modificado para o uso da técnica de *spray congealing* foi utilizado para a produção das MLSs de OCV. Um bico nebulizador atomiza a mistura fundida formando gotículas líquidas que se solidificam ao entrarem em contato com o ar resfriado, dentro de uma câmara de resfriamento.



Fonte: http://www.b2babimaq.com.br/maquinas_empresas.asp?cod_empresa=802

Figura 16. Mini *Spray Dryer* 0.5 (Labmaq do Brasil), sendo: (1) bico atomizador; (2) câmara com ar resfriado, para o uso da técnica de *spray congealing*; (3) ciclone de separação; (4) frasco coletor.

As concentrações escolhidas para as misturas foram de 20, 30 e 40% de OCV. Dessa forma foram calculadas as quantidades de cera de abelha adequada para obter 50g de cada mistura.

Após o cálculo das quantidades necessárias de OCV e CA para cada amostra, a CA foi levada a uma placa de aquecimento. Esta foi aquecida até atingir uma temperatura em cerca de 10°C acima de seu ponto de fusão (entre 75 à 80°C).

Posteriormente foi adicionado o OCV e a temperatura foi mantida constante. A mistura fundida foi conduzida até um bico atomizador com auxílio de uma bomba peristáltica com vazão controlada (2, 4 e 6mL/min). O material nebulizado foi solidificado em uma câmara de resfriamento com vazão de ar de resfriamento controlada (0,75, 1,00 e 1,25m³/min). As MLSs formadas foram coletadas com o auxílio de um ciclone em um frasco coletor.

4.4.2. Determinação do teor de umidade

O teor de umidade foi determinado em balança com sistema de aquecimento por luz halógena (marca OHAUS, modelo MB45), onde aproximadamente 500mg de cada amostra foram utilizadas e o teor de umidade foi determinado a uma temperatura de 105°C até peso constante. As análises foram realizadas em duplicata e o teor de umidade fornecido em porcentagem.

4.4.3. Morfologia das MLSs

Primeiramente as amostras receberam um banho de ouro e posteriormente a morfologia das micropartículas foi determinada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi utilizado o microscópio PHILIPS modelo FEG XL 30, em aumentos de 2.000, 5.000 e 10.000 vezes para a obtenção das imagens das amostras analisadas. As amostras analisadas foram as micropartículas obtidas a partir da cera de abelha e das misturas contendo 20, 30 e 40% de óleo de café verde.

4.4.4. Determinação do tamanho e distribuição das micropartículas

Para a determinação do tamanho das micropartículas foi utilizada a técnica de difração a laser (Beckman Coulter modelo LS 13 320). Uma pequena quantidade de amostra foi suspensa em etanol e água (sob agitação constante) e a distribuição do tamanho de partícula obtida.

4.4.5. Estudo do comportamento térmico

As amostras das micropartículas obtidas a partir da cera e das misturas contendo 20, 30 e 40% de óleo de café foram submetidas a análises por calorimetria exploratória diferencial (DSC) no equipamento DSC 50 Shimadzu. Cada amostra foi pesada e selada em cadinho de alumínio. Estas foram submetidas a um

aquecimento de 10°C por minuto até atingir 150°C, em atmosfera de nitrogênio a 50 mL/min. Os dados obtidos foram avaliados com o software TA60 da Shimadzu.

4.4.6. Estudos Reológicos

Primeiramente foram realizados estudos de viscosidade em função da temperatura (através de uma rampa de aquecimento) de amostras contendo apenas cera de abelha e de misturas contendo 20, 30 e 40% de óleo de café verde. As misturas foram fundidas à 80°C e depois colocadas em reômetro modelo R/S-CPS (Brookfield Ltd, EUA) com sistema Peltier de controle de temperatura. As amostras foram submetidas a uma taxa de cisalhamento constante de 1.000s⁻¹ e gap de 0,05mm. A análise foi dividida em 8 passos de um minuto, onde em cada passo ocorriam 10 medições e decréscimo de 5°C na temperatura.

Em seguida, foram realizados estudos reológicos das amostras contendo apenas cera de abelha e de misturas contendo 20, 30 e 40% de óleo de café verde. As misturas foram fundidas à 80°C e depois colocadas em reômetro modelo R/S-CPS (Brookfield Ltd, EUA) com sistema Peltier de controle de temperatura. As amostras foram submetidas a uma taxa de cisalhamento constante de 0 a 200 s⁻¹ e de 200 a 0s⁻¹, gap de 0,05mm e temperatura constante de 80°C. A análise foi realizada em sextuplicata e dividida em 2 passos de um minuto, onde em cada passo ocorriam 20 medições. Para a análise dos resultados foram observadas as viscosidades no ponto máximo de cisalhamento.

4.4.7. Estudo da atividade fotocatalítica

Este estudo foi realizado no laboratório de Terras Raras do Professor Osvaldo Antonio Serra, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, com o auxílio de sua aluna de doutorado Juliana Fonseca de Lima. Para esta análise foi utilizado o método da determinação condutométrica com irradiação de luz, através de uma adaptação do RANCIMAT (Metrohm, Reino Unido). Neste estudo, o método avalia o comportamento das amostras na presença de um óleo, no caso o óleo de rícino, fluxo de ar, calor, agitação e luz.

Um sistema foi montado para simular, de maneira eficaz, o RANCIMAT, conforme ilustrado na Figura 17. Para esta análise foram utilizados: lâmpada de xenônio (Xenarc D-H4R-35W); condutivímetro C708 ANALION; célula C801/01. Foram pesados 40mg de amostra e adicionado 3,0mL de óleo de rícino, a mistura foi

mantida a 120⁰C com fluxo de ar e irradiação de luz com uma lâmpada de xenônio.



Figura 17. Sistema para simular o Rancimat, sendo: (1) lâmpada de xenônio; (2) óleo de rícino com ou sem amostra; (3) água; (4) condutivímetro.

Os produtos voláteis de oxidação formados foram transferidos, pela vazão de ar empregada, para um frasco contendo água destilada (17mL), a condutância foi monitorada por 7 horas e em tempos determinados a condutividade foi registrada.

O índice de atividade fotocatalítica foi calculado pela seguinte equação:

$$I_{afc} = \frac{(\sigma_{amostra} - \sigma_{branco})}{\sigma_{branco}} \quad \text{onde: } \sigma = \text{condutância } (\mu\text{S cm}^{-1})$$

4.4.8. Caracterização cromatográfica do OCV

A caracterização cromatográfica do OCV puro foi feita através da preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos a partir dos triglicerídeos presentes neste óleo. Para isso foi utilizada a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) aplicada a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos com 8 ou mais átomos de carbono, através de reações de hidrólise seguidas de reações de esterificação.

Para esse procedimento foi pesado 100mg do óleo de café verde em tubo falcon seguido pela adição de 3mL de n-hexano, para a solubilização da amostra. Após solubilização, foram adicionados 4mL de uma solução 0,5M de hidróxido de sódio e aquecido em banho de água com temperatura entre 65 e 70°C por 3 minutos. O tubo foi resfriado em água corrente e então adicionado 5mL da solução esterificante, contendo cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico. O tubo foi fechado, agitado por 30 segundos e aquecido novamente por 5 minutos. Em seguida, resfriou-se rapidamente o tubo em água corrente e adicionou-se 4mL de uma solução saturada de cloreto de sódio. O tubo foi agitado vigorosamente por 30 segundos em agitador tipo vortex. Finalizando, foram adicionados 3mL de n-hexano e o tubo foi novamente agitado em vortex por mais 30 segundos. Os tubos foram deixados em suportes adequados para que ocorresse a separação das fases. A fase superior formada foi retirada para a análise por cromatografia gasosa.

Para a análise cromatográfica foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado à espectrometro de massa, GC-MS GCT Premier (Waters), utilizando coluna HP5 MS de 30m de comprimento, 0,25mm de espessura e 0,25µm de diâmetro interno.

As análises foram feitas nas seguintes condições:

- Temperatura inicial em 130°C, com aumentos de 10°C por minuto até atingir 230°C, mantendo esta temperatura por 5 minutos. Após esse tempo foram feitos aumentos de 20°C por minuto até atingir 280°C, onde se manteve por mais um minuto.
- Tempo total de análise: 18,5 minutos
- Temperatura do injetor: 250°C
- Split 20
- Injetor automático: 1µL de amostra
- Fluxo 1mL/min
- Faixa de massa molar: 40 a 450 g/mol

- Delay: 6 minutos

A cromatografia gasosa com a espectroscopia de massa constitui uma técnica analítica altamente sensível, que pode dispensar o uso de padrões, uma vez que a comparação dos espectros de massas é feita com o auxílio de bancos de dados espectrais via computador (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; TABOSA *et al.*, 2000; MENDHAM, 2002). Dessa forma, a caracterização do OCV neste trabalho foi feita sem a utilização de padrões.

4.4.9. Quantificação de OCV nas micropartículas

Para a verificação da quantidade de OCV presente em cada lote de micropartículas derivados dos experimentos fatoriais, foram realizadas análises por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa.

As 15 amostras do planejamento experimental foram analisadas por cromatografia gasosa seguindo as mesmas condições e metodologia descrita para a caracterização do OCV.

Esta análise foi feita através de uma quantificação relativa entre os resultados obtidos para concentrações conhecidas das misturas contendo CA/OCV e aqueles obtidos para os lotes de micropartículas que foram produzidas. Para isso, uma curva analítica foi preparada com os resultados obtidos das áreas do pico do ácido linoleico presente no OCV, nas amostras contendo concentrações conhecidas de cera de abelha e OCV, sendo estas feitas em triplicata. Estas foram preparadas e analisadas nas mesmas condições descritas no item 4.4.8.

O uso do ácido linoleico como parâmetro de comparação justifica-se pelo fato deste não ter sido observado, em concentrações detectáveis, na cera de abelha.

4.4.10. Estabilidade Preliminar

Foram realizados testes de estabilidade preliminar, seguindo as normas da ANVISA (2004) para produtos cosméticos.

Para o teste de estabilidade, foram pesadas 500mg de cada amostra e acondicionadas em frascos de vidro transparente com batoque e tampa de rosca, para garantir boa vedação. As amostras ocuparam parte do frasco, não completando o seu volume total, para assim permitir possíveis trocas gasosas.

Este estudo teve duração de 15 dias e submetidas a condições de estresse, visando acelerar possíveis sinais de instabilidade (ANVISA, 2004). Este estresse foi

feito submetendo as amostras à ciclos alternados de aquecimento em estufa e resfriamento em refrigerador.

As condições adotadas foram:

- Temperatura estufa: $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Temperatura refrigerador: $-7 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Ciclos de 24 horas
- Total de 15 dias

Para avaliar a estabilidade das micropartículas foram feitos estudos cromatográficos seguindo as condições e metodologia descrita para a caracterização do OCV.

Uma amostra de OCV foi pesada e mantida nas mesmas condições, a fim de comparar a estabilidade das micropartículas com o OCV líquido e puro.

4.4.11. Forma de análise dos resultados

Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância por superfície de resposta aplicada às variáveis dos planejamentos experimentais utilizados. Foi utilizado o software *Statística*[®] (Statsoft, EUA) módulo *Visual General Linear Model*, com o objetivo de verificar as condições operacionais para a produção dos sistemas micro e nanoestruturados, sendo considerados como valores significantes aqueles em que $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Preparo das micropartículas do óleo de café verde por *spray congealing*

O rendimento do processo foi determinado pela razão entre a massa de micropartículas obtidas e a massa das misturas de cera de abelha e óleo de café verde, dados em porcentagem. Os rendimentos variaram de 21 a 32% e são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Rendimento do processo

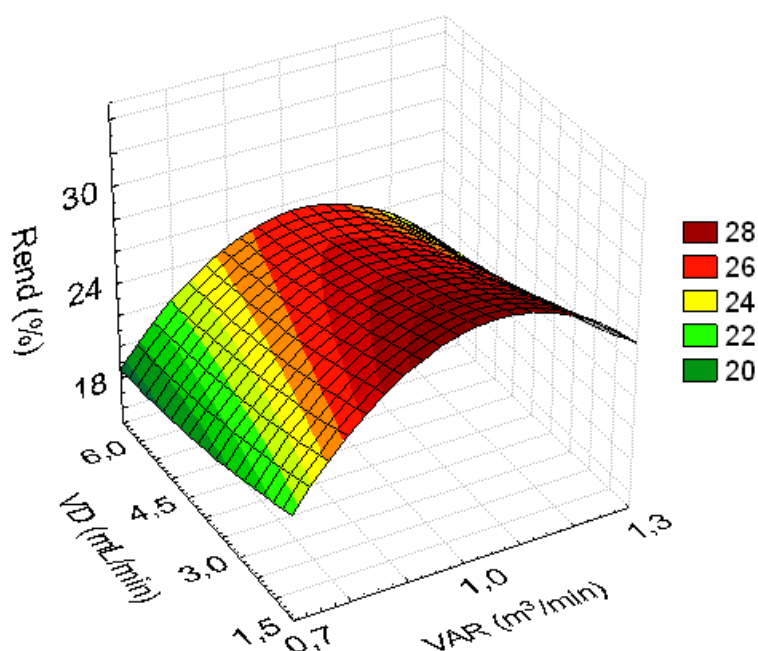
EXP	VD (mL/min)	VAR (m ³ /min)	C (%)	Rend (%)
1	2	0,75	30	23,3
2	6	0,75	30	21,3
3	2	1,25	30	27,6
4	6	1,25	30	24,4
5	2	1,00	20	26,0
6	6	1,00	20	21,7
7	2	1,00	40	29,9
8	6	1,00	40	27,0
9	4	0,75	20	21,2
10	4	1,25	20	23,6
11	4	0,75	40	21,0
12	4	1,25	40	21,2
13	4	1,00	30	23,5
14	4	1,00	30	32,0
15	4	1,00	30	29,2

A análise de variância (ANOVA) não mostrou diferença significativa para a análise das variáveis com relação ao rendimento do processo. Estes dados podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8. Nível de significância dos rendimentos obtidos

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
VD	0,38610	1	0,38610	0,033106	0,862768
VD²	0,09256	1	0,09256	0,007937	0,932469
VAR	67,66621	1	67,66621	5,802116	0,060957
VAR²	66,43103	1	66,43103	5,696204	0,062645
C	16,72945	1	16,72945	1,434486	0,284709
C²	18,55410	1	18,55410	1,590943	0,262838
VD*VAR	0,36000	1	0,36000	0,030869	0,867428
VD*C	0,49000	1	0,49000	0,042016	0,845673
VAR*C	1,21000	1	1,21000	0,103753	0,760403
Error	58,31167	5	11,66233		

A Figura 18 mostra o gráfico de superfície de resposta do rendimento em função da vazão de dispersão (VD) e a vazão do ar de resfriamento (VAR). Para este estudo são considerados significantes os valores obtidos com $p < 5\%$, dessa forma, apesar dos valores para VAR não terem apresentado diferenças significativas, pelo gráfico de superfície podemos observar uma tendência para um aumento de rendimento com um valor intermediário de VAR ($1\text{m}^3/\text{min}$).

**Figura 18.** Gráfico de superfície de resposta do rendimento em função da vazão do ar de resfriamento (VAR) e vazão de dispersão (VD).

Os rendimentos ficaram abaixo de 35% provavelmente devido às propriedades aderentes da cera de abelha com a associação do OCV. Assim como observado por Qiyun (2008), o baixo rendimento do processo também pode ter sido causado pelas gotas que aderiram à parede da câmara antes de serem solidificadas. Isso indica que as mesmas não foram rapidamente e/ou suficientemente resfriadas antes de entrarem em contato com a superfície da câmara, levando a uma perda considerável de material. Dessa forma, o sucesso do processo de microencapsulação por *spray congealing* é altamente dependente da capacidade de solidificação da mistura fundida. Outro fator importante, que deve ser considerado para a técnica de *spray congealing*, é a reologia das ceras e de suas misturas com os ativos, esta pode afetar o tamanho das gotículas formadas na atomização e também a adesão destas nas paredes da câmara, pois viscosidades mais altas no momento da colisão podem aumentar esta adesão e conseqüentemente, diminuir o rendimento. A reologia pode afetar também a morfologia das micropartículas, conforme será discutido no item 5.3.

Outro fator que pode influenciar no rendimento desta técnica é a quantidade de pós muito finos que podem ser encaminhados para a tubulação de escape do ciclone de separação ao invés de serem coletadas no frasco (QIYUN, 2008).

Segundo Elkordy, Essa (2010), baixos rendimentos podem ser aceitáveis quando consideramos a escala laboratorial. Equipamentos de pequena escala podem resultar em adesão das partículas na câmara e o ciclone de separação pode não ser capaz de prender partículas pequenas.

5.2. Determinação do teor de umidade

O teor de umidade é um indicador de qualidade de materiais secos. De um modo geral, são aceitos teores de umidade abaixo de 5%. Estes valores garantem uma diminuição significativa do crescimento microbológico e das reações de degradação química, o que promove maior estabilidade do material (PAGLIARUSSI; BASTOS; FREITAS, 2006).

No estudo de teor de umidade os valores obtidos variaram entre 0,39 e 0,79%, no entanto o tratamento estatístico (ANOVA) não mostrou significância, ou seja, nenhuma das variáveis estudadas influenciaram os valores de teor de umidade, como mostra a Tabela 9.

Tabela 9. Tratamento estatístico para o teor de umidade

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
VD	0,029811	1	0,029811	1,819402	0,235252
VD²	0,000283	1	0,000283	0,017253	0,900619
VAR	0,019857	1	0,019857	1,211890	0,321111
VAR²	0,015006	1	0,015006	0,915824	0,382524
C	0,002723	1	0,002723	0,166176	0,700400
C²	0,003052	1	0,003052	0,186263	0,684021
VD*VAR	0,040000	1	0,040000	2,441257	0,178941
VD*C	0,016900	1	0,016900	1,031431	0,356419
VAR*C	0,005625	1	0,005625	0,343302	0,583379
Error	0,081925	5	0,016385		

Já era esperado que o resultado dos parâmetros analisados não seriam significantes, uma vez que o processo de obtenção dos microparticulados por *spray congealing* não utilizam solventes aquosos. Porém, o estudo foi realizado, pois o teor de umidade poderia ter sido modificado pela variação da umidade relativa do ar no processo e por possíveis propriedades higroscópicas dos constituintes do produto final.

5.3. Morfologia das MLSs

A Figura 19 mostra as fotomicrografias das MLSs com 20, 30 e 40% de OCV e cera de abelha pura, produzidas nas mesmas condições experimentais, com VD de 2mL/min e VAR de 1m³/min.

As MLSs contendo apenas cera de abelha apresentaram-se um pouco agregadas com morfologia esférica e levemente rugosa (Figura 19a). Já as MLSs contendo 20% de óleo de café verde apresentaram maior agregação e um maior nível de irregularidade na sua superfície (Figura 19b), o que comprometeu parcialmente seu formato esférico. Isso também foi observado nas MLSs contendo 30 e 40% de óleo de café verde (Figura 19c e 19d, respectivamente).

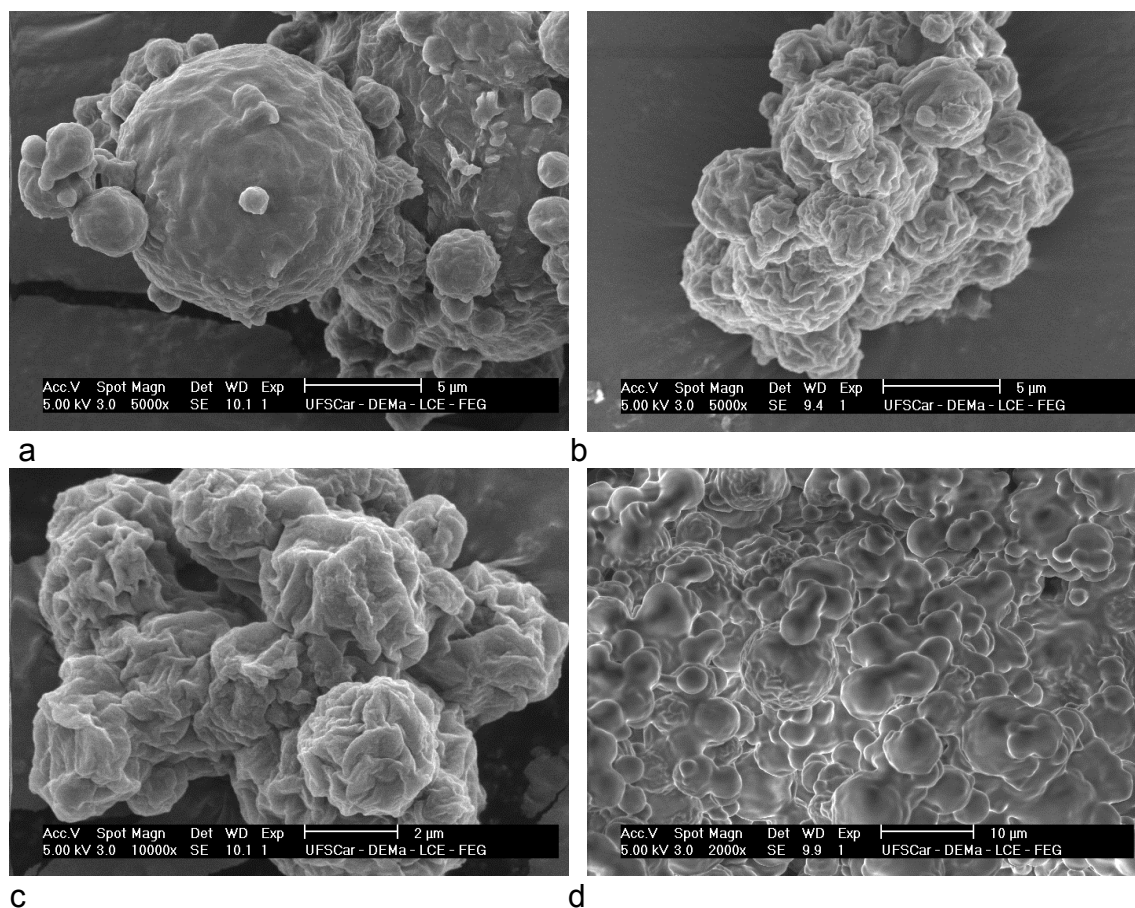


Figura 19. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas contendo apenas CA (a), 20% OCV (b), 30% OCV (c) e 40% OCV (d).

A maior agregação entre as partículas e a maior deformidade na sua superfície pareceu ser proporcional ao aumento da concentração do óleo de café verde adicionado em cada preparação.

A morfologia das micropartículas depende das forças de contração durante a secagem das gotas e da viscosidade do material líquido. O enrugamento e o aparecimento de dobras nas micropartículas podem ser decorrentes de forças de contração irregular durante o processo de secagem. A viscosidade do material líquido é um parâmetro importante na determinação da morfologia das micropartículas. O aumento da viscosidade do material líquido atomizado aumenta a tendência do enrugamento ou aparecimento de dobras nas micropartículas formadas (RAFFIN *et al.*, 2006; FOSTER; LAETHERMAN 1995). Essas dobras ou enrugamento das micropartículas podem ser observadas nas Figuras 20a, 20b, 20c. O aumento da concentração de OCV aumenta a viscosidade do material líquido atomizado e conseqüentemente aumenta a deformidade nas micropartículas. Estas dobras menos pronunciadas nas micropartículas contendo apenas cera de abelha

(Figura 20d), pode ser devido ao fato destas apresentarem uma menor viscosidade quando comparadas àquelas contendo misturas de OCV e CA, considerando a temperatura da mistura fundida (80°C).

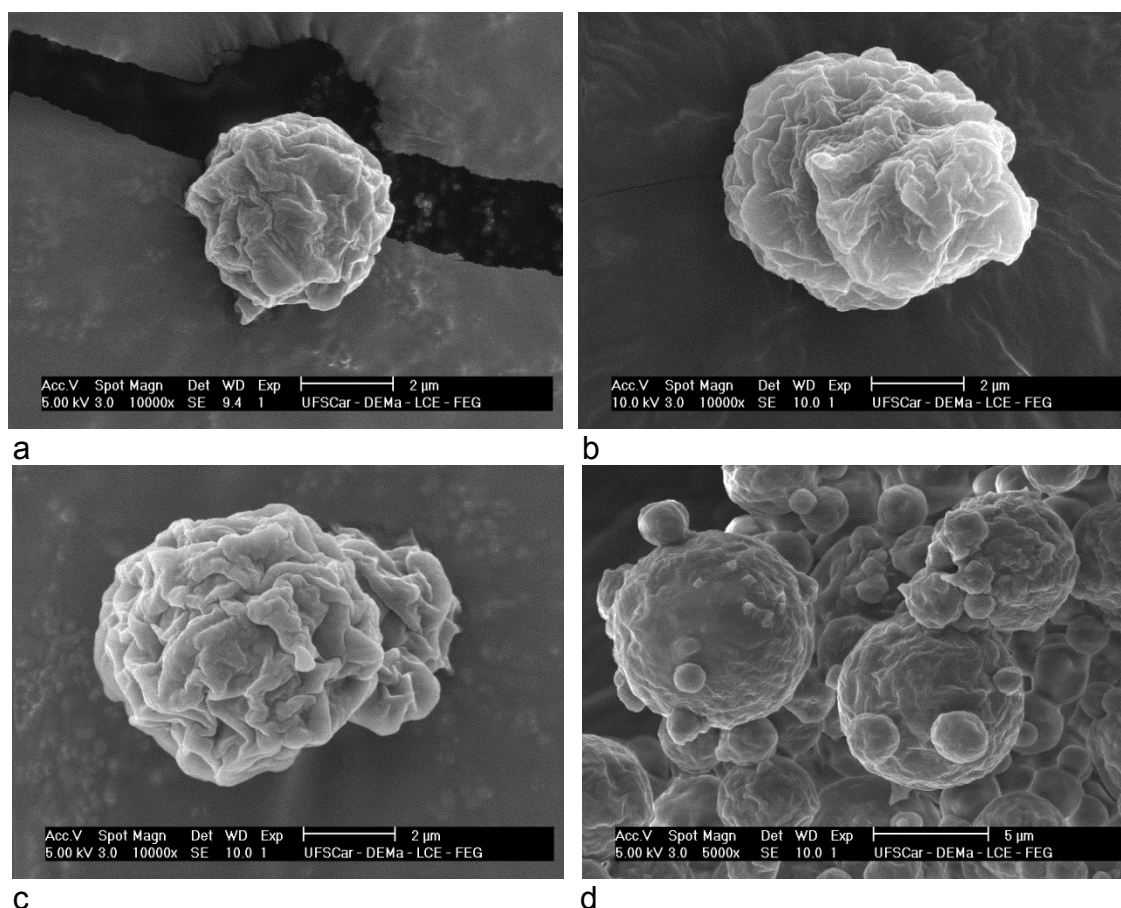


Figura 20. Fotomicrografias das micropartículas contendo 20% OCV (a), 30% OCV (b), 40% OCV (c), apenas CA (d).

A viscosidade crítica para evitar o surgimento de dobras ou enrugamento das micropartículas pode ser determinada, se esta for considerada como parâmetro necessário (FOSTER e LAETHERMAN 1995).

A presença de fissuras, rachaduras, poros ou rompimentos pode comprometer a proteção das substâncias ativas (SANTOS; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2005). As micropartículas formadas pela mistura de OCV e CA apresentaram dobras ou enrugamento em sua superfície, porém não apresentaram fissuras ou poros, o que é fundamental para garantir menor permeabilidade de gases e conseqüentemente uma maior proteção da substância ativa.

5.4. Determinação do tamanho e da distribuição das micropartículas

A distribuição de tamanho das micropartículas é um fator importante no controle da liberação e também na proteção da substância ativa. Quanto menor for o seu diâmetro, maior será a superfície de contato e conseqüentemente mais rápida será a liberação do ativo.

A análise de tamanho de partículas por difração a laser é rápida, fácil de operar e de ampla leitura. Neste método, as partículas são dispersas num fluido em movimento o que causa descontinuidade no fluxo do fluido, que é detectada por uma luz incidente e correlacionada com o tamanho de partícula. Ao atingir a partícula, a luz incidente sofre diferentes fenômenos (reflexão, difração, absorção e refração) formando um invólucro de luz tridimensional (PAPINI; LEAL NETO, 2006).

Uma das principais influências sobre o tamanho de micropartículas está associada com a viscosidade do líquido. As misturas de menor viscosidade resultam em tamanhos menores de partículas, enquanto que as de maior viscosidade resultam em partículas de tamanhos maiores (ILIC *et al.*, 2009). Desta forma, conforme observado na Tabela 10, o aumento da concentração de OCV fez aumentar o diâmetro médio (d50) das micropartículas.

Tabela 10. Valores obtidos para d50 e suas respectivas variáveis feitas no planejamento.

EXP	VD	VAR	C	d50
1	2	0,75	30	88
2	6	0,75	30	75,28
3	2	1,25	30	58,78
4	6	1,25	30	100,1
5	2	1	20	51,41
6	6	1	20	112,2
7	2	1	40	94,93
8	6	1	40	100,8
9	4	0,75	20	74,08
10	4	1,25	20	77,56
11	4	0,75	40	140,1
12	4	1,25	40	112,7
13	4	1	30	72,28
14	4	1	30	81,93
15	4	1	30	63,92

A análise de variância do tamanho médio das micropartículas (d50) mostrou que, dentre as variáveis estudadas, apenas a concentração de OCV foi significativa a

5%, apresentando um efeito linear e quadrático, conforme dados da Tabela 11.

Tabela 11. Análise de variância do tamanho médio das micropartículas contendo OCV.

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
Intercept	15860,23	1	15860,23	80,34795	0,000288
VD	1134,31	1	1134,31	5,74641	0,061837
VD ²	10,96	1	10,96	0,0555	0,823103
VAR	100,25	1	100,25	0,50788	0,507925
VAR ²	336,92	1	336,92	1,70686	0,248258
C	2220,44	1	2220,44	11,24877	0,020242
C ²	1311,61	1	1311,61	6,64463	0,049569
VD*VAR	730,08	1	730,08	3,69859	0,11247
VD*C	754,05	1	754,05	3,82003	0,108047
VAR*C	238,39	1	238,39	1,2077	0,321865
Erro	986,97	5	986,97		

O gráfico de superfície (Figura 21) mostra que com o aumento da concentração do óleo de café verde as micropartículas apresentaram um maior tamanho. Os resultados variaram de aproximadamente 50 a 140 μ m. No gráfico observa-se também o aumento do tamanho de partícula conforme o aumento da vazão de dispersão (VD), porém a análise de variância não mostrou significância. Neste trabalho é considerado como valor significativo aquele que obter $p < 5\%$.

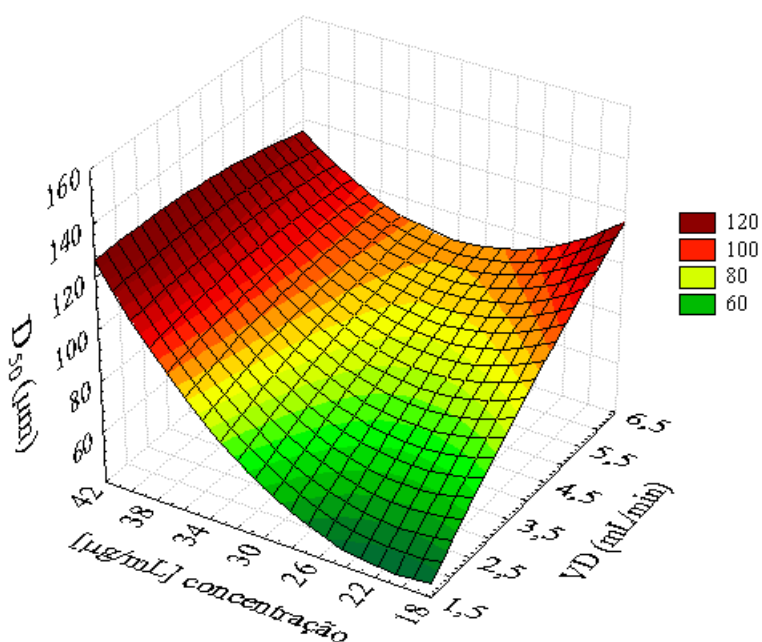


Figura 21. O gráfico de superfície mostra que com o aumento da vazão de dispersão e da concentração do óleo houve um aumento no tamanho das micropartículas.

Uma vez que apenas a concentração de OCV ofereceu diferenças significativas para d_{50} , foram feitas as médias dos valores obtidos para o volume diferencial das partículas, para cada concentração (20, 30 e 40% de OCV), a fim de melhorar a visualização desta diferença no gráfico de distribuição do tamanho da partícula (Figura 22).

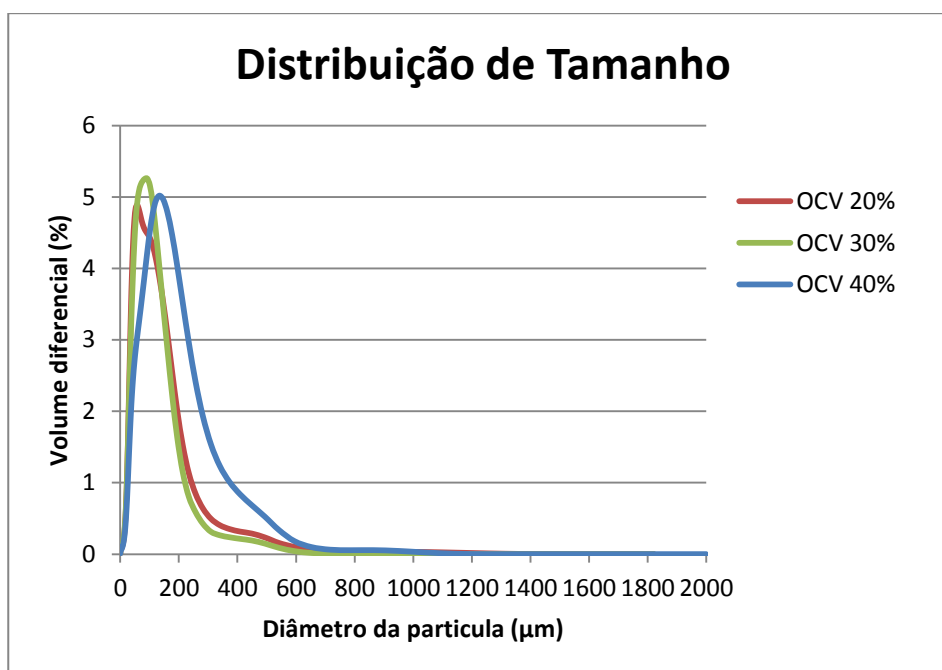


Figura 22. Distribuição do tamanho de partículas, nas diferentes concentrações de OCV.

O aumento da concentração de OCV aumentou o tamanho médio das micropartículas. As micropartículas contendo 40% de OCV além de apresentarem o maior d_{50} , também mostraram uma maior variação na distribuição granulométrica.

O tamanho das partículas é um dos fatores que influencia a penetração da substância ativa através da pele. Os ativos podem transpor as barreiras do extrato córneo de três maneiras: (1) permeação transfolicular, que é feita através dos folículos pilosos; (2) permeação transcelular, é feita de forma direta através das células cornoas e da matriz lipídica intracelular; (3) permeação intercelular, onde as substâncias difundem-se ao redor das células cornoas.

Dessa forma, a determinação do tamanho das partículas é um dos muitos parâmetros que devem ser estudados para poder determinar se o produto aplicado na pele terá ação local ou sistêmica.

De acordo com Toll *et al.* (2004) e Schaefer *et al.* (1990), as micropartículas

maiores que $10\mu\text{m}$ permanecem na porção superficial da pele. Dessa forma, considerando apenas o diâmetro médio das micropartículas produzidas neste trabalho, que variaram entre 50 e $140\mu\text{m}$, provavelmente elas não tenham a capacidade de penetrar na pele, ficando apenas em sua superfície. Isto demonstra que seu tamanho é adequado à finalidade proposta neste trabalho, de liberação do OCV na superfície da pele, já que não se objetivou a penetração cutânea.

5.5. Estudo do comportamento térmico

Na Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) a substâncias analisada e um material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura, permitindo a avaliação das variações entálpicas que ocorrem (IONASHIRO, 2005).

Através do DSC qualquer fenômeno físico ou químico que provoque variações de entalpia pode ser detectado. Nos gráficos a representação é feita através de picos ascendentes para eventos exotérmicos, e descendentes para eventos endotérmicos (CARVALHO FILHO, 2000).

Desta forma, a técnica de DSC foi utilizada para detectar possíveis interações entre a cera de abelha e o óleo de café verde, através da análise das micropartículas contendo apenas cera de abelha e daquelas contendo cera mais 20, 30 e 40% de óleo de café verde.

A Figura 23 mostra o perfil calorimétrico de todas as amostras analisadas.

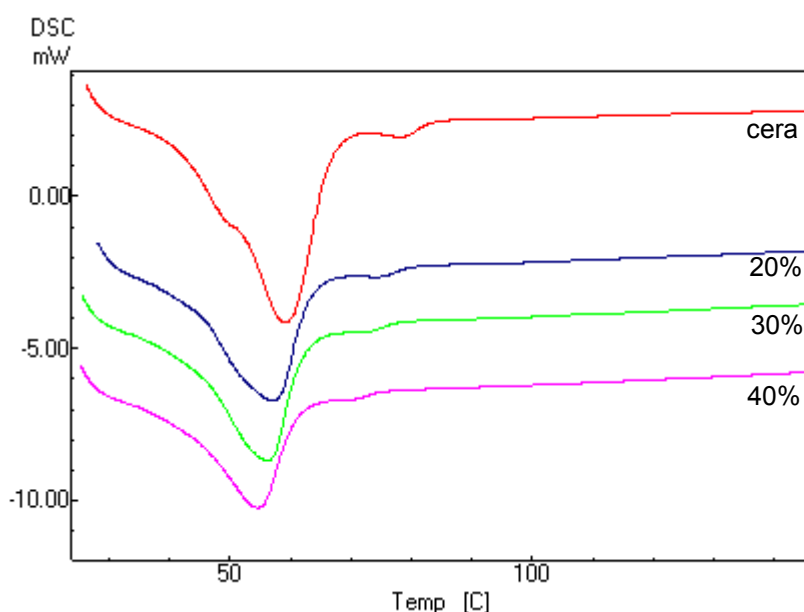


Figura 23. Perfil calorimétrico das micropartículas contendo apenas cera de abelha e daquelas contendo cera mais 20, 30 e 40 % de óleo de café verde.

Os termogramas mostraram de maneira geral um evento endotérmico aproximadamente na faixa de 30 a 60°C, com pico de fusão em torno de 50 a 55°C.

De acordo com o perfil calorimétrico houve uma pequena diminuição no ponto de fusão das misturas quando comparadas a cera de abelha pura. Houve também um alargamento do pico que foi maior conforme o aumento da concentração do óleo de café verde. Através destes eventos pode-se observar a influência de impurezas no perfil calorimétrico dos materiais.

Métodos calorimétricos têm sido muito empregados para avaliar o grau de pureza das substâncias (HAYS, 2005). A cera de abelha é composta por várias substâncias, isto pode ser observado em seu pico que apresenta uma larga faixa de fusão. Quando se adiciona o óleo de café verde pode-se observar um alargamento maior do pico e uma diminuição no ponto de fusão o que mostra o aumento da quantidade de impurezas adicionadas ao material.

Na Tabela 12 estão os pontos de fusão de cada amostra e a respectiva variação de entalpia (ΔH). A entalpia é uma grandeza física capaz de mensurar a máxima energia removida, na forma de calor, de um sistema termodinâmico. As variações de entalpia nos sistemas podem ser mensuradas através da medida do calor absorvido ou liberado pelo sistema.

Tabela 12. Variações de entalpia a fusão das micropartículas contendo 20, 30 e 40% de OCV e naquelas contendo apenas CA.

	Ponto de Fusão (°C)	ΔH (J/g)
Cera Abelha	59,04	-134,67
20%	57,01	-108,28
30%	56,17	-98,97
40%	54,55	-83,51

Como visto anteriormente o aumento da concentração de OCV diminui o ponto de fusão da mistura. Sendo assim, quanto maior a concentração de OCV menor será a quantidade de energia recebida para sua fusão do sistema.

5.6. Estudos Reológicos

De acordo com a Figura 24 observa-se que a cera de abelha começa a solidificar em torno de 59°C, enquanto que as misturas iniciam a solidificação em torno de 56°C.

Assim como no estudo do comportamento térmico feito por DSC, pode-se observar a diminuição do ponto de fusão da cera de abelha quando o óleo de café verde é adicionado. Conforme visto anteriormente a presença de impurezas levou a uma diminuição do ponto de fusão.

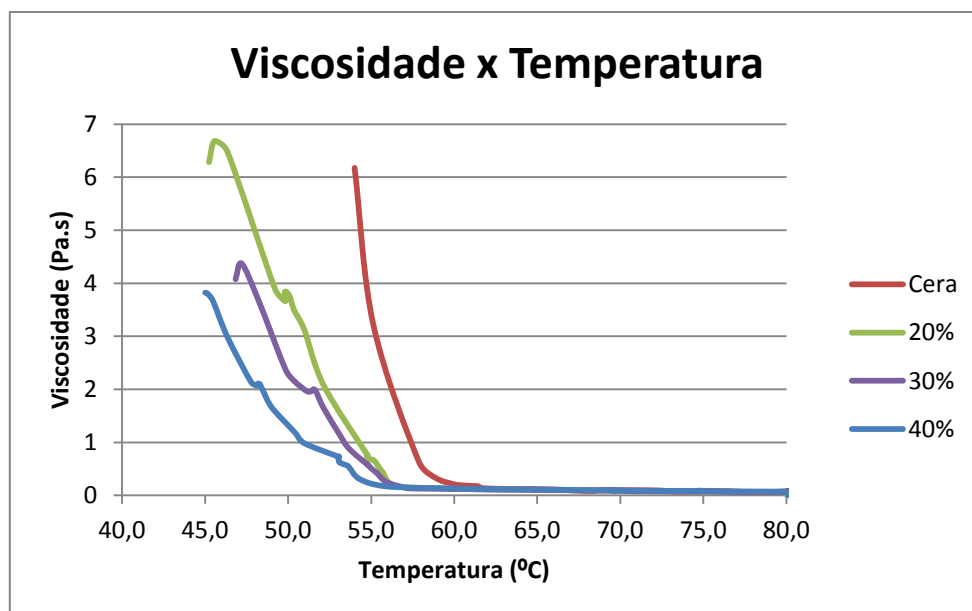


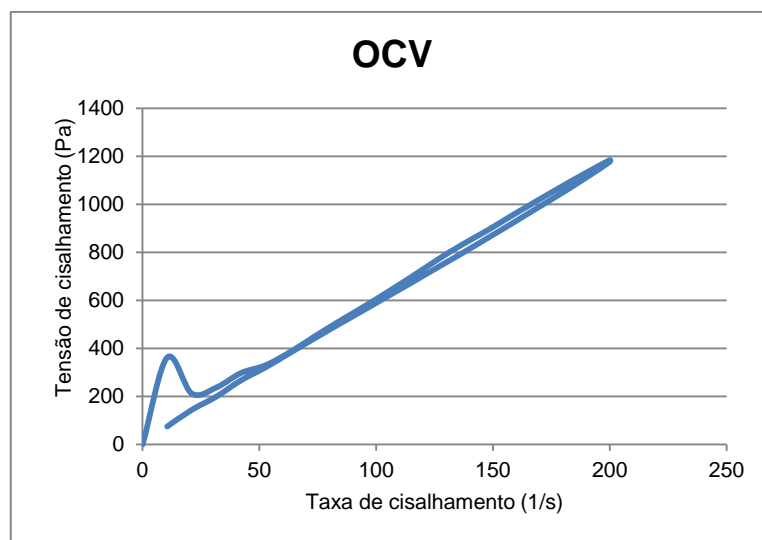
Figura 24. Gráfico de viscosidade x temperatura das misturas fundidas à 80°C.

A solidificação da cera de abelha acontece mais rapidamente do que as misturas contendo OCV. Após a solidificação, as misturas apresentam viscosidades menores conforme adições maiores de OCV.

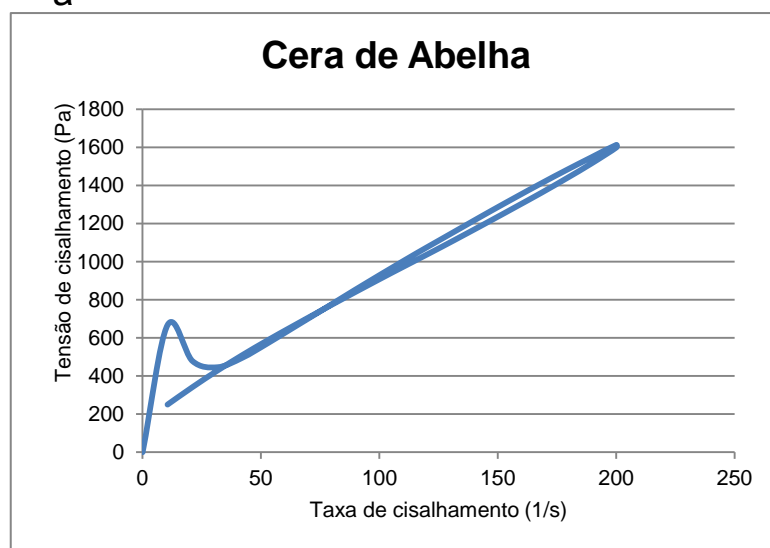
Como visto, a viscosidade do material fundido interfere na formação das micropartículas. Estas interferências podem alterar o tamanho e a morfologia destas partículas. Diante disso o estudo da viscosidade e do comportamento de fluidez das misturas é de fundamental importância para a compreensão dos resultados.

A reologia estuda o escoamento e a deformação de uma matéria. O comportamento de fluidez de alguns produtos pode ser diferente, dependendo de alguns fatores como a temperatura e o cisalhamento. O estudo reológico da cera de abelha é complexo e muito dependente da temperatura, uma vez que o seu estado pode ser sólido, em temperaturas menores que 62°C, ou líquido acima de 67°C.

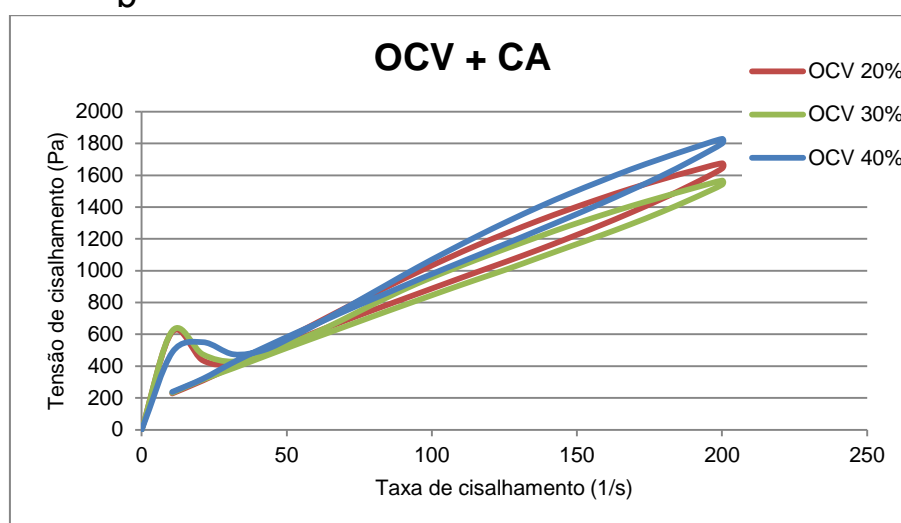
Os reogramas obtidos estão ilustrados na Figura 25, onde 25a é a amostra contendo apenas OCV, 25b amostra contendo apenas cera de abelha e na figura 25c estão os reogramas das misturas contendo 20, 30 e 40% de OCV.



a



b



c

Figura 25. Reogramas das amostras contendo apenas OCV, apenas CA e das misturas contendo 20, 30 e 40% de OCV, à temperatura de 80°C.

Nos reogramas pode-se observar que, na temperatura de 80°C, todas as amostras analisadas apresentam uma tensão de deformação inicial (*yield stress*), que é a tensão mínima exigida para que o material comece a fluir. Após começar a fluir as amostras contendo apenas cera de abelha e apenas óleo de café verde, apresentam um comportamento Newtoniano, uma vez que sua viscosidade permanece constante, independente da taxa de cisalhamento. Por outro lado, as amostras contendo as misturas de CA e OCV apresentaram viscosidade dependente do tempo, mostrando uma leve tixotropia, onde as leituras ascendentes foram diferentes das leituras descendentes, ou seja, a viscosidade decresce com o tempo.

Os valores obtidos em sextuplicata para as viscosidades no ponto máximo de cisalhamento para todas as amostras estão na Tabela 13, assim como a respectiva média e desvio padrão.

Tabela 13. Viscosidade das amostras no ponto máximo de cisalhamento

	1	2	3	4	5	6	Média	Desvio
20%	8,56	7,91	8,36	8,56	8,54	8,32	8,38	0,25
30%	6,87	7,57	8,11	8,36	7,91	8,17	7,83	0,54
40%	9,14	9,29	8,24	9,29	9,34	9,56	9,14	0,46
CA	8,80	7,34	7,65	8,94	7,32	8,35	8,06	0,72
OCV	4,10	5,07	7,18	6,88	6,58	5,73	5,92	1,18

Observa-se um aumento da viscosidade das misturas contendo CA e OCV em comparação às amostras puras, contendo apenas CA e apenas OCV. Na Figura 26 está o gráfico em barras destas viscosidades.

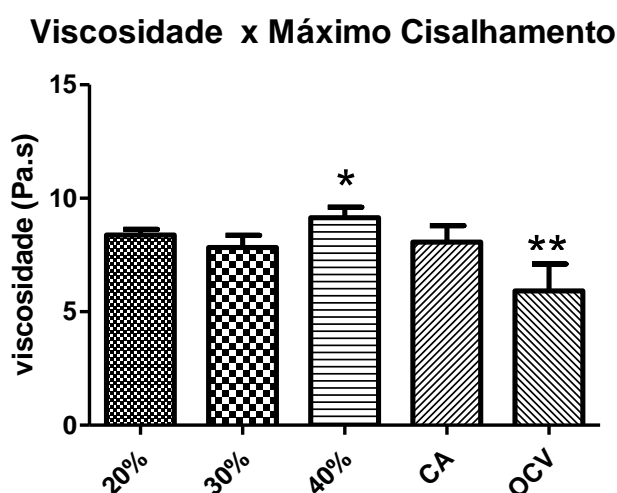


Figura 26. Viscosidades obtidas em máximo cisalhamento.

Segundo teste T, as amostras contendo 40% de OCV e apenas OCV apresentaram diferença significativa em comparação a todas amostras, conforme dados da Tabela 14.

Tabela 14. Diferenças significativas entre os valores de viscosidade obtidos em cisalhamento máximo.

	P value	Diferença significativa (P < 0.05)
20% x 30%	0,0727	Não
20% x 40%	0,0169	Sim
20% x CA	0,2753	Não
20% x OCV	0,0034	Sim
30% x 40%	0,0070	Sim
30% x CA	0,5712	Não
30% x OCV	0,0016	Sim
40% x CA	0,0185	Sim
40% x OCV	0,0027	Sim
CA x OCV	0,0182	Sim

Esses resultados mostram um aumento significativo da viscosidade da mistura contendo 40% de OCV. Como visto anteriormente, o aumento na viscosidade pode influenciar algumas características na formação das micropartículas, como por exemplo o tamanho e a morfologia.

Dessa forma, o aumento da concentração de OCV na mistura fez com que esta apresentasse uma maior viscosidade e isto pode ter influenciado a formação das micropartículas, alterando seu tamanho e morfologia.

Segundo Aliseda *et al.* (2008), os processos que envolvem a atomização das amostras, como *spray drying* e *spray congealing*, são complexos e influenciados por muitos parâmetros. A distribuição do tamanho das gotículas atomizadas juntamente com os parâmetros operacionais do *spray* podem influenciar a morfologia da micropartícula formada.

Tanto o comportamento do fluido quanto a sua viscosidade, influenciam a formação das micropartículas, porém este é um estudo complexo que exige a avaliação de outras variáveis. Sendo assim, modelos podem ser desenvolvidos para avaliar as propriedades reológicas dos fluidos nas condições que mais se aproximam do processo de atomização (ALISEDA *et al.*, 2008).

Portanto, outros estudos reológicos aliados à previsão de modelos

matemáticos seriam necessários para avaliar as propriedades reológicas dessas misturas, nas mesmas condições em que foram atomizadas. Porém, os estudos feitos neste trabalho tiveram como objetivo avaliar a viscosidade das diferentes misturas e com isso verificar sua influência em outros parâmetros como o tamanho e a morfologia das micropartículas.

5.7. Atividade fotocatalítica

Neste estudo foram utilizadas as micropartículas contendo 20, 30 e 40% de OCV e cera de abelha pura, produzidas nas mesmas condições experimentais, com VD de 2mL/min e VAR de 1m³/min. Além de avaliar também o OCV puro.

A atividade fotocatalítica foi avaliada pela variação da condutividade da água na presença dos compostos voláteis, que são produtos da degradação do óleo de rícino, quando este foi submetido ao aquecimento e irradiação de luz.

A Figura 27 mostra uma análise comparativa da variação de condutividade da água na presença dos produtos de degradação do óleo de rícino (controle) na presença e ausência das substâncias avaliadas.

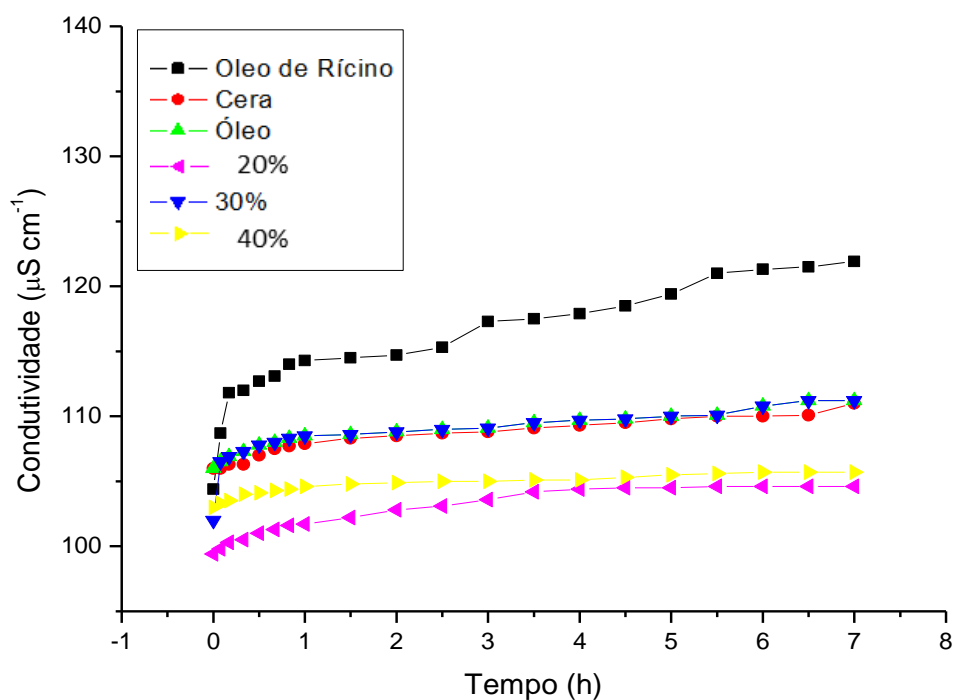


Figura 27. Gráfico da condutividade em função do tempo das amostras contendo somente CA; somente OCV; e as misturas contendo 20, 30 e 40% de OCV. Controle: óleo de rícino.

Nos primeiros minutos o óleo de rícino apresentou grande variação na condutividade, diferentemente das amostras analisadas que apresentaram uma menor variação na condutividade mantendo-se de forma constante em praticamente todo o intervalo de tempo estudado. Essa diminuição da condutividade indica uma menor formação de compostos voláteis produzidos na oxidação lipídica, o que pode indicar uma possível atividade antioxidante das amostras estudadas. Esta propriedade é observada uma vez que a adição das amostras contendo somente OCV, somente CA e as misturas contendo OCV e CA apresentaram menores valores de condutividade quando comparados ao óleo de rícino puro, indicando uma menor presença dos produtos voláteis de degradação na água. Observa-se também que os gráficos apresentam um perfil semelhante com relação à proteção do óleo de rícino contra a degradação

O aumento da degradação do óleo de rícino aumenta a atividade fotocatalítica e conseqüentemente aumenta a condutividade da água. Dessa forma, a atividade fotocatalítica é diretamente proporcional à condutividade medida.

Sendo assim pode-se dizer que todas as amostras agiram como antioxidante apresentando atividade fotocatalítica menor do que o óleo de rícino puro. Porém, apenas com os valores de condutividade da água não se pode determinar qual amostra apresentou melhor proteção para o óleo de rícino, uma vez que a condutividade inicial da água pode variar. Além disso, existem variações da condutividade em função do tempo. Dessa forma, a comparação deve ser feita analisando o grau de atividade fotocatalítica em função do tempo, sendo estimado pela mudança de condutância (σ) após algumas horas.

O índice de atividade fotocatalítica das amostras foi normalizado pela seguinte equação:

$$I_{afc} = \frac{(\sigma \text{ amostra} - \sigma \text{ branco})}{\sigma \text{ branco}} \quad \text{onde: } \sigma = \text{condutância}$$

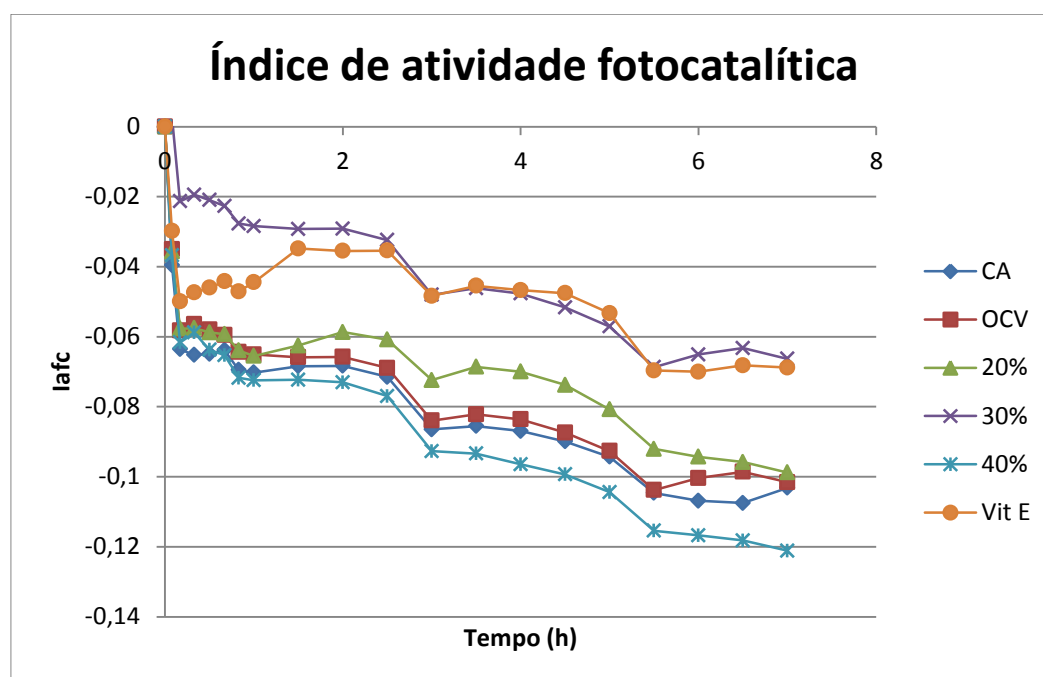
Usou-se como branco o óleo de rícino puro. Os resultados obtidos do índice de atividade fotocatalítica em função do tempo, com suas respectivas médias, estão descritos na Tabela 15, onde o menor I_{afc} indica a menor atividade fotocatalítica.

Tabela 15. Índice de atividade fotocatalítica em função do tempo e a média do índice para cada amostra.

Tempo (h)	1	2	3	4	5	6	7	Média
CA	-0,070	-0,068	-0,086	-0,087	-0,094	-0,107	-0,103	-0,088
OCV	-0,065	-0,066	-0,084	-0,084	-0,093	-0,100	-0,102	-0,085
20%	-0,065	-0,059	-0,072	-0,070	-0,081	-0,094	-0,099	-0,077
30%	-0,028	-0,029	-0,048	-0,048	-0,057	-0,065	-0,066	-0,049
40%	-0,072	-0,073	-0,093	-0,096	-0,104	-0,117	-0,121	-0,097
Vit E	-0,044	-0,035	-0,048	-0,047	-0,053	-0,070	-0,069	-0,052

Para comparar a ação antioxidante das substâncias estudadas neste trabalho, foi feita uma análise da atividade fotocatalítica da Vitamina E. Esta foi escolhida por ser um antioxidante lipossolúvel muito estudado e utilizado em produtos cosméticos.

A Figura 28 mostra o índice de atividade fotocatalítica em função do tempo das amostras contendo somente CA, somente OCV, das micropartículas contendo as misturas de CA com 20, 30 e 40% de OCV e também das amostras contendo a vitamina E, utilizada como referência.

**Figura 28.** Gráfico do índice de atividade fotocatalítica em função do tempo.

Com exceção da amostra contendo 30% de OCV, todas as outras apresentaram um índice de atividade fotocatalítica menor do que os valores obtidos para a vitamina E, indicando que, nessas condições, as amostras do presente estudo apresentaram uma melhor proteção do óleo de rícino contra a degradação. E

dentre as amostras estudadas, aquela contendo 40% de OCV apresentou a melhor atividade.

5.8. Caracterização cromatográfica do OCV

A caracterização do OCV puro foi feita através da preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos a partir dos triglicerídeos presentes neste óleo. Para isso foi utilizada a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) aplicada a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos com 8 ou mais átomos de carbono, através de reações de hidrólise seguidas de reações de esterificação. Em seguida as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa.

A Figura 29 mostra o cromatograma do óleo de café verde.

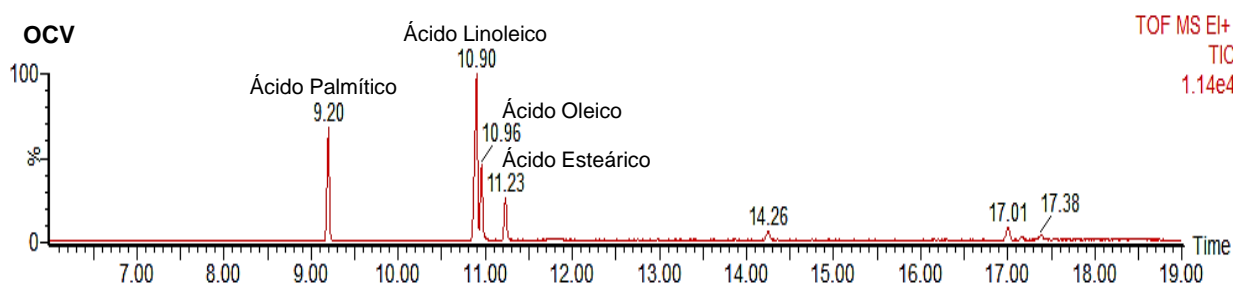


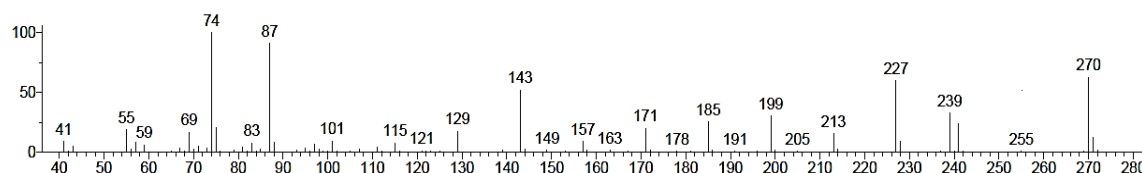
Figura 29. Cromatograma do OCV

A identificação dos picos foi feita por espectrometria de massa. Este método identifica os diferentes átomos que compõe uma substância, através do bombardeamento de uma substância com elétrons para produzir íons, ou átomos eletricamente carregados. A identificação e caracterização estrutural dos compostos em espectrometria de massa em geral, dependem da medição da massa do íon precursor, que será relacionada com uma molécula de forma conhecida (MCLUCKEY; MENTINOVA, 2011)

As Figuras 30, 31, 32, e 33 mostram respectivamente os espectros de massa obtidos para os picos 1, 2, 3 e 4. Estes foram comparados com espectros de massas pesquisados na biblioteca do equipamento. Em cada figura o primeiro espectro corresponde ao obtido na análise do OCV e o segundo corresponde ao espectro de massa pesquisado na biblioteca que apresentou maior semelhança com relação ao estudado.

Pico 1 – ácido hexadecanóico (ácido palmítico)

Unknown: G1 457 (9.186) Cm (457-(444+467))
Compound in Library Factor = -118



Hit 2 : Hexadecanoic acid, methyl ester
C17H34O2; MF: 780; RMF: 785; Prob 41.6%; CAS: 112-39-0; Lib: mainlib; ID: 35245.

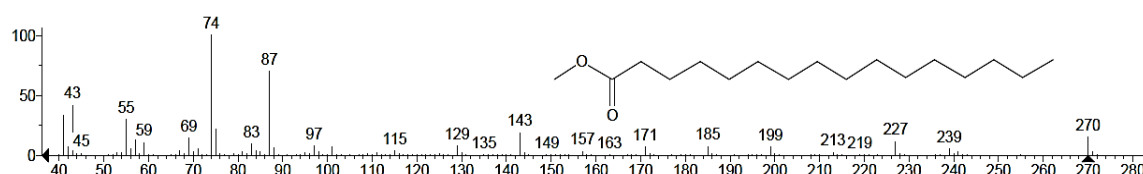
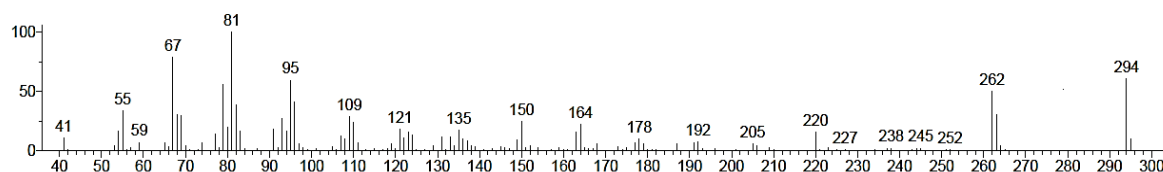


Figura 30. Comparação entre os espectros de massa do primeiro pico obtido no OCV com o encontrado na biblioteca.

Pico 2 – ácido octadecadienóico (ácido linoleico)

Unknown: G1 699 (10.880) Cm (699-(670+795))
Compound in Library Factor = -457



Hit 1 : 9,11-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)-
C19H34O2; MF: 806; RMF: 807; Prob 22.0%; CAS: 13038-47-6; Lib: mainlib; ID: 27108.

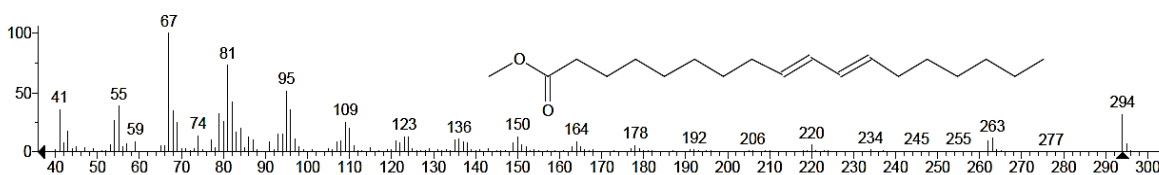
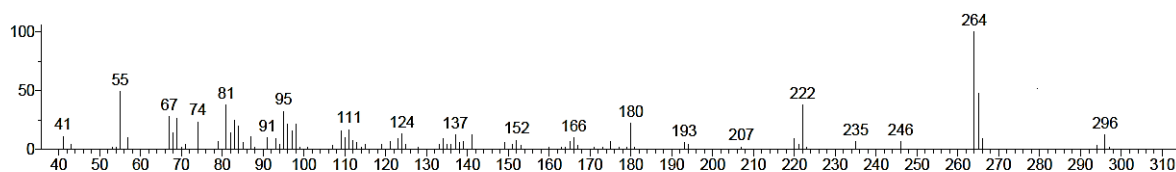


Figura 31. Comparação entre os espectros de massa do segundo pico obtido no OCV com o encontrado na biblioteca.

Pico 3 – ácido octadecenoico (ácido oleico)

Unknown: G1 707 (10.936) Cm (707-(673+827))
Compound in Library Factor = -709



Hit 1 : 9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-
C19H36O2; MF: 755; RMF: 758; Prob 18.9%; CAS: 1937-62-8; Lib: replib; ID: 26130.

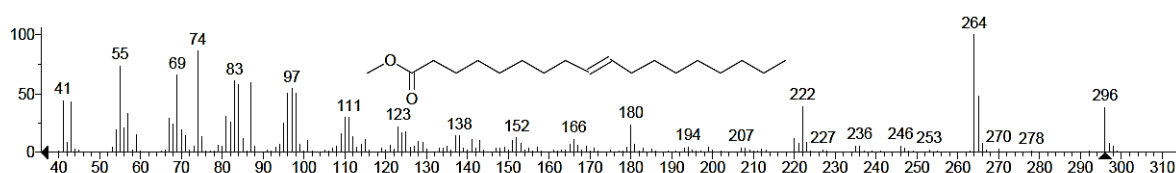
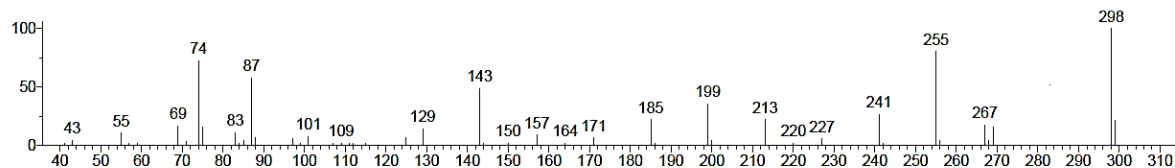


Figura 32. Comparação entre os espectros de massa do terceiro pico obtido no OCV com o encontrado na biblioteca.

Pico 4 – ácido octadecanoico (ácido esteárico)

Unknown: G1 748 (11.223) Cm (748-(733+758))
Compound in Library Factor = -270



Hit 1 : Octadecanoic acid, methyl ester
C19H38O2; MF: 736; RMF: 741; Prob 53.0%; CAS: 112-61-8; Lib: replib; ID: 9040.

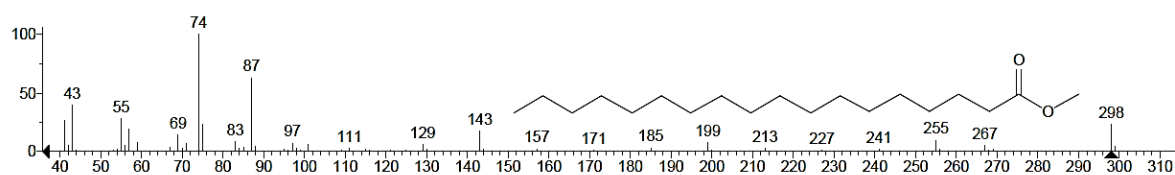


Figura 33. Comparação entre os espectros de massa do quarto pico obtido no OCV com o encontrado na biblioteca.

Os resultados obtidos da análise da composição do óleo de café verde por cromatografia gasosa e os resultados citados em literatura (Folstar, 1985), estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Porcentagens dos principais ácidos graxos presentes no OCV

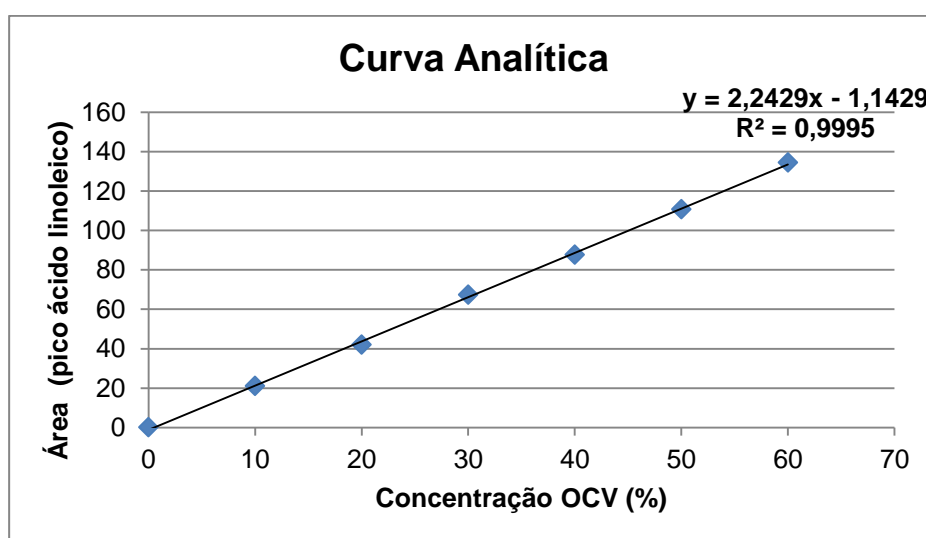
Ácidos Graxos	Composição obtida (%)	Composição descrita em literatura*(%)
Ácido linoléico	45,6	42,6 a 46,2
Ácido palmítico	27,5	32,1 a 33,2
Ácido oleico	15,1	8,2 a 12,5
Ácido esteárico	11,7	7,5 a 8,2

*Fonte: Folstar (1985) citado em Lago, 2006

Os resultados obtidos assemelham-se aos descritos por Folstar (1985), onde os principais ácidos graxos presentes neste óleo são o ácido linoléico, palmítico, oleico e esteárico. Porém houve variações nas quantidades de cada componente que podem ser atribuídas à diversos fatores como época de colheita, clima, solo, métodos extrativos, produção e recuperação dos ésteres metílicos, entre outros.

5.9. Quantificação de OCV nas micropartículas

A linearidade da metodologia para a detecção dos ácidos graxos presentes no óleo de café verde foi verificada pela curva analítica preparada conforme descrição no item 4.4.9. Na Figura 34 está representada a curva analítica quando amostras contendo concentrações conhecidas de CA e OCV foram analisadas por CG. A linearidade do método foi avaliada pelo coeficiente correlação determinado pela regressão linear.

**Figura 34.** Curva analítica preparada a partir de amostras contendo concentrações conhecidas de CA e OCV.

Para a construção da curva analítica foi considerado as áreas dos picos obtidos para o ácido linoleico, uma vez que este não foi detectado na cera de abelha pura, em análises preliminares realizadas.

A regressão linear dos dados experimentais apresentou um valor de coeficiente de correlação (R²) que está de acordo com as normas estabelecidas pelo INMETRO, em que valores superiores a 0,90 indicam que existe uma resposta linear e também pelas normas estabelecidas pela ANVISA, que é de 0,99. Sendo assim, a metodologia utilizada indica a existência de uma resposta linear para as concentrações de OCV presentes nas micropartículas, nas condições estudadas (INMETRO, 2003; ANVISA 2003).

Através da equação da reta obtida na curva analítica, foi calculada a porcentagem de OCV presente em cada micropartícula preparada no planejamento experimental. Os resultados estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17. Porcentagem de ácido linoleico presente nas micropartículas

Experimento	Área obtida (CG)	OCV (%)
1	59	26,81
2	50	22,80
3	81	36,62
4	79	35,73
5	57	25,92
6	71	32,17
7	128	57,58
8	87	39,30
9	44	20,13
10	91	41,08
11	89	40,19
12	85	38,41
13	65	29,49
14	60	27,26
15	58	26,37

A linearidade da metodologia analítica utilizada garante que, neste intervalo, os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (ANVISA, 2003). Porém, ao calcular as porcentagens de ácido linoléico presente em cada lote de micropartículas, alguns pontos mostraram-se discrepantes (*outliers* ou valor atípico), conforme ilustrado no gráfico boxplot (Figura 35).

Os gráficos do tipo boxplot são utilizados para avaliar a distribuição empírica dos dados, onde a haste inferior se estende até o menor valor (não inferior ao menor

limite) e a haste superior se estende até o maior valor (não superior ao maior limite). O gráfico é formado também pela mediana e também mostra os valores que são considerados discrepantes, estes são denotados por asterisco.

Os dados do gráfico mostram que as concentrações obtidas de OCV presente nas micropartículas estão entre a faixa esperada, entre 20 e 40% de OCV. Porém, os dados apontam para um limite inferior acima de 25%, que pode ter acontecido pela falta de sensibilidade do método na quantificação das micropartículas contendo 20% de OCV.

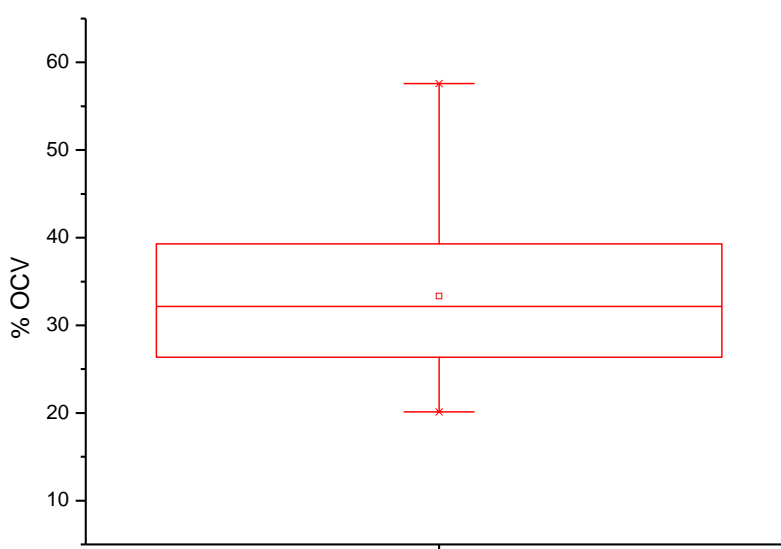


Figura 35. Gráfico boxplot para a concentração de OCV em cada lote de micropartículas.

Outro gráfico do tipo boxplot (Figura 36) foi construído a partir dos dados da eficiência de encapsulação para cada concentração de OCV estudada (20, 30 e 40%). A eficiência de encapsulação foi calculada através da razão entre a concentração de OCV final encontrado por análise CG e a concentração de OCV inicialmente colocada para o preparo das micropartículas. Este cálculo foi feito utilizando a seguinte equação:

$$\%EE = \frac{[] \text{ final}}{[] \text{ inicial}} \times 100$$

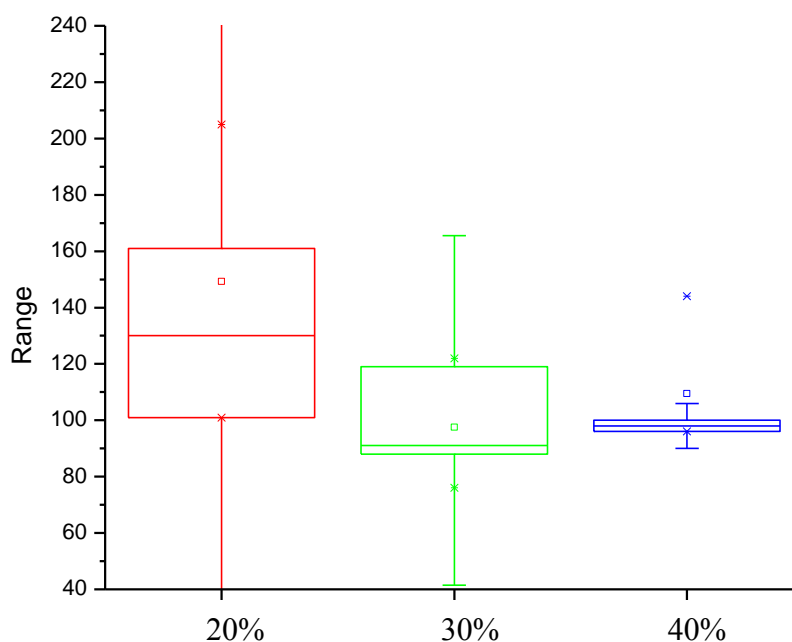


Figura 36. Gráfico boxplot para a eficiência de encapsulação em concentrações de 20, 30 e 40% de OCV

Assim como observado por Amarante *et al.* (2001), menores valores de concentração causam maior dispersão dos dados. A Figura 36 confirma que a quantificação do óleo presente nas micropartículas de menor concentração (20%) apresenta grande variação nos resultados, por outro lado essa variação diminui ao adicionar maiores concentrações de OCV, como pode ser observado para a concentração de 40%.

A Tabela 18 mostra os resultados obtidos para eficiência de encapsulação em cada experimento feito no planejamento Box-Behnken.

Tabela 18. Eficiência de encapsulação das micropartículas produzidas.

Experimento	[] inicial OCV	[] final OCV	EE (%)
1	30	26,81	89
2	30	22,80	76
3	30	36,62	122
4	30	35,73	119
5	20	25,92	130
6	20	32,17	161
7	40	57,58	144
8	40	39,30	98
9	20	20,13	101
10	20	41,08	205
11	40	40,19	100
12	40	38,41	96
13	30	29,49	98
14	30	27,26	91
15	30	26,37	88

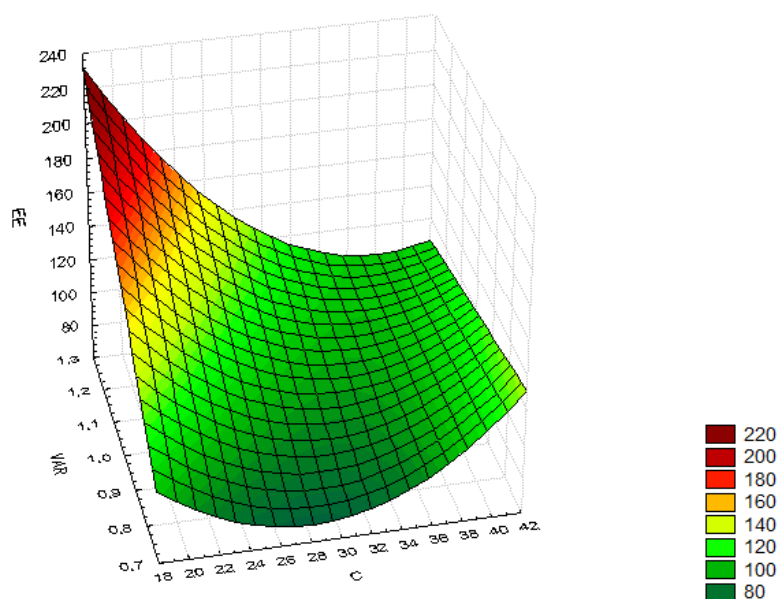
Segundo estudo publicado por Passerini *et al.* (2002), os valores obtidos para a eficiência de encapsulação das micropartículas contendo carbamazepina feitas por *spray congealing*, variaram entre 89 e 120%. Sendo assim, diante da complexidade do processo de separação entre o OCV e a CA produzidas no presente estudo, aliado às diversas reações necessárias para a produção dos metil ésteres na quantificação por CG e a dificuldade em se avaliar as menores concentrações de OCV, foram considerados aceitáveis as eficiências de encapsulação menores que 130%, sendo assim os experimentos 6, 7 e 10 foram classificados como pontos discrepantes, com valores atípicos não condizentes com o real.

A análise de variância da eficiência de encapsulação mostrou que, dentre as variáveis estudadas, a concentração de OCV e a vazão do ar de resfriamento foram significantes a 5%, conforme dados da Tabela 19.

Tabela 19. Análise de variância da eficiência de encapsulação das micropartículas contendo OCV.

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
Intercept	25613,28	1	25613,28	212,6622	0,000027
VD	118,45	1	118,45	0,9835	0,366876
VD ²	259,24	1	259,24	2,1524	0,202264
VAR	3876,40	1	3876,40	32,1850	0,002368
VAR ²	2,69	1	2,69	0,0224	0,886960
C	3112,61	1	3112,61	25,8434	0,003823
C²	3872,05	1	3872,05	32,1489	0,002374
VD*VAR	27,04	1	27,04	0,2245	0,655594
VD*C	1480,33	1	1480,33	12,2909	0,017177
VAR*C	2981,16	1	2981,16	24,7520	0,004193
Erro	602,21	5	120,44		

O gráfico de superfície (Figura 37) mostra que com a diminuição da concentração do óleo de café verde e o aumento da vazão do ar de resfriamento as micropartículas apresentaram maior eficiência de encapsulação.

**Figura 37.** Gráfico de superfície para a eficiência de encapsulação das micropartículas.

No gráfico observa-se também que valores intermediários para a concentração de OCV juntamente com VAR menores, parecem diminuir a eficiência de encapsulação. Por outro lado, concentrações maiores de OCV associadas a VAR menores, parecem melhorar a eficiência de encapsulação.

De maneira geral, pode-se dizer que houve uma eficiência de encapsulação

satisfatória para as micropartículas produzidas neste estudo, uma vez que, com exceção dos pontos considerados como *outliers*, os resultados obtidos foram em média de 98%.

5.10. Estabilidade Preliminar

Os testes preliminares para a avaliação da estabilidade foram feitos seguindo as normas sugeridas pela ANVISA. Este teste, também conhecido como teste de triagem ou estabilidade de curto prazo, tem como objetivo auxiliar e orientar a escolha das formulações. Estes estudos aumentam a velocidade de degradação química e promovem modificações físicas em uma substância, através de condições forçadas de armazenamento. As reações de degradação são monitoradas para a previsão do prazo de validade do produto (ANVISA, 2004).

Após o armazenamento das amostras nas condições descritas no item 4.4.10 as amostras foram submetidas a análises cromatográficas e os picos referentes ao ácido linoleico foram avaliados.

A análise da estabilidade para as micropartículas foi feita comparando os resultados obtidos para a concentração de ácido linoleico presente nas micropartículas antes e depois do teste de estabilidade. Foram analisadas as amostras contendo 20, 30 e 40% de OCV, bem como este óleo sozinho, para assim avaliar a melhora na estabilidade dos produtos microparticulados.

Os dados obtidos para este estudo estão ilustrado na Figura 38.

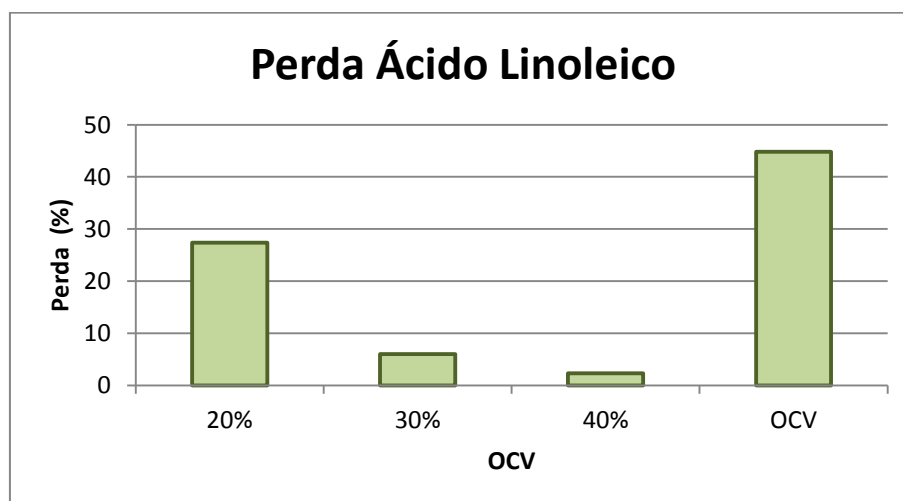


Figura 38. Gráfico da porcentagem de ácido linoleico perdida após teste de estabilidade preliminar

Como pode ser observado as micropartículas contendo CA e OCV apresentaram uma grande melhora na estabilidade quando comparadas ao OCV líquido. Concentrações maiores de OCV presentes nestas micropartículas podem melhorar ainda mais esta estabilidade.

Esta perda em ácido linoléico pode ter acontecido por processos oxidativos, que como visto anteriormente é um dos principais fatores de deterioração dos ácidos graxos. Assim como observado por Tehrany *et al.* (2011), o encapsulamento dos ácidos graxos pode ser uma alternativa para retardar ou evitar o processo de oxidação dessas substâncias. O desenvolvimento de sistemas microparticulados pode aumentar a estabilidade da substância ativa além de protegê-la contra a oxidação (MARCATO, 2009; CAO-HOANG; FOUGÈRE; WACHÉ, 2011). De acordo com Silva, Borges e Ferreira (1999), as substâncias oleosas líquidas também podem ser microencapsuladas por matrizes para protegê-las contra a peroxidação lipídica que é a principal causa de deterioração dos materiais graxos.

Dessa forma, o estudo e o desenvolvimento de novos produtos contendo lipídios visando melhorar a sua estabilidade são de fundamental importância para vários setores, principalmente em cosméticos, onde os óleos vegetais são amplamente utilizados em suas formulações.

Segundo Esquivel, Ribeiro e Bernardo-Gil (2009), encontrar novas formas de controle da degradação dos lipídios em alimentos e em sistemas biológicos é um dos grandes desafios em indústrias de alimentos e cosméticos. Os antioxidantes, presentes nos óleos vegetais ou adicionados à ele, podem retardar o processo de oxidação, aumentando a vida útil destes produtos.

De maneira geral, além das micropartículas oferecerem uma melhora da estabilidade dos ativos, elas também permitem o desenvolvimento de novas formulações, seja para controlar a liberação do ativo, diminuir sua toxicidade ou até mesmo formar combinações mais potentes, entre ativo e matriz carreadora.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Analisando os resultados obtidos para a produção e caracterização das micropartículas contendo óleo de café verde, pode-se concluir que:

- Apesar de um rendimento aparentemente baixo, cerca de 21 a 32%, a técnica de *spray congealing* mostrou ser eficiente para a microencapsulação do óleo de café verde. Para a escala laboratorial baixos rendimentos podem ser aceitáveis, tendo em vista que equipamentos de pequena escala podem resultar em adesão das partículas na câmara e o ciclone de separação pode não ser capaz de prender partículas pequenas.
- Valores intermediários da vazão do ar de resfriamento da câmara (VAR) podem aumentar o rendimento do processo.
- Por não utilizar solventes aquosos, a microencapsulação por *spray congealing* originou produtos com teores de umidade muito abaixo da porcentagem máxima obtida, o que é excelente, uma vez que a umidade está diretamente relacionada com a proliferação de microrganismos.
- A maior agregação entre as partículas e a maior deformidade na sua superfície pareceu ser proporcional ao aumento da concentração do óleo de café verde adicionado em cada preparação.
- A morfologia das micropartículas é dependente das forças de contração durante a secagem e também da viscosidade do material líquido atomizado. O aumento da viscosidade aumenta a tendência de enrugamento das micropartículas formadas.
- Apesar do enrugamento, a superfície das micropartículas não apresentou fissuras ou poros, garantindo maior proteção da substância ativa.
- A viscosidade da mistura líquida atomizada pode influenciar também o tamanho das micropartículas. As misturas de menor viscosidade resultaram em tamanhos menores de partículas, enquanto que as de maior viscosidade resultaram em partículas de tamanhos maiores. Sendo o tamanho das partículas aumentado conforme adições maiores de OCV.
- O tamanho das partículas variou entre 50 a 140 μm , o que pode ser importante para a produção de filtros solares, uma vez que estes tamanhos são considerados adequados para que não ocorra a penetração do ativo

através da pele.

- O ponto de fusão da cera de abelha diminui conforme adição de maiores quantidades de OCV.
- A viscosidade da mistura fundida (à 80°C) aumenta conforme maiores adições de OCV, porém após solidificação do material esta viscosidade passa a ser menor conforme adições maiores de OCV.
- Pela avaliação da atividade fotocatalítica pode-se dizer que todas as amostras agiram como antioxidantes. Nessas condições, de uma maneira geral, as micropartículas de OCV apresentaram maior ação protetora do que a Vitamina E. Sendo que dentre as micropartículas estudadas, aquela contendo 40% de OCV apresentou valores melhores na proteção do óleo de rícino (controle) contra a degradação.
- A eficiência de encapsulação depende da concentração de óleo e da vazão do ar de resfriamento da câmara, sendo que concentrações menores de OCV e o aumento da VAR aumentam a eficiência de encapsulação. Porém, concentrações intermediárias de OCV parecem diminuir esta eficiência.
- As micropartículas contendo CA e OCV se mostraram muito mais estáveis nas condições estudadas do que o OCV líquido. Sendo que as micropartículas contendo concentrações maiores de OCV podem melhorar ainda mais esta estabilidade.

De maneira geral, o aumento da concentração de OCV aumenta a viscosidade da mistura fundida atomizada que, conseqüentemente, aumenta o tamanho da partícula e provoca maiores deformações em sua superfície. Porém, as micropartículas contendo 40% de OCV apresentaram melhor estabilidade e melhor proteção do óleo de rícino contra a degradação.

O planejamento experimental Box-Behnken foi de extrema importância para a avaliação das variáveis do processo, sendo este dependente principalmente da concentração de OCV e da vazão do ar de resfriamento (VAR).

Os resultados obtidos na microencapsulação do óleo de café verde foram muito satisfatórios, apresentando uma acentuada melhora na estabilidade do OCV. Além disso, a combinação entre a CA e o OCV parece melhorar a ação antioxidante deste óleo. Portanto, a microencapsulação de óleos vegetais pode ser uma

alternativa para o desenvolvimento de novos produtos, seja para protegê-los contra a oxidação, aumentando sua estabilidade, ou para potencializar a atividade de produtos já comercializados.

Referências
Bibliográficas

REFERÊNCIAS

ABIHPEC, Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, 2011, disponível em <<http://www.abihpec.org.br/seminario-sobre-cosmeticos-reune-especialistas-em-brasilia>>, acesso em 24/10/2011.

ACKMAN, R.G. The gás chromatography in practical analysis of common and uncommon fatty acids for the 21st century. **Analítica Chemical Acta**, v. 465, p. 175-192, 2002.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Brasília, 2003.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1. ed. Brasília, 2004. 52 p.

ALBERTINI, B.; MEZZENA, M.; PASSERINI, N.; RODRIGUEZ, L.; SCALIA, S. Evaluation of Spray Congealing as Technique for the Preparation of Highly Loaded Solid Lipid Microparticles Containing the Sunscreen Agent, Avobenzone. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. p. 1-11, 2008.

ALBERTINI, B.; PASSERINI, N.; PATTARINO, F.; RODRIGUEZ, L. New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 69, p. 348-357, 2008.

ALBERTINI, B.; PASSERINI, N.; DI SABATINO, M.; VITALI, B.; BRIGIDI, P.; RODRIGUEZ, L. Polymer–lipid based mucoadhesive microspheres prepared by spray-congealing for the vaginal delivery of econazole nitrate. **European Journal of Pharm Sciences**, v. 36, p. 591-601, 2009.

ALISEDA, A.; HOPFINGER, E. J.; LASHERAS, J. C.; KREMER, D. M.; BERCHIELLI, A.; CONNOLLY, E. K. Atomization of viscous and non-newtonian liquids by a coaxial, high-speed gas jet. Experiments and droplet size modeling. **International Journal of Multiphase Flow**, v. 34, p. 161–175, 2008.

ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberações de fármacos**. 8 ed. Porto Alegre. Artmed, 2007.

AMARAL, F. P.; BROETTO, F.; BATISTELLA, C. B.; JORGE, S. M. A. Extração e caracterização qualitativa do óleo da polpa e amendoas de frutos de macaúba [*acrocomia aculeata* (jacq) lodd. ex mart] coletada na região de botucatu, SP. **Revista Engenharia na Agricultura**. v. 26 (1). p.12-20, 2011.

AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R. dos; VALE, M. L. B. F. **Validação de métodos analíticos**: uma breve revisão. *Cad. Pesq.*, v. 12, p. 116-131, 2001.

ASADAUSKAS, S.; PEREZ, J. M.; DUDA, J. L. Oxidative Stability and antiwear properties of high oleic vegetable oils. **Journal of the Society of Tribologists and**

Lubrication Engineers, v. 52, n. 12, p. 877-882, 1996.

AVELAR, A. C.; SOUZA, C. G. Inovação e desenvolvimento de produtos na Indústria de Cosméticos: um estudo de caso. **Revista Gestão Industrial**, v. 2, n. 2, p. 87-97, 2006.

AZEREDO, H. M. C. ENCAPSULAÇÃO: APLICAÇÃO À TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Alim. Nutr.**,v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **Eur. J. of Pharm. Sci.** v. 14 (2). p. 101-114, 2001.

BELINATO, G. **Estudo da oxidação dos óleos de soja e dendê aditivados com antioxidantes para uso em tratamentos térmicos de têmpera**. 2010. 121f. Dissertação (Mestrado). Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

BERTHOLET R. Preparation of cafestol. U.S. Patent No. 4,692,534, 1987.

BERTHOLET R. Preparation of a mixture of cafestol and kahweol. U.S. Patent No.4,748,258, 1988.

BEVERIDGE T.; LI T. S. C.; OOMAH B. D.; SMITH A. Sea Buckthorn products: manufacture and composition, **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 3480–3488, 1999.

BOELSMA E.; HENDRIKS H. F. J.; ROZA L. “Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids.” **Am J Clin Nutr** 73: 853–64, 2001.

BORINI, G. B.; ANDRADE, T. C.; FREITAS, L.A.P. Hot melt granulation of coarse pharmaceutical powders in a spouted bed. **Powder Technology**, v. 189, p. 520-527, 2009.

BOSKU D.; MORTON D. Effect of plant sterols on the rate of deterioration of heated oils. **J.Sci. Food Agric.**, v. 27, p. 928-932, 1976.

BRANDT, F. S.; CAZZANIGA, A.; HANN, M. Cosmeceuticals: Current trends and market analysis. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 30, p. 141-143, 2011.

BRASEQ. Brasileira de Equipamentos Ltda. Viscosidade e Reologia: Noções básicas. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/reologia%20brookfield.pdf>> acesso em 24/10/2011.

BRASIL, Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. **Diário Oficial da União**. p. 18-23, 2001.

CAO-HOANG, L.; FOUGÈRE, R.; WACHÉ, Y. Increase in stability and change in supramolecular structure of β -carotene through encapsulation into polylactic acid nanoparticles. **Food Chemistry**, v.124, p. 42-49, 2011.

CARDOSO L. G. V.; BARCELOS, M. F. P.; OLIVEIRA, A. F.; PEREIRA, J. A R.; ABREU, W. C.; PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; PEREIRA, M. C. A. Características físico-químicas e perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas no Sul de Minas Gerais – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31 (1). p. 127-136, 2010.

CARVALHO FILHO, M. A. S. **Preparação e estudo termoanalítico dos cinamatos de terras raras, exceto promécio e escândio, no estado sólido**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2000.

CAVIN C.; HOLZHAUSER D.; SCHARF G. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity, **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 1155-1163, 2002.

CHAMBI, H. N. M.; ALVIM, I.D.; BARRERA-ARELLANO, D.; GROSSO, C. R. F. Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular mass: production, characterization and release profiles. **Food Research International**, v. 41, p. 229-236, 2008.

CHOE, E.; MIN, D.B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 169-186, 2006.

CLIFFORD M. N. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage.**, p. 305-374, 1985.

ELKORDY, A. A.; ESSA, E. A. Effects of Spray Drying and Spray Chilling on Ibuprofen Dissolution. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 6 (1), p. 3-12, 2010.

EMAS, M.; NYQVIST, H. Methods of studying aging and stabilization of spray-congealing solid dispersions with carnauba wax. I. Microcalorimetric investigation. **International Journal of Pharmaceutics**, v, 197, p. 117-127, 2000.

ESQUIVEL, M. M.; RIBEIRO, M. A.; BERNARDO-GIL, M. G. Relations between Oxidative Stability and Antioxidant Content in Vegetable Oils Using an Accelerated Oxidation Test – Rancimat. **Chemical Product and Process Modeling**. v. 4 (10), 2009.

FERREIRA, A. O. **Guia prático da farmácia magistral**. 3. Ed. São Paulo: Pharmabooks , 2008.409p.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: An alternative for the

optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 179–186, 2007.

FOCKE, W. W.; VAN DER WESTHUIZEN, I.; GROBLER, A. B. L.; NSHOANE, K. T.; REDDY, J. K.; LUYT, A. S. The effect of synthetic antioxidants on the oxidative stability of biodiesel. **Fuel**, v. xxx, p. xxx–xxx, 2011.

FOLLIER J. F.; PLESSIS S. Use of coffee beans oil as a sun filter. US Patent 4,793,990, 1988.

FOLSTAR P. Lipids. **Elsevier Applied Science**. v.1, p.203-222., 1985.

FOSTER, T. P.; LAETHERMAN, M. W. Powder characteristics of proteins spray-dried from different spray-dryers. **Drug Develop. Ind. Pharm.**, v. 21, pp. 1705–1723, 1995.

FREITAS, L. A. P., ANDRADE, T. C., TEIXEIRA, C. C. C., TACON, L. A., TSUKADA, M. **Innovative applications of spray drying**. Chapter No 1 of Advances in Chemical Engineering/ ed. Maria Jose San Jose, Transworld Res. Network, Kerala, India, 2010 1-12p.

FUENTE, M. A.; DE LA LUNA, P.; JUAREZ, M. Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25(9), p. 917-926, 2006.

GASSENMEIER T.; BUSCH P.; HENSEN H.; SEIPEL W. Some aspects of refatting the skin, **Cosmet. Toiletries**, v. 113, p. 89-92, 1998.

GIESE, J. Fats, oils and fat replacers. **Food Technology - Especial Report**, v. 50, n. 4, p. 77-84, 1996.

GIUNCHEDI, P.; CONTE, U. Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: overview. **STP Pharma Sci.**, v. 5, p. 276-290, 1995.

GORDON, M.H. **The development of oxidative rancidity in foods**. Antioxidants in food – practical applications. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001. 380p.

HAYS, P. A. Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) Methods for Determining the Purity of Reference Drug Standards and Illicit Forensic Drug Seizures. **J Forensic Sci**, v. 50, p. 1-19, 2005.

HELLIN, L. C.; CLAUSELL, M. P. R. Incidencia de la fritura en la composición de la fracción lipídica de diversos aperitivos de consumo generalizado em nuestro país. **Analises Bromatológicas**, v. 36, n. 1, p. 5-31, 1984.

HOLDSWORTH, S. D. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behaviour of fluid food products. **Journal of Texture Studies**, v. 2, p. 393–418, 1971.

ILIC, I.; DREU, R.; BURJAK, M.; HOMAR, M.; KERK, J.; SRCIC, S. Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 381, p. 176–183, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea, São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2008, p. 1020.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION-ICO, **Exports by exporting countries to all destinations**. disponível em <<http://dev.ico.org/prices/m1.htm>>, dezembro/2011.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químico**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

IONASHIRO, M. **Fundamentos da Termogravimetria. Análise Térmica Diferencial. Calorimetria Exploratória Diferencial**. São Paulo: Giz, 2005.

JAIN, S.; SHARMA, M. P. Review of different test methods for the evaluation of stability of biodiesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 1937-1947, 2010

JORGE, N.; GONÇALVES, L. A. G.; *Boletim SBCTA*, 32, 40, 1998.

KAS, H. S.; ONER, L. **Microencapsulation using coacervation/ phase separation: an overview of the technique and applications**. In: WISE, D. L., ed. *Handbook of Pharmaceutical controlled release technology*. New York: Marcel-Dekker, p. 301-328, 2000.

KAUR, C. D.; SARAF, S. *In vitro* sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics. *Pharmacognosy Research*, v. 2 (1), p. 22-25, 2010.

KHERADMANDNIA S.; VASHEGHANI-FARAHANI E.; NOSRATI M.; ATYABI F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. *Nanomedicine*. v.6, p.753-759, 2010.

KILLEN, M. J. The process of spray drying and spray congealing. *Pharmaceutical Engineering*, v. 13, p. 56-64, 1993.

KÖLLING-SPEER I.; STROHSCHNEIDER S.; SPEER K. Determination of free diterpenes in green and roasted coffees. *J. High Resol. Chromatogr.*, v. 22, p. 43-46, 1999.

KRZYSZTOF, C., KRZYSZTOF S. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, v. 99, p.575-586, 2010.

KULAH, G.; KAYA, O. Investigation and scale-up of hot-melt coating of pharmaceuticals in fluidized beds. *Powder Technology*. v.208, p. 175-184, 2011.

KUMAR, S. Exploratory analysis of global cosmetic industry: major players, technology and market trends. **Technovation**, v. 25, p. 1263-1272, 2005.

LEDOUX, M.; LALOUX, L.; WOLFF, R. L. Analytical methods for determination of trans-C18 fatty acid isomers in milk fat. A review. **Analysis**, v. 28, p. 402-412, 2000.

LAGO, R. C. A. Lipídios em grãos de café. Boletim do CEPPA, v. 19, n. 2, p. 319-340, 2001.

LAGO, R. C. A.; FREITAS S. P. Extração dos óleos de café verde e da borra com etanol comercial. **Comunicado técnico 92 – EMBRAPA**, p.1-6, 2006.

LALL, R. K.; PROCTOR, A.; JAIN, V. P. A Rapid, Micro FAME Preparation Method for Vegetable Oil Fatty Acid Analysis by Gas Chromatography. **J Am Oil Chem Soc.** v. 86. p. 309–314, 2009.

LIMA, J. F.; MARTINS, R. F.; NERI, C. R.; SERRA, O. A. ZnO:CeO₂-based nanopowders with low catalytic activity as UV absorbers. **Applied Surface Science** v. 255, p. 9006–9009, 2009.

MACHADO, M. O. **Obtenção de micropartículas contendo dispersões sólidas de praziquantel por spray congealing**. 2011. 120f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

MAGILL, M. Microencapsulamento. **Cosmetics & Toiletries**. v.3, 1991.

MAIER H. G.; MÄTZEL U. Atractyligenin und seine Glykoside im Kaffee. In: **10th International Colloquium on the Chemistry of Coffee**, 247-51, ASIC, Paris, 1982.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. VI (2), p. 01-37, 2009.

MARTINS, R. M. **Desenvolvimento de dispersões sólidas microparticuladas contendo carbamazepina por spray congealing**. 2010. 166f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

MCCARRON, P. A.; DONNELLY, R. F.; AL-KASSAS R. Comparison of a novel spray congealing procedure with emulsion-based methods for the micro-encapsulation of water-soluble drugs in low melting point triglycerides. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, p. 365-378, 2008.

MCLUCKEY, S. A.; MENTINOVA, M. Ion/Neutral, Ion/Electron, Ion/Photon, and Ion/Ion Interactions in Tandem Mass Spectrometry: Do We Need Them All? Are They Enough?. **J. Am. Soc. Mass Spectrom**, v. 22, p. 3-12, 2011.

MENDHAM, J.B. Vogel: Análise Química Quantitativa. 6ª edição, LTC, 2002.

MENDONÇA, A. C. **Atividade antioxidante de poliaminas e comparação com produtos naturais e sintéticos**. 2009. 87f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

MICHALUN, N.; MICHALUN, M. V. **Dicionário de ingredientes para cosmética e cuidados da pele**. Editora SENAC, São Paulo, 2010.

MORETTO, E.; FETT, R.; **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais**. Varela, São Paulo, 1998.

NANJWADE, B. J. K.; PATEL, D. J.; PARIKH, K. A.; NANJWADE, V. K.; MANVI, F. V. Development and Characterization of Solid-Lipid Microparticles of Highly Insoluble Drug Sirolimus. **J Bioequiv Availab**. v. 3, p. 011-015, 2011.

NAKAYAMA S.; KATOH E.M.; TSUZUKI T.; KOBAYASHI S. Protective effect of alpha-tocopherol-6-O-phosphate against ultraviolet B-induced damage in cultured mouse skin. **J Invest Dermatol** ; 121: 406–11., 2003.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos da físico-química: Uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 299p.

PAGLIARUSSI, R. S., BASTOS; J. K.; FREITAS, L. A. P. Fluid bed drying of Guarana (*Paullinia cupana* HBK) extract: effect of process factors on caffeine content. **AAPS PharmaSciTech**. 7 (2), article - 54, 2006.

PAPINI, C. J.; LEAL NETO, R. M. Análise granulométrica de pós metálicos por difração de laser via seca. 17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais - CBECIMat, 2006.

PARASHAR, A.; SINHA, N.; SINGH, P. Lipid Contents and Fatty Acids Composition of Seed Oil from Twenty Five Pomegranates Varieties Grown in India. *Advance Journal of Food Science and Technology*. p. 12 -15 , 2010.

PARDAUIL, J. J. R.; SOUZA, L. K. C.; MOLFETTA, F. A.; ZAMIAN, J. R.; ROCHA FILHO, G. N.; COSTA, C. E. F. Determination of the oxidative stability by DSC of vegetable oils from the Amazonian area. **Bioresource Technology**, v.102, p. 5873–5877, 2011.

PASSERINI, N.; PERISSUTTI, B.; MONEGHINI, M.; VOINOVICH, D.; ALBERTINI, B.; CAVALLARI, C.; RODRIGUEZ, L. Characterization of carbamazepine–Gelucire 50/13 microparticles prepared by a spray-congealing process using ultrasounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 91 (3). p. 699–707, 2002.

PASSERINI, N.; ALBERTINI, B.; PERISSUTI, B.; RODRIGUEZ, L. Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 318, p. 92-102, 2006.

PASSERINI N.; GAVINI, E.; ALBERTINI, B.; RASSU, G.; DI SABATINO, M.; SANNA, V.; GIUNCHEDI, P.; RODRIGUEZ, L. Evaluation of solid lipid microparticles produced by spray congealing for topical application of econazole nitrate. **Journal of**

Pharmacy and Pharmacology, v. 61, p. 559-567, 2009.

PASSERINI, N.; ALBERTINI, B.; GRASSI M.; RODRIGUEZ L.; CRAIG D. Q. M. Solid Lipid Microparticles Produced by Spray Congealing: influence of the Atomizer on Microparticle Characteristics and Mathematical Modeling of the Drug Release. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99(2): p. 916-931, 2010.

PELLE E. Topical composition and method for enhancing lipid barrier synthesis. U.S.Patent No. 5,855,897, 1999.

PEREDA, M. D. C. V.; DIEAMANT, G. C.; EBERLIN, S.; NOGUEIRA, C.; COLOMBI, D.; DI STASI, L. C.; DE SOUZA QUEIROZ, M. L. S. Effect of green Coffea arabica L. seed oil on extracellular matrix components and water-channel expression in 'in vitro' and 'ex vivo' human skin models. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 8, p. 56-62, 2009.

PEREIRA, R. A.; ZOVARO, R. Produção e beneficiamento de cera de abelhas *Apis Melifera*. Congresso Iberolatinoamericano de Apicultura. 2010. disponível em <<http://www.xibla.com.br/PDF/RogérioAparecidoPereira.pdf>> acesso em 16/01/2012.

PERGE, L.; ROBITZER, M.; GUILLEMOT, C.; DEVOISSELLE, J. M.; QUIGNARD, F.; LEGRAND, P. New solid lipid microparticles for controlled ibuprofen release: Formulation and characterization study. **International Journal of Pharmaceutics**. v.XX, p. XX, 2011.

PEVERARI, C. Compostos de terras raras, com alta absorvidade no ultravioleta, como agentes de proteção de radiações solares UV-A e UV-B. 2007. 96f. Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

POISSON, J. Aspects chimiques et biologiques de la composition du café vert. **In: Colloque Scientifique International sur le Café**, 8., pp. 33–58, 1977, *Abidjan. Annals ASIC*, Paris, pp. 33–58, 1979.

QIYUN, G. **A study of factors affecting spray-congealed micropellets for drug delivery**. 2008. 150f. Tese (Doutorado). National University of Singapore, Pharmacy Department, Singapura, 2008.

RAFFIN R. P.; JORNADA D. S.; RÉ, M. I.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Sodium pantoprazole-loaded enteric microparticles prepared by spray drying: Effect of the scale of production and process validation. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 324 (1), p. 10-18, 2006.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RANJHA, N. M.; KHAN, H.; NASEEM, S. Encapsulation and characterization of controlled release flurbiprofen loaded microspheres using beeswax as an encapsulating agent. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 21, p. 1621–1630, 2010.

RAO, M.A., Rheology of fluid and semisolid foods: principles and applications – Food Engineering Series, 1a ed., *Aspen Publishers, Inc.*, 1999.

RÊ, M. I. Microencapsulação em busca de produtos ‘inteligentes’. **Ciência Hoje – Revista de divulgação científica da sociedade brasileira para o progresso a ciência**, v. 27, n.162, p. 24-29, 2000.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. **Revista Analytica**, n. 27, p. 60-67, 2007.

RIBEIRO FILHO, S. L. M. Tópicos de introdução a análise e planejamento de experimentos fatoriais. COEN-UFSJ, disponível em <<http://www.coen.eng.br/ementamcpa/iape.pdf>>, acesso em 13/12/2011.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. *Planejamentos de experimentos e otimização de processos*. Campinas, SP: **Casa do Pão**, 2009.

SANTOS A.B.; FÁVARO-TRINDADE C. S.; GROSSO, C. R. F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25(2), p. 322-326, 2005.

SARALIDZE, K.; KOOLE, L. H.; KNETSCH, M. L. W. Polymeric microspheres for medical applications. **Materials**. v. 3, p. 3537-3564, 2010.

SAVIAN, A. L.; VARELLA, F. T.; ATAYDE, M. L.; SILVA, C. B. Desenvolvimento e avaliação preliminar da estabilidade de emulsão não-iônica O/A contendo óleo de café verde como potencializador de fator de proteção solar. **Rev. Bras. Farm.**, v 91(2), p. 82-88, 2011.

SCHAEFER, H.; WATTS, F.; BROD, J.; ILLEL, B. Follicular penetration. **Prediction of Percutaneous Penetration, Methods, Measurements, Modelling** IBC Technical Services London 1990 163-173.

SCHMALTZ, C.; SANTOS, J. V.; GUTERRES, S. S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. **Infarma**, v. 16, n. 13-14, 2005.

SEOLATTO, A. A.; TAVARES, C. R.; COSSICH, E. S.; DA SILVA, E. A.; GUEDES, T. A. Planejamento experimental estatístico para a otimização das condições em batelada de dessorção de níquel da alga marinha *Sargassum filipendula*. **Acta Scientiarum Technology**, v. 31, n. 2, p. 207-214, 2009.

SHANTA, N. C.; NAPOLITANO, G. E. Gas chromatography of fatty acids. **Journal of chromatography**. v. 624, p. 37-51, 1992.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 01-20, 2003.

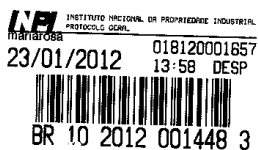
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica e da Capacidade Antioxidante. **Química Nova**, 22(1): 94-103, 1999.
- SIMIONATO, J. I.; GARCIA, J. C.; DOS SANTOS, G. T.; OLIVEIRA, C. C.; VISENTAINERA, J. V.; DE SOUZA, N. E. Validation of the Determination of Fatty Acids in Milk by Gas Chromatography. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, No. 3, 520-524, 2010.
- SOUZA, A. G.; SANTOS, J. C. O.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, M. C. D.; PRASAD, S. A. Thermoanalytic and kinetic study of sunflower oil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 2, p. 265-273, 2004.
- SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. L.; FERREIRA, S. L. C. Application of Box-Behnken design in the optimisation of an on-line pre-concentration system using knotted reactor for cadmium determination by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. v. 60, p. 737-742, 2005.
- SPEER, K.; KOLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p. 201-216, 2006.
- STEFFE, J.F. Rheological Methods in Food Process Engineering, 2a ed., **Freeman Press**, p. 418, 1996.
- SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, 2006.
- TABILO-MUNIZAGA, G., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., Rheology for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v.67, p.147-156, 2005.
- TABOSA, I. M.; QUINTAS JUNIOR, L. J.; PAMPLONA, F.V.; ALMEIDA, R. N.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; SOUZA, J. C. A.; BARBOSA FILHO, J. M. Isolamento biomonitorado de alcaloides tóxicos de *Prosopis juliflora* (algaroba). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 9-10, p. 11-22, 2000.
- TEHRANY, E. A.; JACQUOT, M.; GAIANI, C.; IMRAN, M.; DESOBRY, S.; LINDER, M. Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. **Trends in Food Science & Technology**. v. xx. p. xx, 2011
- TOLL, R. JACOBI, U.; RICHTER, H.; LADERMANN, J.; SCHAEFER, H.; BLUME-PEYTAVI, U. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. **J. Invest. Dermatol.** v. 123. p. 168-176, 2004.
- WAGEMAKER, T. A. L.; CARVALHO, C. R. L.; MAIA, N. B.; BAGGIO, S. R., GUERREIRO FILHO, O. Sun protection factor, content and composition of lipid fraction of green coffee beans. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 469-473, 2011.
- YANAGIMOTO K.; OCHI H.; LEE K. G.; SHIBAMOTO T. Antioxidative activities of

fractions obtained from brewed coffee. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 592-596, 2004.

ZHELJAZKOV, V. D.; VICK, B. A.; BALDWIN, B. S.; BUEHRING, N.; ASTATKIE, T.; JOHNSON, B. Oil Content and Saturated Fatty Acids in Sunflower as a Function of Planting Date, Nitrogen Rate, and Hybrid. **Agronomy Journal**. v. 101 (4), p. 1003-1011, 2009.

ZHU L.; LAN, H.; HE, B.; HONG, W.; LI, J. Encapsulation of Menthol in Beeswax by a Supercritical Fluid Technique. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2010, p. 1-7, 2010.

APÊNDICE 1 – DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE NO INPI SOBRE
MICROPARTÍCULAS E NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS.



<Uso exclusivo do INPI>

Espaço reservado para protocolo

Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU CERTIFICADO DE ADIÇÃO**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
 1.2 Qualificação: AUTARQUIA ESTADUAL DE REGIME ESPECIAL
 1.3 CNPJ/CPF: 63025530000104
 1.4 Endereço completo: AV. BRASIL, Nº 1971 JARDIM PAULISTA São Paulo SP
 1.5 CEP: 01431001 1.6 Telefone: (11)30911580 1.7 FAX: (11)30310922
 1.8 E-mail: PIDIRETO@USP.BR continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: 2.1 INVENÇÃO

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

"MICROPARTÍCULAS E NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS"

 continua em folha anexa**4. Pedido de Divisão: do pedido****Data de Depósito:****5. Prioridade** interna unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

Pais ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

6. Inventor (72): Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: LUIS ALEXANDRE PEDRO DE FREITAS
 6.2 Qualificação: BRASILEIRO CASADO PROFESSOR 6.3 CPF: 06848897817
 6.4 Endereço completo: RUA CAMPOS SALLES 824 RIBEIRÃO PRETO SP
 6.5 CEP: 14015110 6.6 Telefone: (11)30911580 6.7 FAX (11)30310922
 6.8 E-mail: PIDIRETO@USP.BR

 continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome: MARIA APARECIDA DE SOUZA
 9.2 CPF/CNPJ: 12184617806 9.3 API/OAB: 1833
 9.4 Endereço completo: AV. BRASIL, Nº 1971
 9.5 CEP: 01431001 9.6 Telefone: (11)30911580 9.7 FAX: (11)30310922
 9.8 E-Mail: PIDIRETO@USP.BR

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- Listagem de sequências em arquivo eletrônico: n° de CDs e DVDs (originais e cópias).
 Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
 Listagem de sequências em formato impresso: fls.
 Declaração de acordo com o artigo da Resolução do INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de recolhimento	2 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	23 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2 Procuração	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	4 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	3 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar): AUTORIZAÇÃO DE INVENTORES / ESCLARECIMENTOS				3 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 37 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

SÃO PAULO, 20/01/2012

Local e Data


 MARIA APARECIDA DE SOUZA - API 1833
 CPF: 12184617806

Assinatura e Carimbo



ANEXO DE INVENTORES**Título: "MICROPARTÍCULAS E NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS"****Página : 1**

Nome: ANNA BEATRIZ FREJUELLO LIMOLI NOSARI
Qualificação BRASILEIRA CASADA FARMACÊUTICA CNPJ/CPF: 27981188830
Endereço: AV. DOS PIONEIROS, 750, APTO 211 BLOCO C
Bairro: PQ VILA FLORES Estado: RIBEIRÃO PRETO
CEP: 13175668 País
Telefone: (11)30911580 Fax: (11)30310922
