**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

LUCIANA CRISTINA MACHADO

**FORMAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE LIMONENO EM
POLISSACARÍDEOS USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO**

LUCIANA CRISTINA MACHADO

**FORMAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE LIMONENO EM
POLISSACARÍDEOS USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Lopes de Oliveira.

Pirassununga
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

M149f Machado, Luciana Cristina
Formação de micropartículas de limoneno em polissacarídeos usado CO₂ supercrítico / Luciana Cristina Machado. -- Pirassununga, 2014.
112 p.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.
Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira.

1. Microencapsulação 2. Óleo essencial 3. RESS
4. PGSS 5. Supercrítico 6. CO₂. I. Título.

Aos meus queridos pais

Moacir Machado e Maria José da Silva Machado

Ao meu querido filho Murillo Machado Evangelista

Pelo incentivo constante,

Cujo apoio fora imprescindível e essencial para a realização deste trabalho

DEDICO

Pai Nosso
(uma tradução do aramaico)

Ó Pai-Mãe, respiração da vida e criador do Cosmos

Faça sua luz brilhar dentro de nós, para que possamos torna-la útil

Ajude-nos a seguir nosso caminho respirando o sentimento que emana de Ti e que o

Seu e o nosso desejo sejam um só

Dá-nos todos os dias o que necessitamos em pão e entendimento

Faça-nos sentir a alma da Terra dentro de nós e a sabedoria que existe em tudo

Não permita que as coisas superficiais nos iludam

E nos liberte de tudo o que nos impede de crescer

Amém.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a DEUS acima de tudo, por me conceder esta preciosa oportunidade, a todos os meus familiares, ao meu esposo Edílson José Guerra “*Strangneurur ranni*”, verdadeiro idealizador do “Nariz de Ouro”, por todas as conversas “inúteis”, porém, fundamentalmente necessárias e aos inúmeros amigos que, distantes ou próximos, brasileiros ou estrangeiros, direta ou indiretamente deram sua contribuição para a concretização deste trabalho: professores, funcionários, colegas de Graduação e Pós-Graduação da FZEA/USP, companheiros de “bandejão” e “laranjinha” e aos amigos do Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN): Débora Nascimento e Santos (Doutoranda), Edilson Patreze (Doutorando), Pedro Grande (Doutorando – México), Wallison Junio Martins da Silva (Doutorando), Heber Peleg Cornelio Santiago (Mestrando - Peru), Mirelle Dogenski (Mestre), Paola Aparecida Maressa de Oliveira (Mestre), Robson Humberto Rosa (Mestrando), Samira Souza Melo (Mestre), Alessandra Barros Verde (Iniciação Científica), Ana Carolina Velho (Iniciação Científica), Camila Marques da Costa (Iniciação Científica), Eliane Takahashi (Iniciação Científica), Gabriela Marques (Iniciação Científica), Karyne Nieves (Estagiária – Colômbia), Luiz Tadeu Bertoldi (Iniciação Científica), Maria Villegas (Estagiária – Colômbia), Rafael Almeida (Iniciação Científica), Victor Moraes de Rossi (Iniciação Científica), em especial a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Alessandra Lopes de Oliveira, cuja paciência, empenho e conselhos foram de extrema importância em meu crescimento profissional; Aos especialistas e técnicos responsáveis: Marcelo Thomazini (Laboratório de Produtos Funcionais – LAPROF); Ednelí Monterrey (Laboratório de Processos de Engenharia de Alimentos); Rodrigo Vinícius Lourenço (Laboratório de Microscopia e Caracterização de Micropartículas); Ana Monica Q. B. Bittante (Laboratório de Tecnologia de Alimentos); Vitor Bianchin Pelegati (Instituto de Fotônica Aplicada à Biologia Celular - INFABIC/UNICAMP), que contribuíram grandemente para a realização

das análises, em especial a Nilson José Ferreira (Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais - LTAPPN), pela generosidade, desprendimento e profissionalismo; A Fundação de Amparo à Pesquisa – FAPESP, pelo financiamento e viabilização desta pesquisa (e também por ser a patrocinadora oficial do meu fusquinha 1981!); Aos meus colegas de trabalho Atanásio Serafim Vidane, Fábio Sérgio Cury, Paloma da Silva Reimberg Damião e Donni Augusto Senhorini, por me auxiliarem no Laboratório de Anatomia dos Animais Domésticos, me dando o suporte necessário para escrever esta dissertação, bem como agradecer aos meus superiores diretos: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio (Caju) e Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles, por toda a colaboração e, acima de tudo, por compreenderem a importância deste trabalho; A Maria Aparecida Gonçalves (auxiliar de limpeza – Laboratório de Anatomia dos Animais Domésticos), cuja simpatia tornou meus dias mais agradáveis; Aos amigos Volnei Brito e Julio Rafael Pelissari, que pacientemente disponibilizaram tempo para me auxiliar na dificultosa “compilação dos resultados”, tampouco esquecer os “anjos de patas” que tanta felicidade me proporcionou no decorrer desta jornada: Nero (*Puma concolor*), Sheetara (*Leopardus tigrinus*), Anubis (*Chrysocyon brachyurus*), Hiro (*Rupornis magnirostris*), Thor (*Leopardus pardalis*), Hila (*Hypsiboas faber*), Hazel (*Felis catus*), Dolly (*Canis familiaris*), Pandora (*Canis familiaris*), Faísca e Fumaça (*Turdus amaurochalinus*), Gina (*Gymnophiona*) e Dejanira (*Felis catus*).

“É a possibilidade que me faz continuar, não a certeza: uma espécie de aposta de minha parte; E embora muitos possam me considerar tola, louca ou qualquer outra coisa, acredito que, com Deus, tudo se torna possível”.

Autor desconhecido

RESUMO

MACHADO, L.C. **Formação de micropartículas de limoneno em polissacarídeos usando CO₂ supercrítico** 2014. 112 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga (SP), 2014.

Este trabalho teve como objetivo a utilização da tecnologia que emprega CO₂ em estado supercrítico para estudar a formação de micropartículas de óleos essenciais encapsulados em polissacarídeos. O referido tema tem caráter inovador e inédito, já que a tecnologia supercrítica tem sido utilizada na formação e impregnação de partículas, principalmente de solutos sólidos, mas não tem sido aplicada na encapsulação de óleos essenciais. Os processos estudados, RESS (Rápida Expansão de uma Solução Supercrítica) ou o PGSS (Partículas de Soluções ou Suspensões em Gás Saturado) envolvem baixas temperaturas, possibilitando a não degradação de compostos voláteis e termossensíveis, tornando-os mais estáveis. Foram utilizados nesta pesquisa, polímeros que são, normalmente, utilizados no processo convencional de “aroma em pó”. Mesmo sendo insolúveis ou parcialmente solúveis em CO₂ supercrítico houve o intuito de aproveitar estudos comprovados de estabilidade de óleos essenciais encapsulados nestes materiais e ainda manter o custo do produto já que polissacarídeos tem, relativamente, baixo valor comercial, quando comparado aos polímeros que são empregados nos estudos que usam estes processos. Ensaio preliminares foram realizados com diferentes polímeros: Amido modificado, dextrina, maltodextrina e *Purity Gum Ultra®*, (gentilmente cedidos pela Corn Products, atual Ingredion Incorporated, Mogi Guaçu, SP, BR) no intuito de selecionar o material de parede mais apropriado para a microencapsulação do óleo essencial, representado pelo limoneno. Os resultados preliminares comprovaram que houve impregnação e possível microencapsulação do limoneno, observados e constatados através de análises de microscopia (óptica, eletrônica e de fluorescência confocal a laser) especialmente para *Purity Gum Ultra®*, a qual apresentou

comportamento desejável como estabilidade da dispersão preliminar e morfologia, em comparação com os outros polissacarídeos testados (dextrina, amido modificado e maltodextrina). Os ensaios subsequentes (dimensionamento das partículas, microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal na presença de fluoresceína, estabilidade térmica e quantificação do teor de limoneno microencapsulado) determinaram definitivamente a eficiência da *Purity Gum Ultra*® como polímero mais apropriado como agente encapsulante, e com isso foi demonstrada a eficiência da técnica proposta para esta finalidade. Ainda, a técnica de microencapsulação empregada (PGSS) apresentou valores significativos na retenção do limoneno com até 86% quando a suspensão foi preparada utilizando etanol (EtOH) e lecitina de soja como surfactante, sendo um relevante indicativo de que o processo de microencapsulação via PGSS proporcionou eficiente retenção do limoneno, além de apresentar outras vantagens sobre os processos de microencapsulação convencionais utilizados na indústria de alimentos. O processo de microencapsulação que utiliza CO₂ supercrítico é considerado como “tecnologia limpa”, aliado a este solvente ser considerado abundante, barato e ambientalmente seguro. Neste estudo constatou-se que, além do emprego de baixa temperatura no processo (50 - 60° C), não houve necessidade do emprego de água na suspensão.

Palavras-chave: microencapsulação, óleo essencial, RESS, PGSS, CO₂ supercrítico.

ABSTRACT

MACHADO, L.C. **Formation of microparticles of limonene in polysaccharides using supercritical CO₂** 2014. 112 p. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga (SP), 2014.

This study aimed to use the technology that employs CO₂ in supercritical state to study the formation of microparticles encapsulated essential oils in polysaccharides. The supercritical technology has been used in impregnating particles, mostly of solid solutes, but has not been applied to the encapsulation of essential oils. The studied processes RESS (Rapid Expansion of a Supercritical Solution) or PGSS (Particles Solutions or Suspensions in Saturated Gas) involving low temperatures, not allowing degradation of volatile and polymers that are normally used in the conventional process of "aroma powder" were used in this study. Even though it is insoluble or partially soluble in supercritical CO₂ proven in order to take advantage of the stability studies of encapsulated essential oils in these materials and still keep the cost of the product as polysaccharides have relatively low value when compared to the polymers that are employed in studies using these processes. Preliminary tests were performed with different polymers : modified starch, dextrin, maltodextrin and *Purity Gum Ultra* ® , (kindly provided by Corn Products , Current Ingredion Incorporated , Mogi , SP , BR) in order to select the most appropriate material for wall microencapsulation of essential oil , represented by limonene . Preliminary results showed that there was possible impregnation and microencapsulation of limonene , observed and recorded through analysis of microscopy (optical , electron and confocal) especially for *Purity Gum Ultra* ® , which showed desirable behavior such as dispersion and stability of primary morphology compared to other polysaccharides tested (dextrin, modified starch and maltodextrin) . Subsequent tests (particle sizing , scanning electron microscopy, confocal microscopy in the presence of fluorescein, thermic stability and quantification of the

limonene content microencapsulated definitely determined the efficiency of *Purity Gum Ultra*® as the most appropriate polymer as agent encapsulating and it has been demonstrated the efficiency of the proposed technique for this purpose. The technique employed for microencapsulation (PGSS) showed significant amounts of limonene retention of up to 86% when the suspension was prepared using ethanol (EtOH) and soy lecithin as surfactant. Being indicative of a material that microencapsulation by PGSS provided efficient retention of limonene, besides other advantages over conventional microencapsulation processes used in the food industry. The microencapsulation process that uses CO₂ supercritical is considered "clean technology" due to the low toxicity of CO₂ besides this solvent is considered abundant, inexpensive and environmentally safe. In this study it was found that, in addition to using low temperature process (50 - 60° C), there was no need for the use of water in suspension.

Key-words: Microencapsulation, essential oil, RESS, PGSS, supercritical CO₂.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema que representa o estado supercrítico para uma substância pura. (Fonte: BRUNNER, 2005).....	29
Figura 2. Sistema de formação de micro/nano partículas com CO ₂ supercrítico (RESS). (Fonte: Waters, 2011).....	33
Figura 3. Diagrama de fluxo do equipamento PGSS. (Fonte: Waters, 2011)	35
Figura 4. Estrutura molecular da fosfatidilcolina (FC). (Fonte: LEHNINGER, 2012).....	40
Figura 5. Polímeros testados como agente encapsulante (dextrina, amido modificado, <i>Purity Gum Ultra</i> ® e maltodextrina).....	46
Figura 6. Equipamento ULTRA-TURRAX® (IKA TS-25) utilizado no preparo de dispersões.....	47
Figura 7. Equipamento SFC/RESS (Thar Instruments Co. /Waters, Pittsburgh, USA).....	48
Figura 8. Esquema do princípio da microscopia confocal. (Fonte: Zeiss, 2011)	52
Figura 9. Processo de hidrodestilação em extrator de Clevenger, evidenciando a separação de fases no braço coletor.....	54
Figura 10. Curva padrão de limoneno para cálculo da concentração dos produtos extraídos das partículas.....	56
Figura 11. Reator ou vaso de dissolução com agitador e visor de safira onde se observam o comportamento da mistura em contato com o CO ₂ supercrítico.....	58
Figura 12. Separação de fases das dispersões preparadas com amido modificado, dextrina, <i>Purity Gum Ultra</i> ® e maltodextrina em EtOH hidratado em diferentes proporções.....	61
Figura 13. Estrutura observada na dispersão de <i>Purity Gum Ultra</i> ® (EtOH a 85%) através de microscópio óptico acoplado a câmera digital (aumento de 100 x).....	62

Figura 14. Visor de safira do vaso de mistura, no qual se observa visualmente a mudança de fase no processo.....	64
Figura 15. MEV do amido modificado puro sem tratamento e após diferentes condições de P e T do CO ₂ supercrítico no PGSS (aumento de 1000 x).....	65
Figura 16. MEV da dextrina pura sem tratamento e após diferentes condições de P e T do CO ₂ supercrítico no PGSS (aumento de 1000x).....	66
Figura 17. MEV da <i>Purity Gum Ultra</i> ® pura sem tratamento e após diferentes condições de P e T do CO ₂ supercrítico no PGSS (aumento de 1000x).....	67
Figura 18. MEV da maltodextrina pura sem tratamento e após diferentes condições de P e T do CO ₂ supercrítico no PGSS (aumento de 1000x).....	68
Figura 19. Estabilidade das dispersões de <i>Purity Gum Ultra</i> ® e amido modificado utilizando EtOH em diferentes proporções de hidratação (92,8% e 85%).....	70
Figura 20. Aspecto aglomerado da dispersão de amido modificado utilizando EtOH hidratado a 85% após agitação vigorosa.....	71
Figura 21. Característica apresentada pela dispersão de amido modificado em EtOH a 92,8% após processo PGSS.....	73
Figura 22. MEV em amostras de partículas formadas via PGSS que utilizaram amido modificado como material de parede limoneno como núcleo, EtOH hidratado a 92,8% e CO ₂ supercrítico (60°C e 120 bar) como solventes.....	74
Figura 23. MEV em amostras de partículas formadas via PGSS que utilizaram <i>Purity Gum Ultra</i> ® como material de parede, limoneno como núcleo, EtOH e CO ₂ supercrítico (60°C e 120 bar).....	76
Figura 24. MEV em amostras de partículas formadas via PGSS que utilizaram <i>Purity Gum Ultra</i> ® como material de parede, limoneno como núcleo e CO ₂ supercrítico (60°C e 120 bar) como solvente, aumentado em 100 e 600x.....	77
Figura 25. Caracterização de micropartículas através de análise de EDS; Electron Image A: Partículas de <i>Purity Gum Ultra</i> ®; Electron Image B: Partículas de <i>Purity Gum Ultra</i> ® com identificação de partículas de silício (TIXOSIL®) presentes na amostra.....	78

Figura 26. Intensidade da resposta das amostras à emissão do laser para diferentes comprimentos de onda. Amostra de partículas de *Purity Gum Ultra*® obtidas via PGSS, apresentando melhor resultado em emissões com laser de diodo em torno de 488nm.....79

Figura 27. Intensidade da resposta do Limoneno à emissão do laser para diferentes comprimentos de onda.....80

Figura 28. Micrografias de microscopia confocal de partículas de amido modificado a 488nm; **A:** partículas de amido modificado obtidas via PGSS com limoneno, lecitina de soja, TIXOSIL® sem EtOH e CO₂ supercrítico (60°C e 120bar) como solvente; **B:** partículas de amido modificado obtidas via PGSS com limoneno, lecitina de soja, TIXOSIL®, EtOH hidratado a 92,8% e CO₂ supercrítico (60°C e 120 bar) como solvente.....81

Figura 29. Fórmula estrutural do fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC). (Fonte: Sigma-Aldrich, 2008).....83

Figura 30. Micrografias de microscopia confocal de partículas de *Purity Gum Ultra*® a 488nm; **A e B:** partículas de *Purity Gum Ultra*® obtidas via PGSS com limoneno, lecitina de soja, TIXOSIL® sem EtOH e CO₂ supercrítico (60°C e 120 bar) como solvente; **C:** partículas de *Purity Gum Ultra*® obtidas via PGSS com limoneno, lecitina de soja, TIXOSIL®, EtOH hidratado a 85% e CO₂ supercrítico (60°C e 12 0bar) como solvente.....84

Figura 31. Micrografias confocal em micropartículas de *Purity Gum Ultra*® obtidas via PGSS com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína em sua composição; **A:** partículas de *Purity Gum Ultra*® obtidas via RESS/PGSS com limoneno, lecitina de soja, TIXOSIL® com EtOH 85% e CO₂ supercrítico (60°C e 120 bar) como solvente; **B:** partículas de *Purity Gum Ultra*® obtidas via PGSS com limoneno, lecitina de soja, TIXOSIL® com EtOH 99,9% e CO₂ supercrítico (60°C e 120 bar) como solvente.....85

Figura 32. Cromatogramas de Íons Totais (TIC) do etanol utilizado na lavagem das microcápsulas para remoção do limoneno aderido. Microcápsulas de *Purity Gum Ultra*® utilizando EtOH 85% na suspensão (—) e EtOH 99,9% (—).....87

Figura 32-1. Espectro de massa do limoneno e comparação de similaridade com o espectro da biblioteca NIST 08 e NIST 08s.....89

Figura 33. Cromatogramas de Íons Totais (TIC) dos produtos de hidrodestilação por extrator de Clevenger provenientes das microcápsulas de *Purity Gum Ultra*[®] formadas em suspensão de EtOH 85% e 99,9%.....90

Figura 34. Sobreposição dos Cromatogramas de Íons Totais (TIC) dos produtos de hidrodestilação por extrator de Clevenger provenientes das microcápsulas de *Purity Gum Ultra*[®] formadas em suspensão de EtOH 85% na suspensão (—) e EtOH 99,9% (—).....90

Figura 35. Observação do diâmetro das partículas (em µm) através de análise de distribuição do tamanho das partículas em amostras de *Purity Gum Ultra*[®] sem tratamento (A), EtOH 85% (B) e EtOH 99,9% (C).....94

Figura 36. Análise de Calorimetria exploratória diferencial (DSC) em amostras de lecitina de soja (—); Microcápsulas de *Purity Gum Ultra*[®] com EtOH 85% e 30% limoneno obtidas via PGSS (—); *Purity Gum Ultra*[®] pura (—) e *Purity Gum Ultra*[®] com EtOH 85% e 30% limoneno sem tratamento (—).....97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades críticas dos fluidos de interesse em processos supercríticos.....	25
Tabela 2. Valores de propriedades da substância nos estados: líquido, gás e supercrítico.....	30
Tabela 3. Massa de CO ₂ utilizada em cada ensaio na pressurização do vaso de dissolução para diferentes valores de P e T.....	59
Tabela 4. Tempo (em segundos) para que a decantação ou separação de fases da suspensão fosse observada após a homogeneização. Misturas com diferentes polissacarídeos e EtOH hidratado em diferentes proporções.....	60
Tabela 5. Massa do produto extraído pela hidrodestilação em Clevenger das cápsulas de <i>Purity Gum Ultra</i> ® com duas concentrações de EtOH na suspensão após decantação em funil de separação.....	86
Tabela 6. Concentração de limoneno nas análises <i>headspace</i> do etanol empregado na lavagem superficial das cápsulas e do produto da extração do núcleo das cápsulas via hidrodestilação.....	91
Tabela 7. Massa de limoneno encapsulada e massa perdida aderida à superfície das micropartículas formadas via PGSS utilizando polissacarídeo comercial <i>Purity GumUltra</i> ®.....	92
Tabela 8. Temperatura de transição vítrea (T _g) e temperatura de fusão (T _f) da lecitina de soja e da <i>Purity Gum Ultra</i> ® pura, na mistura e suas micropartículas formadas via PGSS.....	96

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASES	Aerosol Solvent Extraction Sistem
DE	Dextrose Equivalente
DSC	Differential Scanning Calorimetry
EDS	Eletroscoy Dispersive Energy ou Eletroscopia de energia Dispersiva
ES	Extração Supercrítica
FSC	Fluido Supercrítico
EtOH	Etanol
GC/MS	Cromatografia Gasosa acoplado com Espectrometria de Massas
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
P	Pressão
PC	Ponto Crítico
PGSS	Particles from Gas Saturated Solution or Suspension
RESS	Rapid Expansion of Supercritical Solution
rpm	Rotações por minuto
T	Temperatura
TE	Tempo Estático
TS	Tecnologia Supercrítica
TIC	Cromatograma de Íons Totais
Vz	Vezes
V	Volume

Sumário

1.INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1. Fluido Supercrítico	29
2.2. RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solutions)	31
2.3. PGSS (Particles from Gas Saturated Solution or Suspension)	34
2.4. Polissacarídeos	35
2.4.1. Maltodextrina	36
2.4.2. Amidos modificados	37
2.4.3. Dextrina	38
2.4.4. Purity Gum Ultra®	38
2.5. Lecitina de Soja	39
2.6. Limoneno	40
2.7. TIXOSIL®	41
3 OBJETIVOS	44
3.1. Objetivo geral	44
3.2. Objetivos específicos	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 Materiais	46
4.2 Métodos	46
4.2.1 Mistura e homogeneização das dispersões	46
4.2.2 Microencapsulação	48
4.2.3. Análise das partículas	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 Ensaio Preliminares	58
5.2. Formação de partículas via PGSS	71
5.3. Microscopia de varredura Confocal	78
5.4. Determinação do teor de Limoneno microencapsulado e caracterização do produto de extração pela análise da composição volátil por GC/MS	85
5.5. Análise de distribuição do tamanho das partículas	93

5.6. Estudo térmico por DSC	95
6. CONCLUSÕES	100
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	102
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
9. OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	112

1.Introdução

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de microencapsulação possibilita a proteção de componentes como pigmentos, aromas, acidulantes, microrganismos, dentre outros. Define-se como uma tecnologia de aprisionamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos, selados em cápsulas que liberam seu conteúdo em quantidades controladas em condições específicas (DZIEZAK, 1998). Estas minúsculas embalagens, denominadas “microcápsulas” têm tamanho e forma variados que dependem do material encapsulado, dos agentes naturais encapsulantes e da tecnologia empregada.

Dentre as metodologias usadas na formação de microcápsulas (*spray drying*, *spray cooling*, *spray chilling*, microencapsulação por extrusão, secagem por leito fluidizado, coacervação), existe uma que vem sendo recentemente estudada, demonstrando resultados promissores, que é a microencapsulação utilizando fluido supercrítico. Dentre estes processos, os que utilizam o CO₂ supercrítico como solvente têm sido os mais empregados, já que as propriedades de alta difusividade e densidade e baixa viscosidade possibilitam altas taxas de transferência de massa, além de ser um solvente com baixa toxicidade, abundante e barato. Fluidos supercríticos têm sido utilizados para encapsular materiais termossensíveis em processos similares ao *spray drying*, cujos conceitos e equipamentos podem ser aplicáveis. A maior vantagem deste processo sobre o *spray drying* é a ausência de água, pois o componente que será encapsulado não precisa estar disperso em uma solução aquosa e ainda, temperaturas relativamente baixas podem ser empregadas no processo. Assim, é um processo adequado para a encapsulação de materiais sensíveis como enzimas, aromas e compostos voláteis (GOUIN, 2004).

A tecnologia supercrítica (TS) é uma poderosa técnica que vem sendo utilizada nos processos de separação para obtenção de uma infinidade de produtos naturais em diversos

segmentos da indústria e da pesquisa, seja no ramo alimentício ou farmacêutico, e vários estudos têm sido feitos recentemente para se descobrir novas aplicações industriais para essa tecnologia. Vem sendo aplicada na produção industrial de café, chá e sementes de guaraná descafeinadas (SALDAÑA et al., 2002a) na extração de aromas, nicotina, óleos essenciais, ácidos graxos e na purificação de produtos farmacêuticos, o que demonstra o quanto esta tecnologia é promissora dentro desses segmentos (Sutter et al., 1994).

O ponto crítico (PC) de cada substância é caracterizado por sua temperatura, pressão e volume críticos (OLIVEIRA, 2006).

Fluidos supercríticos exibem propriedades físico-químicas intermediárias entre um gás e um líquido o que melhora sua função como solvente. Sua densidade relativamente alta provê um bom poder de solubilização, enquanto que sua viscosidade relativamente baixa e sua alta difusividade promovem um apreciável poder de penetração na matriz do soluto. A formação de partículas pelo emprego de CO₂ supercrítico tem se destacado como o maior desenvolvimento em aplicações tecnológicas deste solvente, principalmente na área farmacêutica, nutracêutica, cosmética e química. Tem sido atrativo pela eliminação de outros solventes orgânicos no processamento; entretanto, sua aplicação se restringe a produtos que sejam solúveis ou parcialmente solúveis em CO₂ supercrítico, ou seja, compostos com baixa polaridade. A forte dependência da solubilidade com a pressão (P) e temperatura (T) é um fenômeno crucial explorado nos processos que empregam fluidos supercríticos. Mudanças pequenas nos seus valores promovem grandes variações nas propriedades físico-químicas do solvente especialmente próximo ao ponto crítico (densidade, condutividade térmica, por exemplo) e por isso estas variáveis são diretamente relacionadas com o processo. Demais variáveis tais como a geometria do leito, o número de vasos extratores e a vazão de escoamento do solvente também interferem no desempenho da técnica. Geralmente, a escolha da P e da T baseia-se na solubilidade desejada ao soluto (ou

mistura de solutos) no solvente supercrítico. Essas características promovem condições ideais para solubilização. Quando a tecnologia supercrítica é empregada em processos de extração, pode seletivamente extrair componentes de mistura e o composto a ser extraído pode ser um ingrediente ativo de interesse como também um componente indesejável que precisa ser removido do produto final (MUKHOPADHYAY, 2000).

Diversos fluidos têm sido explorados como solventes para TS. Alguns deles são apresentados na Tabela 1. Contudo, o dióxido de carbono é o solvente mais popular devido às suas inúmeras vantagens frente aos outros. Seu ponto crítico, 31,06 °C e 73,8 bar, possui valores relativamente baixos, o que também o faz ideal para processos que envolvem compostos termossensíveis. O CO₂ não deixa resíduos no extrato uma vez que ele é um gás em condições ambientes. Além disso, a energia requerida para alcançar o estado supercrítico com o CO₂ é frequentemente menor do que a energia associada com o método convencional de destilação com solventes orgânicos. Em geral, o emprego da TS com CO₂ depende da ocorrência de grupos funcionais individuais dos componentes, de seus pesos moleculares e polaridades (MUKHOPADHYAY, 2000; REVERCHON & ADAMI, 2006).

Especificamente para os processos que envolvem formação de partículas, impregnação e encapsulação, revisões recentes têm apresentado as inúmeras aplicações e diferenciadas metodologias operacionais dos processamentos que empregam fluido supercrítico, as quais têm sido denominadas de acordo com a ação do fluido.

Jung & Perrut (2001) e Yeo & Kiran (2005) descrevem as metodologias empregadas no estudo de formação de partículas pelo emprego de fluido supercrítico e suas mais variadas aplicações. Adotando as nomenclaturas apresentadas por estes autores, alguns dos principais processos que têm sido empregados são o RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solutions), que consiste no bombeamento do CO₂ em condições desejadas de temperatura e pressão em um vaso de expansão com uma solução contendo o agente encapsulante e o

composto a ser encapsulado (substratos). A expansão dessa solução é feita através de um aspersor, que irá possibilitar a precipitação do substrato em um vaso à baixa pressão (unidade de precipitação), fazendo com que cause uma nucleação extremamente rápida em forma de pequenas partículas ou fibras e filmes quando a aspersão é direcionada sobre uma superfície. A morfologia das cápsulas formadas irá depender da estrutura do material e dos parâmetros de processo (T, P, distância e angulação do jato com a superfície de contato, tamanho da unidade de precipitação, etc.). Já nos processos GAS/SAS (Gas Anti-Solvent ou Supercritical Anti-Solvent); ASES (Aerosol Solvent Extraction System) e SEDS (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids), de maneira abrangente o fluido supercrítico é usado como anti-solvente, e proporcionará a precipitação do substrato inicialmente dissolvido em outra solução líquida.

Tabela 1. Propriedades críticas dos fluidos de interesse em processos supercríticos.

Fluido	Temperatura crítica T_c (K)	Pressão crítica P_c (bar)	Volume crítico V_c (cm ³ .mol ⁻¹)
CO ₂	304,12	73,7	94,07
Etanol	305,3	48,7	145,5
Propanol	369,8	42,5	200
Água	647,1	220,6	55,95
Amônia	405,4	113,5	72,47
n-hexano	507,5	30,2	368
Metanol	512,6	80,9	118

Fonte: MUKHOPADHYAY, 2000.

Outra técnica que pode ser aplicada na encapsulação por meio de CO₂ supercrítico refere-se à formação de partículas por soluções ou suspensões em gás saturado (PGSS, Particles from Gas-Saturated Solutions or Suspensions). Este processo consiste na dissolução de um fluido supercrítico numa solução ou dispersão do substrato num solvente líquido ou uma mistura liquefeita, seguido por uma rápida despressurização através de um

bocal que causa a formação de partículas sólidas ou de acordo com os constituintes empregados (JUNG & PERRUT, 2001, YEO & KIRAN, 2005).

No processo PGSS, o fluido supercrítico, solubilizado na mistura liquefeita, é pulverizado através de um bocal. Como resultado dos efeitos de redução de pressão e consequente o resfriamento que acompanha a expansão, a substância é solidificada, o que resulta na formação de partículas (YEO & KIRAN, 2005). Soluções aquosas também podem ser processadas por PGSS; neste caso, a solução contendo o soluto será saturada com fluido supercrítico e expandida através de um capilar para formar aerossóis (micropartículas). Este processo necessita, subsequentemente, da evaporação de água para a precipitação das soluções contendo solutos. As micropartículas de fármacos solúveis em água e materiais inorgânicos podem ser geradas desta maneira (FAGES et al., 2004).

Uma característica especial do PGSS é que, além de ser útil na produção de partículas de polímero puro, tem sido particularmente destinado a produzir partículas compostas de polímeros impregnados. O princípio básico do processo PGSS, a mistura de fluido supercrítico e de polímero sob elevada pressão, seguido pela despressurização rápida, pode ser aplicada com sucesso para incorporar ingredientes ativos em partículas poliméricas (JUNG & PERRUT, 2001, YEO & KIRAN, 2005).

Neste projeto de pesquisa as dispersões do limoneno em polissacarídeos foram estudadas com intuito de se obter cápsulas contendo o material. O processo RESS foi adotado para os polissacarídeos solubilizados ou não solubilizados quando em contato com o CO₂ supercrítico, como foi para a *Purity Gum Ultra*® ou o amido modificado. Para os demais agentes encapsulantes e insolúveis no CO₂, a denominação correta do processo empregado foi o PGSS.

Considerando o caráter inovador deste trabalho, principalmente no que se refere ao estudo da estabilização da emulsão antes da submissão ao RESS/ PGSS de forma a garantir

que o óleo essencial se mantenha na cápsula e não seja solubilizado pelo CO₂ em estado supercrítico, optou-se por utilizar o limoneno como modelo já que é abundante, com custo relativamente baixo e cujos compostos do processo oxidativo já são conhecidos.

2.Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fluido Supercrítico

Abaixo do ponto crítico uma substância pode existir como líquido ou vapor e acima deste ponto existe a região supercrítica, sendo que as variações das propriedades termodinâmicas nesta região podem ser intensas, causando diferentes efeitos em solutos e reagentes (SANDLER, 1989; BRUNNER, 2005) (Figura 1).

Figura 1. Esquema que representa o estado supercrítico para uma substância pura. (Fonte: BRUNNER, 2005).

Fluidos supercríticos são potencialmente solventes por terem densidade semelhante à de um líquido e viscosidade intermediária entre a de líquidos e gases, assim a difusividade dos solutos nos fluidos supercríticos tendem a ser maior que em solventes líquidos (GIBBS *et al.*, 1999) (Tabela 2). Dentre estes, o dióxido de carbono se destaca por ter temperatura crítica relativamente baixa (31°C), podendo ser empregado em processos nos quais se desejam produtos altamente purificados e sem perdas de componente termossensíveis. Citando essas vantagens, Sutter *et al.*, (1994), refere-se ao processo como “tecnologia

natural”, e justifica o uso do termo pela obtenção de extratos de alta qualidade, desprovidos de resíduos tóxicos.

Tabela 2. Valores de propriedades da substância nos estados: líquido, gás e supercrítico

Estado do fluido	Densidade (g/cm ³)	Difusividade (cm ² /s)	Viscosidade (gs/cm)
Gás			
P=1 atm, T=15-30°C	(0,6-2,0) x10 ⁻³	0,1-0,4	(0,6-2,0)x10 ⁻⁴
Líquido			
P=1 atm, T=15-30°C	0,6-1,6	(0,2-2,0)x10 ⁻⁵	(0,2-3,0)x10 ⁻²
Fluido supercrítico			
P≈P _c , T≈T _c	0,2-0,5	0,7x10 ⁻³	(1-3)x10 ⁻⁴
P≈4P _c , T≈T _c	0,4-0,9	0,2x10 ⁻³	(3-9)x10 ⁻⁴

Fonte: BRUNNER, 2005.

Visando às tecnologias que utilizam produtos naturais, especialmente em sensíveis campos, tais como aplicações em alimentos, essas demandas são refletidas nas mudanças na legislação, que se tornaram mais restritivas, com respeito à aplicação de produtos químicos na agricultura, pecuária e produtos alimentares. Em anos recentes, a importância dos processos que empregam fluidos supercríticos na produção de drogas farmacológicas tem aumentado consideravelmente. Processos como RESS (Expansão Rápida de Soluções Supercríticas), GAS (Gas Anti-Solvente), SAS (supercrítico Anti-Solvente) e PGSS (Partículas de Soluções ou Suspensões em Gás Saturado), têm sido amplamente estudados com resultados promissores. No entanto, no controle das características de partículas produzidas com estes processos ainda permanecem várias dificuldades, particularmente no caso de co-precipitação de compostos ativos em conjunto com materiais de suporte. A impregnação utilizando dióxido de carbono em estado supercrítico (CO₂ supercrítico) pode ser uma alternativa para a obtenção de microcápsulas com substâncias que necessitam de liberação controlada. Este processo permite incorporar o composto ativo em partículas

previamente formadas como material de suporte. Desta maneira, é mais fácil de controlar as propriedades do produto final, uma vez que a formação das partículas do material de suporte e a inclusão de substâncias ativas nessas partículas são realizadas em etapas separadas (STEVANUS et al., 2014).

A tecnologia de fluidos supercríticos tem várias propriedades vantajosas quando empregada na formação de partículas em comparação com métodos convencionais. Tais vantagens referem-se à pureza do produto final, à simplicidade do processo, a possibilidade de produção de fases sólidas com morfologias uniformes, possibilidade de obtenção de partículas finas com uma distribuição de tamanhos estreita além da vasta gama de materiais que podem ser processados (STEVANUS et al., 2014).

Considerando a pesquisa em tecnologia com fluído supercrítico, especificamente com o CO₂ cita-se nos últimos anos vários estudos com otimização de processos de extração (MARTÍN & COCCERO, 2012; POURASGHAR et al., 2012; STEVANUS et al., 2014), na formação de partículas (ASGHARI & ESMAEILZADEH., 2012; POURASGHAR et al., 2012; YU et al., 2012) e outras aplicações (TURK & BOLTEN, 2010; ROMER & KRASKA, 2010; RODRÍGUEZ-MEIZOSO et al., 2013). Isto demonstra que a TS continua tendo sua aplicação explorada em várias áreas do conhecimento, principalmente pelas características que apresenta.

2.2. RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solutions)

A expansão rápida de soluções supercríticas (RESS) é um promissor processo para a produção de partículas micrométricas e uniformes. Pode produzir microesferas livres de solventes orgânicos compostas por drogas carregadas por polímeros para a liberação controlada de agentes terapêuticos (TOM E DEBENEDETTI, 1991a); partículas de pós cerâmicos ultrafinos e quimicamente puros, ou misturas de precursores cerâmicos e pós

cristalinos empregados pela indústria farmacêutica na produção de fármacos para os quais as técnicas de redução de tamanho convencionais, tais como moagem e trituração, podem levar à degradação e consequente perda de bioatividade (CHANG & ORIEL, 1994). Na expansão de soluções supercríticas ocorre a perda do poder de solubilização do solvente (queda de P) e, conseqüentemente, a precipitação do soluto. Expansões rápidas (abaixo de 10 s), atingidas nos bocais e capilares, podem levar a condições de supersaturação e, portanto, à formação de pequenas partículas. Além disso, a redução da pressão é uma perturbação mecânica que ocorre à velocidade do som, favorecendo a re-estabilização rápida das condições uniformes do fluido em expansão. Esta combinação de supersaturação e rápida estabilização são características distintas do processo RESS, que pode ser projetado para produzir partículas pequenas e monodispersas. O princípio deste processo consiste então, em dissolver um soluto a alta pressão, aproveitando a solubilização do fluido supercrítico e precipitá-lo mecanicamente (por expansão rápida) (Figura 2), ao invés de termicamente como ocorre no processo convencional por *spray drying*, explorando assim a elevada compressibilidade do solvente. A utilização de solventes, com uma temperatura crítica moderada (por exemplo, o dióxido de carbono), permite esta transformação em condições brandas de temperatura e possibilita a aplicação desta técnica para uma grande variedade de materiais (CHANG & ORIEL, 1994).

A formação de partículas via RESS começou em 1984, quando Krukoni (1984) mostrou potencial técnico para o processamento de uma ampla variedade de sólidos de difícil fragmentação. Desde então, vários estudos experimentais exploratórios foram realizados, como a precipitação de polímeros puros, partículas de polímeros com drogas para fins terapêuticos, co-precipitação e formação de proteína em pó (TOM E DEBENEDETTI, 1991a; YEO et al., 1992).

As principais aplicações do RESS referem-se à formação de micropartículas para serem utilizadas em liberação controlada de fármacos terapêuticos (TOM E DEBENEDETTI, 1991a). O grande atrativo do RESS, neste caso, é a possibilidade de formar micropartículas livres de solventes orgânicos, incorporadas com drogas, em um único processo, evitando assim os passos de purificação morosos e dispendiosos que são associados com a precipitação da fase líquida em um dos processos convencionais de produção dessas partículas (por exemplo, solvente, evaporação do solvente e anti-solvente). Baseado nestas considerações pretende-se estabelecer uma compreensão do princípio fundamental das várias transformações que ocorrem durante o RESS (YEO et al, 1992).

Figura 2. Sistema de formação de micro/nano partículas com CO₂ supercrítico (RESS). (Fonte: Waters, 2011).

2.3. PGSS (Particles from Gas Saturated Solution or Suspension)

O PGSS é um processo em que um fluido supercrítico é dissolvido em um substrato ou vários substratos fundidos, ou em uma solução de substrato(s) em um solvente, ou em uma suspensão de substrato (s) em um solvente, seguido de uma expansão rápida, com pressões moderadas, da solução saturada através de um bocal (Figura 3). Dependendo da mistura (solução, dispersão) e do substrato(s), as partículas sólidas finas ou gotículas de líquido são formadas (JUNG & PERRUT, 2001). Este processo não exige que o transportador ou o material do núcleo sejam necessariamente, solúveis em um fluido supercrítico. No entanto, o fluido supercrítico deve ser altamente solúvel na fase líquida, o que torna o processo adequado para polímeros, que geralmente absorvem uma grande quantidade de CO₂. O processo PGSS também pode ser utilizado com suspensões de substratos ativos em um veículo (agente encapsulante), conduzindo para formação de micropartículas com componentes como fármacos, por exemplo (SHINE & GELB, 1997).

Uma das principais características do PGSS é a forte redução da viscosidade da do substrato fundido ou da dispersão do substrato quando misturado ao FSC. Um segundo efeito relaciona-se à temperatura de fusão que diminui durante a despressurização e propicia a solidificação das gotículas. Isto é geralmente atribuída a uma combinação do efeito Joule-Thomson e consequente arrefecimento, devido à evaporação do fluido supercrítico. Outras vantagens do processo PGSS referem-se à produção de partículas isentas de solventes orgânicos e baixo consumo de CO₂ (TURK et al., 2002).

Ao se tratar de materiais termossensíveis, o PGSS se caracteriza pela possibilidade de vasta aplicação, uma vez que a solubilidade de gases comprimidos em líquidos e sólidos é frequentemente elevada (STRUMENDO et al., 2007).

Figura 3. Diagrama de fluxo do equipamento PGSS (Fonte: Waters, 2011).

2.4. Polissacarídeos

Polissacarídeos são biopolímeros muito versáteis que podem ser encontrados na natureza sob as mais diversas formas, exercendo diferentes funções. Muitas vezes, podem ser extraídos das raízes, dos tubérculos, dos caules e das sementes de produtos vegetais, nos quais atuam como reserva de energia – como é o caso do amido, da inulina e dos galactomananos. Outras vezes, podem ser encontrados, na estrutura celular de tecidos vegetais, onde contribuem para a integridade estrutural e para a força mecânica, formando redes hidratadas tridimensionais – como é o caso das pectinas, em plantas terrestres, e das carragenanas, ágar e alginato, em plantas marinhas (LAPASIN & PRICL, 1999).

Os polissacarídeos estão sendo empregados em quantidades crescentes na tecnologia de alimentos como espessantes, estabilizantes, emulsificantes, agentes gelificantes, agentes microencapsulantes (material de parede), dentre outras funções. Como agente microencapsulante, protege os compostos voláteis das temperaturas elevadas e retendo até

mesmo os aromas mais delicados. Quando uma mistura é dissolvida para o preparo final do produto, os aromas aprisionados nas microcápsulas são liberados (STEPHEN & CHURMS, 1995a; LAPASIN & PRICL, 1999).

2.4.1. Maltodextrina

Maltodextrinas são polissacarídeos obtidos da hidrólise parcial do amido, formados por D-glicose ligadas na posição α - (1 $\rightarrow$ 4). Para ser denominado maltodextrina o polissacarídeo obtido da hidrólise do milho deve apresentar um valor de dextrose equivalente (DE) <20. Se o DE for ≥ 20 o polissacarídeo obtido da hidrólise do amido deve ser chamado xarope de milho sólido (SHAHIDI & HAN, 1993). Segundo Ré (1998), amidos hidrolisados como maltodextrinas e xaropes de milho sólidos são extensivamente utilizados para encapsulação de ingredientes alimentícios, por *spray drying*, devido a sua solubilidade em fase aquosa e baixa viscosidade.

Em função da maioria dos materiais ativos serem insolúveis em soluções aquosas, a capacidade de emulsificação é vista como um fator considerável na seleção do agente encapsulante. Maltodextrinas e xaropes de milho sólidos não apresentam capacidade emulsificante, por isso quando utilizados como agentes encapsulantes durante processos de encapsulação por *spray drying* normalmente não apresentam boa retenção de componentes voláteis. A razão atribuída à pobre retenção por esses agentes encapsulantes é a inabilidade de formação de filme. O agente encapsulante deve formar um filme ao redor da gotícula do material ativo para efetivamente retê-lo durante o processo, enquanto a mesma perde água (SHAHIDI & HAN, 1993).

A capacidade de proteger materiais ativos contra a oxidação é fortemente dependente do valor de DE da maltodextrina. Produtos com alto DE são extremamente estáveis e oferecem

ótima proteção. Credita-se este fenômeno a pequena permeabilidade ao oxigênio, o que permite uma boa proteção ao ingrediente encapsulado (REINECCIUS, 1991).

2.4.2. Amidos modificados

O amido é um material abundante e barato. Por outro lado, a viscosidade das soluções de amido é geralmente alta demais para a maior parte dos processos de encapsulação. Além disso, o amido não possui grupos hidrofóbicos, não exercendo, portanto, praticamente nenhum efeito estabilizante nas dispersões, a não ser pelo aumento da viscosidade (REINECCIUS, 1991).

O amido é um polímero com habilidade para o aprisionamento de moléculas. Tal capacidade encontrada deste carboidrato ocorre devido à sua fração amilase, que é capaz de formar estruturas helicoidais e assim, complexos muito estáveis.

Entretanto, devido à sua natureza hidrofílica, o amido e seus hidrolisados não possuem propriedades emulsificantes quanto aos ingredientes aprisionados em sistemas de liberação controlada (SHAHIDI& HAN, 1993). A produção de amidos modificados é uma alternativa que vem sendo desenvolvida há algum tempo com o objetivo de superar as limitações dos amidos nativos e assim aumentar a utilidade e aplicabilidade deste polímero pelas indústrias. As razões que levam à modificação do amido incluem: modificar as características de gelatinização, diminuir a retrogradação e a tendência das pastas em formarem géis; aumentar a estabilidade das pastas ao resfriamento e descongelamento, a transparência das pastas ou géis e a adesividade; melhorar a textura das pastas ou géis e a formação de filmes; adicionar grupamentos hidrofóbicos e aumentar o poder emulsificante (SILVA, 1999). O amido pode ser modificado quimicamente por meio de hidrólise parcial, o que acontece quando há reação do agente hidrofóbico com o CO₂ sob condições pré-determinadas de temperatura (T) e pressão (P). Com isso, o amido é atraído para a interface óleo-água de uma dispersão,

podendo assim ser utilizado como agente encapsulante. Um composto comumente utilizado para ligação ao amido é o octenilsuccinato. O polímero assim produzido tem boa dispersão em água e excelente retenção do material volátil de aroma após a secagem (REINECCIUS, 1991).

2.4.3. Dextrina

As dextrinas são um grupo de carboidratos de baixo peso molecular produzidas pela hidrólise do amido. São amplamente empregadas nas indústrias devido à sua baixa toxicidade (CARGILL FOODS, 2013).

Para se tornar dextrina, o amido é submetido a um processo de hidrólise, que divide as longas cadeias moleculares do amido. O material resultante é a dextrina, um carboidrato simples com um peso molecular relativamente baixo, que tem diferentes propriedades, dependendo da sua composição química. Normalmente as dextrinas são secas para que sejam mais fáceis de manusear e transportar. Como são solúveis em água, é muito fácil transformá-las novamente em uma solução líquida. Dependendo das condições de reação - pH, umidade, temperatura e tempo de tratamento - a dextrinização produz uma gama de produtos que variam de viscosidade, solubilidade em água fria, cor, conteúdo de redução e estabilidade, atendendo à diversas aplicações alimentícias (CARGIL FOODS, 2013).

2.4.4. Purity Gum Ultra®

Purity Gum Ultra® é um amido modificado inovador desenvolvido pela Ingredion, que possui um poder de dispersão muitas vezes superior aos amidos comuns. Ele tem sido mais

utilizado para a produção de dispersões de bebidas, mas considerou-se interessante testá-lo neste trabalho já que o uso de um emulsificante mais eficiente seria interessante.

Purity Gum Ultra® apresenta propriedades especiais, oferecendo poder emulsificante até quatro vezes em comparação com emulsificantes tradicionais, dobrando o volume de fabricação que pode ser produzido a partir da mesma quantidade de matéria-prima, reduzindo drasticamente os custos de processamento (INGREDION INCORPORATED, 2012).

2.5. Lecitina de Soja

A lecitina de soja é um ingrediente de baixo custo com propriedades emulsificantes, facilmente encontrado no mercado e que possui importantes propriedades nutricionais (SALGADO, 2007). A lecitina de soja contém fosfatidilcolina, sendo esta uma mistura de fosfolípídeos naturais constituídos por uma extremidade polar, formados por um grupo colina, e um grupo fosfato ligados à porção hidrofóbica, duas longas cadeias acílicas de 16 a 22 carbonos, por ligações ésteres com o glicerol (Figura 4). As cadeias acílicas podem conter uma ou mais insaturações. Devido à estrutura polar-apolar, ou seja, anfifílica, essas moléculas organizam-se com importantes funções biológicas, como por exemplo, as membranas celulares de organismos vivos. Imitando a natureza, cientistas vêm estudando as características de membranas utilizando fosfatidilcolina, no intuito de desenvolver novos sistemas para as mais diversas áreas, em especial nas ciências farmacêuticas e na biomedicina (CARACCILO et al., 2009; MERTINS et al., 2005). Atualmente a lecitina de soja é largamente empregada nas indústrias farmacêutica e cosmética como emulsificante, excipiente e na produção de lipossomas, bem como nas indústrias alimentícias e de tintas como estabilizante e emulsificante (MARON et al., 1999; SHAH, 2004). Há outros fosfolípídeos importantes, como a fosfatidiletanolamina e o fosfatidilinositol, porém para determinadas aplicações esses produtos requerem graus de pureza específicos. Com esta

preocupação, uma grande variedade de métodos de purificação da lecitina de soja foi desenvolvida nas últimas décadas, originando muitas patentes e publicações (Zhang et al., 2000; Zhang et al., 2004).

Figura 4. Estrutura molecular da fosfatidilcolina (FC). (Fonte: LEHNINGER, 2013).

2.6. Limoneno

Os hidrocarbonetos de vários tipos estruturais são comuns e normalmente abundantes em óleos essenciais, servindo geralmente como matéria-prima para perfumaria e reconstituição de aromas. Possui um anel de seis membros, monocíclico, contendo uma insaturação e uma unidade metil alílica exocíclica. O limoneno é um líquido com odor de limão e, é uma substância sensível a degradação, como por exemplo, a luz e oxigênio; sua oxidação normalmente gera mais de um produto. É empregado como fragrância em produtos domésticos e como componentes de óleos essenciais artificiais. Em grande quantidade também é utilizado como matéria-prima para produção de álcoois e cetonas terpênicas (BAUER & GARBE, 1985).

A principal fonte natural do limoneno é o óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis* L.), com teor acima de 90% deste monoterpreno. Outras fontes desta substância são o óleo de limão e o óleo de lima (BAUER & GARBE, 1985). Quanto ao processo de oxidação que pode ocorrer no limoneno, existem vários estudos na literatura. Westing et al. (1988) sugeriram que o produto de oxidação do limoneno mais facilmente identificado e

quantificado é o 1,2 – epóxido de limoneno. ANANDARAMAN & REINECCIUS (1986) observaram que a concentração de 1,2 – epóxido de limoneno e carvona podem ser bons indicadores químicos para a medida de estabilidade do óleo essencial de laranja encapsulado. Através da análise sensorial, os autores estabeleceram que a concentração de 2 mg de epóxido de carvona por g de óleo é o suficiente para que os provadores detectassem a oxidação sensorialmente. Desta forma, essa concentração estabelece o fim da vida útil para o óleo essencial de laranja encapsulado.

Substâncias como o álcool perílico, aldeído e ácido perílico são naturalmente formados, em pequenas quantidades, em óleo de limão e óleo “perilla”, portanto não servem como indicadores de oxidação. Por outro lado, são utilizadas como flavorizantes e antimicrobianos em produtos farmacêuticos (CHANG & ORIEL, 1994).

2.7. TIXOSIL®

TIXOSIL® é uma sílica desenvolvida recentemente, classificada como uma nova geração de sílicas inovadoras, sendo criada a partir do aglomerado esférico em forma de micropérolas. Esta linha abriu novas oportunidades para o mercado de suplementos alimentares sendo utilizada para a promoção de alto fluxo na pré-mistura evitando a formação de poeira ou aglomeração (RHODIA SOLVAY GROUP, 2013).

A sílica TIXOSIL® é amorfa. A linha é reconhecida como suplemento alimentar e atende totalmente aos requisitos das mais rígidas regulamentações internacionais. Quando usado em aplicações de higiene bucal, as sílicas de TIXOSIL® permitem polimento e melhor desempenho de higiene. TIXOSIL® é compatível com todos os ingredientes ativos e agentes terapêuticos e pode ser usado tanto em gel transparente quanto em gel colorido, tendo as seguintes aplicações: formulação agroquímica, antiespumante, biocidas,

suplementos alimentares, no processamento de polímeros, de alimentos, no processamento para secagem com spray e produção de creme dental (RHODIA SOLVAY GROUP, 2013).

Especificamente neste trabalho, TIXOSIL® foi utilizada com a função de se evitar aglomeração das partículas na despressurização do sistema RESS/PGSS.

3. Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo principal deste projeto foi estudar o emprego da tecnologia supercrítica, utilizando o CO₂ na microencapsulação de óleos essenciais, tomando como substância o monoterpeno limoneno como material a ser encapsulado e polissacarídeos como material de parede.

3.2. Objetivos específicos

- Estudou a formação de dispersão em etanol com diferentes proporções, amido modificado, dextrina, *Purity Gum Ultra*® e maltodextrina como agentes encapsulantes, limoneno como agente a ser encapsulado e lecitina de soja como surfactante;
- Verificou-se a estabilidade das dispersões para garantia da formação das cápsulas;
- Estudou-se processo de formação de partículas usando os métodos Rapid Expansion of Supercritical Solution /Particles from Gas Saturated or Suspension em diferentes condições de P e T, bem como a determinação das melhores condições para a obtenção de partículas micrométricas e morfologicamente regulares. Realizaram-se ensaios para a escolha do polímero mais apropriado no processo de microencapsulação via RESS/PGSS;
- Avaliou-se a retenção de limoneno nas microcápsulas utilizando-se análises de headspace via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS, Gas Chromatography/Mass Spectroscopy) e microscopia confocal a laser.

4. Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

- Materiais de parede das cápsulas testadas gentilmente cedido pela Ingredion Incorporated, Mogi Guaçu, SP, Brasil (Figura 5): Maltodextrina, dextrina, amido modificado e *Purity Gum Ultra*®.

Figura 5. Polímeros testados como agente encapsulante (dextrina, amido modificado, *Purity Gum Ultra*® e maltodextrina).

- Surfactantes: Lecitina de soja, granular (ACROS ORGANICS, New Jersey, USA);
- Agente anti-empelotamento: Sílica TIXOSIL 38A®, gentilmente cedido pela RHODIA SOLVAY GROUP, Paulínia, SP, Brasil;
- Material encapsulado: (R)-(+)-Limonene 97% (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA).

4.2 Métodos

4.2.1 Mistura e homogeneização das dispersões

Optou-se neste trabalho por verificar a proporção entre o material encapsulante e o agente a ser encapsulado em 10, 20 e 30% do agente encapsulado (limoneno). Esta condição foi adotada considerando o trabalho de Bertolini (1999), que foi escolhido como parâmetro

de comparação de métodos (convencional vs RESS/PGSS). Portanto, optou-se por empregar a proporção de 30% de polímero + surfactante em relação aos solventes etanol hidratado (EtOH+H₂O) e CO₂ e 10% de limoneno em relação ao polímero. Após adequação da mistura, as proporções entre os constituintes da mistura foram alteradas. Assim, a dispersão apresentou em sua constituição 100g de CO₂ (80%) e 25g de EtOH, (20%) perfazendo um total de 100% de solventes. Também se levou em consideração que ao ser acrescido o anti-aglomeração (TIXOSIL®), mesmo em pequenas quantidades, a proporção de sólidos total adotada (30%), propostos por Bertolini (1999) seria alterada. Dessa forma, esta massa de anti-aglomerante foi considerada no balanço de massa e as dispersões foram preparadas contendo 10g de polímero, 0,003g de TIXOSIL 38A®, 1g de D-limoneno e 0,5g de lecitina de soja (mantendo a proporção de 30% de sólidos totais presentes na amostra) e 25g de EtOH hidratado em diferentes concentrações (99,9%, 92,8%, 85% e 80%). Estas misturas foram feitas para cada um dos diferentes polímeros (amido modificado, dextrina, *Purity Gum Ultra*® e maltodextrina). As misturas preparadas foram vigorosamente cisalhadas a 5.000 rpm em um equipamento ULTRA-TURRAX® (IKA-T25, Hamburgo, GE) por um tempo de 3 min, da mesma forma como feito por Bertolini (1999) (Figura 6).

Figura 6. Equipamento ULTRA-TURRAX® (IKA TS-25) utilizado no preparo de dispersões.

4.2.2 Microencapsulação

Tanto o RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solution) quanto o PGSS (Particles from Gas Saturated Solution or Suspension), são constituídos por três etapas básicas. A primeira constitui na formação da dispersão seguida do contato com o CO₂ em estado supercrítico no vaso de mistura, em seguida ocorreu a despressurização ou expansão da mistura na câmara de formação de partículas.

Neste processo foram estudadas as melhores condições de P e T no vaso de reação/dissolução de maneira a propiciar alterações físico-químicas na mistura para que partículas estáveis e uniformes fossem formadas, sendo utilizado tanto para o processo RESS, quanto para PGSS o equipamento SFC/RESS (Thar Instruments Co./Waters, Pittsburgh, USA) (Figura 7).

Na câmara de expansão também foram controladas as condições de P e T, além do diâmetro do aspersor com o mesmo objetivo de promover cápsulas estáveis, íntegras e uniformes.

Figura 7. Equipamento SFC/RESS (Thar Instruments Co. /Waters, Pittsburgh, USA).

4.2.3. Análise das partículas

A principal referência na avaliação das partículas apresentada nesta dissertação de mestrado foi o estudo feito por Bertolini (1999), que analisou a encapsulação e a estabilidade de partículas utilizando o limoneno por métodos convencionais, sendo esta referência o parâmetro de comparação na análise da eficiência dos processos empregados (RESS/PGSS).

4.2.3.1. Microscopia óptica

A microscopia óptica auxiliou na verificação da morfologia da dispersão no preparo da mistura do etanol hidratado com o agente encapsulante, o material a ser encapsulado limoneno e o surfactante. Nesta etapa utilizou-se um microscópio óptico (Bel View 6.2.3.0, Milan, IT) com câmera digital de 1.3 mega pixels acoplada em objetiva com o aumento de 100 vezes. As amostras encapsuladas contendo 30% do material a ser encapsulado ou material de núcleo foram fixadas em lâminas empregando-se óleo de silicone como agente dispersante. Todos os polímeros (amido modificado, dextrina, *Purity Gum Ultra®* e maltodextrina) foram analisados em sua forma pura.

4.2.3.2. Estudo morfológico e de superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise de eletroscopia de energia dispersiva (EDS)

O estudo morfológico da composição das micropartículas contendo o Limoneno foi realizado por microscopia eletrônica de varredura utilizando um MEV (Hitachi TM 3000, Kyoto, Japão), a partir da fixação das amostras em um filme dupla face de carbono para análise, o que possibilitou a observação da morfologia das partículas e sua comparação com os polímeros sem terem sofrido qualquer tratamento.

O EDS (Energy Dispersive X Ray Detector, conhecido também como EDX ou EDS) é um acessório essencial no estudo de caracterização microscópica de materiais. Quando o

feixe de elétrons incide sobre um mineral, os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida a qual é emitida em comprimento de onda no espectro de raios-X. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede esta energia associada aos elétrons. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais os elementos químicos que estão presentes e assim identificar em instantes quais minerais constituem a amostra. O diâmetro reduzido do feixe permite a determinação da composição mineral em amostras de tamanhos muito reduzidos (< 5 micrômetros) (UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO, 2012).

O uso em conjunto do EDS com o MEV é de grande importância, uma vez que o MEV proporciona a geração de imagens (ainda que virtuais, pois o que se vê no monitor do computador é a transcodificação da energia emitida pelas partículas, ao invés da radiação emitida pela luz). O EDS permite imediata identificação da constituição da amostra já que possibilita o mapeamento da distribuição de elementos químicos por distribuição de tamanho, gerando mapas composicionais dos elementos presentes. A análise de eletroscopia de energia dispersiva (EDS) permitiu a identificação das substâncias presentes nas partículas geradas via RESS/PGSS. Os espectros foram obtidos em 30 s com voltagem de aceleração de 15 kV (UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO, 2012).

4.2.3.3 Análise de distribuição de tamanho das micropartículas

Análises da distribuição de tamanho das partículas formadas no RESS/PGSS foram realizadas, empregando um analisador de partículas por difração a laser semiconductor SALD (Shimadzu, Kyoto, Japão), em comprimento de onda de 375nm o qual forneceu dados do diâmetro de partículas entre 0,01 e 300 μm . As microcápsulas foram acondicionadas em células de quartzo e dispersas em etanol 99%.

4.2.3.4 Estudo morfológico e de superfície por microscopia Confocal

A microscopia eletrônica Confocal é uma técnica capaz de visualizar, em profundidade, células, tecidos vivos e tecidos fixados, sem coloração prévia ou não (Claxton et al., 2005). Nesta técnica, o material é escaneado com uma série de muitos e estreitos feixes de luz, denominados também de cortes ópticos, sendo as imagens destes campos recuperadas individualmente e depois reconstituídas para formar a imagem completa, que é construída como um mosaico de partes combinadas (LACEY, 1991). As imagens obtidas de planos focais específicos ou cortes ópticos são transferidas para um computador e são reconstruídas tridimensionalmente de forma a obter uma imagem no total. Logo, os microscópios tradicionais trabalham com imagens analógicas e os de fluorescência a laser trabalham com imagens digitais (TABOGA, 2001).

O microscópio Confocal utiliza como fonte de luz o laser. Seu sistema óptico é o mesmo da de fluorescência tradicional, com exceção de que a iluminação se dá somente em pequenos pontos incididos pelo laser (Alberts et al., 1994). A Figura 8 ilustra o funcionamento da microscopia eletrônica Confocal, na qual pode ser observada que a luz emitida pela fonte laser ultrapassa uma pequena abertura incidindo em direção a um espelho dicróico. A reflexão do laser por este espelho é dirigida em um plano local determinado, incidindo pontualmente na amostra. A fluorescência emitida dos pontos deste plano ultrapassa o espelho dicróico e é focalizado, como um ponto Confocal, em um segundo orifício (pinhole), posicionado no diafragma, em frente ao detector. Toda emissão de fluorescência que for proveniente de pontos distintos do plano focal (luz fora de foco) não são detectadas e não contribuem à formação de imagem.

Figura 8. Esquema do princípio da microscopia Confocal (Fonte: Zeiss, 2011).

O estudo morfológico e de superfície das micropartículas contendo o limoneno foi feito por microscopia eletrônica Confocal. As imagens foram obtidas em um microscópio eletrônico Confocal Upright Zeiss Axio Examiner (ZEISS, Jena, GE) com um sistema de varredura acoplado ZEISS LSM 780, com laser de 405 a 633nm, sendo os de 458, 488 e 514 nm com laser de Argônio; 405, 561, 594 e 633 nm com diodo, do Instituto de Biofotônica (INFABIC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Todos os lasers instalados foram testados a 405 nm com UV, 458, 488 e 514 nm com Argônio, 561 nm, 594 nm e 633 nm com diodo (HeNe). O laser a 488 nm foi o utilizado nestas análises por apresentar a maior intensidade de resposta da emissão. As objetivas utilizadas apresentando aumento de 10 e 20 $\times$ (Plan-Apochromat 10x/0.30 Dry; Plan-Apochromat 20x/0.50 Dry), foram utilizadas para a investigação da estrutura interna das partículas. A detecção foi realizada com detectores de 32 canais GaAsP com capacidade de separar espectralmente 2.9 nm (internos ao sistema de varredura) e 2 canais de fluorescência PMTs com detecção de 400 a 700 nm. A metodologia utilizada foi embasada nos estudos de Paramita et al. (2012). As

lâminas para microscopia foram preparadas, colocando uma pequena quantidade de amostra (pó) e recobertas com lamínula. As amostras de *Purity Gum Ultra*® e de amido modificado puderam ser observadas com grande detalhamento.

4.2.3.5 Estudo da caracterização termo-oxidativa pela técnica de DSC

A estabilidade termo-oxidativa realizadas para o limoneno, para o agente encapsulante puro e misturado com o surfactante e nas amostras de micropartículas contendo limoneno encapsulado foi verificada através da análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC). Os termogramas foram obtidos em um calorímetro diferencial de varredura DSC-TA2010 controlado por um módulo acoplado a um analisador térmico TA5000 (TA – Instruments Thermal Analysis, New Castle, USA). Os dados coletados pela análise de DSC foram obtidos utilizando-se uma razão de aquecimento mínimo de 10 °C/ min, em atmosfera dinâmica de ar e de nitrogênio (N₂), com vazão de gás da ordem de 45 mL/ min, sob pressão atmosférica, com temperatura máxima de 250 °C.

4.2.3.6 Determinação do teor de Limoneno microencapsulado

Da mesma forma como realizado por Bertolini (1999), o processo de recuperação do óleo essencial (limoneno) microencapsulado foi feito por hidrodestilação em extrator de Clevenger (Figura 9A). Esta técnica teve por objetivo comprovar o aprisionamento do óleo essencial limoneno por meio do rompimento das microcápsulas para liberação e quantificação do material microencapsulado.

Para tanto, uma quantidade de 10g de cada amostra de microcápsulas formadas via RESS/PGSS foi lavada com 10 mL de EtOH 99,9% para remoção do limoneno possivelmente impregnado na superfície externa do polissacarídeo. Após agitação manual por 1 min., a amostra foi filtrada à vácuo. O EtOH permeou pela membrana de filtração reduzida de 0,22µm (Millipore®, Merck, Darmstadt, GE). Esta solução de EtOH contendo

limoneno aderido à superfície das cápsulas foi acondicionada em frasco *headspace* envolto por papel alumínio e armazenada em temperatura de -18°C para posterior análise de GC/MS.

A amostra em pó resultante da filtração foi acondicionada em um balão de fundo redondo de 500 mL, contendo 150 mL de água desmineralizada (MilliQ®, Darmstadt, GE) e uma pequena quantidade de esferas de vidro para evitar a formação de espuma durante o aquecimento. O balão acoplado a um extrator de Clevenger (Figura 9) sofreu aquecimento a 100°C em manta térmica acoplada a um termostato para que a temperatura fosse controlada e permanecesse constante.

Figura 9. Processo de hidrodestilação em extrator de Clevenger, evidenciando a separação de fases no braço coletor.

Da mesma forma como realizado por Bertolini (1999), manteve-se o processo de hidrodestilação por 2h a partir do momento em que o vapor, proveniente da suspensão em ebulição adentrou no corpo do extrator dando início à condensação, desencadeando a separação dos produtos.

O produto da hidrodestilação foi transferido do braço coletor do extrator de Clevenger (Figura 9) para um funil de separação sendo a fase aquosa desprezada e determinada às massas da fase leve (contendo o limoneno) em balança analítica (Shimadzu, AUG 220, Tokyo, JP) e analisado por GC/MS.

Cromatografia gasosa acoplada em espectrometria de massas (CG/EM) (GC/MS QP 2010 Plus, Shimadzu, Tokyo, JP) foi utilizada na quantificação do limoneno encapsulado. Nesta análise, utilizou-se uma coluna capilar Rtx®-5MS (30 m × 0,25 mm id × 0,25 µm df, 5% difenil/ 95% dimetilpolisiloxano) (Restek, New York, USA) e hélio, como gás de arraste a uma pressão interna de 60 psi. Injetou-se 5µL do vapor de limoneno formado no frasco de análise por *headspace*, o qual foi aquecido em um forno acoplado ao sistema de injeção do equipamento mantido à 70° C por 10 min, sendo agitado à 250 RPM durante 5s com intervalos de 2s. A razão de divisão ou razão de split foi de 1: 20. A temperatura do forno foi regulada de forma a se obter uma rampa linear de 60 a 246°C em uma gradiente de 3°C/min (PIERCE & ADAMS, 2009). A energia de ionização foi de 70 eV na fonte, e a faixa de varredura de massas foi de 50 a 500m/z. O tratamento dos espectros foi feito através do software GC/MS solutions ver. 2.5, que possui como base de dados às bibliotecas NIST 08 e NIST 08s.

A determinação do teor do óleo essencial (limoneno) microencapsulado, aquele derivado da lavagem superficial ou removido das cápsulas, foi feita por normalização externa. Soluções de limoneno em etanol foram preparadas em diferentes concentrações (de 1 a 120 mg/g), estas soluções (5 mL) foram acondicionadas em frascos *headspace*, os quais

foram submetidos à 70°C por 10 min sob agitação, como descrito anteriormente. O vapor gerado (5µL) foi injetado nas mesmas condições de análise das amostras. A área dos picos do limoneno extraído foi comparada com aquelas das soluções de limoneno, expressas em uma curva padrão (Figura 10).

A equação gerada pela regressão linear da curva padrão, que relaciona a concentração de limoneno com a área dos picos foi empregada no cálculo das concentrações. Vale salientar que todas as análises (amostras e padrão) foram feitas por *headspace*.

Figura 10. Curva padrão de limoneno para cálculo da concentração dos produtos extraídos das partículas.

4.2.3.7 Eficiência da microencapsulação

Determinada a quantidade de limoneno encapsulado, foi possível calcular a eficiência da microencapsulação, que foi dada pela seguinte relação (Equação 1).

$$\% \text{Eficiência da encapsulação} = \frac{C_{\text{limoneno}}^{\text{final}}}{C_{\text{limoneno}}^{\text{formulação}}} \times 100 \quad [1]$$

Que expressou a relação entre a porcentagem de limoneno recuperada na extração das cápsulas limoneno (C_{final}) pela concentração de limoneno na formulação ($C_{\text{formulação}}$) inicial.

5. Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaios Preliminares

Face à inexistência de literatura especializada que serviriam como referência para execução de investigação, os ensaios preliminares fizeram-se necessários para nortear o desenvolvimento deste trabalho.

Inicialmente, os polímeros puros maltodextrina, dextrina, amido modificado e *Purity Gum Ultra*® foram submetidos a ensaios preliminares no vaso de mistura do equipamento SFC/RESS (Figura 11) em quatro diferentes condições de temperatura e pressão (50°C e 100 bar; 50°C e 120 bar; 60°C e 100 bar; 60 °C e 120 bar) a uma rotação de 1.250 rpm dentro do vaso de dissolução (Figura 8). Estas condições de P e T além do tempo de processo de 45 min. e tempo de despressurização de 1 min. foram definidos com base nos resultados de trabalhos de outros autores (BERTOLINI, 1999; YEO & KIRAN, 2005; VARONA et. al., 2010).

Figura 11. Reator ou vaso de dissolução com agitador e visor de safira onde se observam o comportamento da mistura em contato com o CO₂ supercrítico.

Estes ensaios proporcionaram uma observação prévia da morfologia de cada polímero utilizado neste experimento para adequar alguns deles aos objetivos propostos. A partir das variáveis de processo empregadas (P e T) também houve o intuito de empregar aquelas mais ajustadas ao pretendido. Para cada ensaio observou-se também, em função de P e T, a massa de CO₂ consumida no processo. Estabelecida à temperatura desejada, o CO₂ foi bombeado para o sistema até que se atingisse a pressão escolhida. A massa média de CO₂ utilizado durante a pressurização do reator, variando P e T nos processos foi de aproximadamente 113g (Tabela 3).

Tabela 3. Massa de CO₂ utilizada em cada ensaio na pressurização do vaso de dissolução para diferentes valores de P e T

Amostra	50 °C 100 bar	50 °C 120 bar	60°C 100 bar	60°C 120 bar	Média da massa de CO ₂ (g)
Amido modificado	112	119	102	126	115 ±10,25
Dextrina	112	102	106	111	108 ±4,65
<i>Purity Gum Ultra®</i>	114	137	99	149	125 ±22,48
Maltodextrina	112	102	101	110	107 ±5,56
Média	112,5 (±1,0)	115,0 (±16,7)	102,0 (±2,9)	124 (±18,2)	
Média Total (m)					113,4 (±13,8)

Conhecer a massa de CO₂ se fez necessária ao balanço de massa para que se mantenha a proporção solvente/polímero/limoneno nos experimentos, já que esta proporção foi estabelecida em 30% de polímero + surfactante, 10% de limoneno e 20% de etanol (EtOH) ou mistura EtOH + H₂O. A concentração de surfactante (lecitina de soja) foi de 5% da massa de polissacarídeo.

A massa de CO₂ variou para as diferentes condições de P e T e do tipo de polissacarídeo empregado na solução (Tabela 3). Atentou-se para manter a massa de CO₂

para cada ensaio específico nos experimentos subsequentes. Garantido o balanço de massa, a mistura nas proporções estabelecidas que fossem submetidas à encapsulação/impregnação utilizando fluído supercrítico (RESS ou PGSS) foi analisada antes de submetê-las ao vaso de mistura do equipamento SFC/RESS. Esta análise constituiu na avaliação da estabilidade da suspensão formada via agitação no homogeneizador. As observações visuais destes ensaios estão descritos na Tabela 4 e Figura 12.

Tabela 4. Tempo (em segundos) para que a decantação ou separação de fases da suspensão fosse observada após a homogeneização. Misturas com diferentes polissacarídeos e EtOH hidratado em diferentes proporções.

Polímero	EtOH (99,9%)	EtOH (92,8%)	EtOH (85%)	EtOH (80%)	EtOH (70%)
Amido modificado	15	17	aglomerou	aglomerou	aglomerou
Dextrina	3	15	15	40	35
<i>Purity Gum Ultra®</i>	1	15	30	15	aglomerou
Maltodextrina	15	11	aglomerou	aglomerou	aglomerou

Estes ensaios preliminares objetivaram encontrar a dispersão mais estável por um maior período sem que fosse observada a separação de fases e aglomeração. Em todas as dispersões foram observadas a desestabilização em tempos diferentes. Para a dextrina e *Purity Gum Ultra®*, o tempo de desestabilização da dispersão aumentou quanto maior foi à hidratação do etanol (85 e 80%) já para o amido modificado e a maltodextrina, houve aglomeração instantânea a partir da mistura com etanol hidratado a 80% (Tabela 4). Com estes testes preliminares, foi possível identificar a diferença de comportamento entre os polímeros testados.

Amido modificado + EtOH hidratado a 99,9, 92,8 e 85%.

Purity Gum Ultra® + EtOH hidratado à 99,9, 92,8, 85, 80 e 70%

Dextrina + EtOH hidratado à 99,9, 92,8, 85, 80 e 70%

Maltodextrina + EtOH à 99,9, 92,8 e 85%

Figura 12. Separação de fases das dispersões preparadas com amido modificado, dextrina, *Purity Gum Ultra®* e maltodextrina em EtOH hidratado em diferentes proporções.

Figura 13. Estrutura observada na dispersão de *Purity Gum Ultra®* (EtOH a 85%) através de microscópio ótico acoplado a câmera digital (aumento de 100x).

Visualmente nota-se também a diferença no comportamento dos diferentes polímeros. A separação de fases para o amido modificado e a maltodextrina apresentou-se acentuada independentemente da porcentagem de hidratação do EtOH, fenômeno que não foi observado para a dextrina e *Purity Gum Ultra®* em algumas condições (Figura 12). Estes testes preliminares foram feitos com intuito de empregar uma suspensão mais homogênea nos processos RESS/PGSS, acreditando que a não ocorrência da separação de fases estariam propiciando uma melhor interação das partículas sólidas dispersas no etanol hidratado acrescido de limoneno.

Nestes testes preliminares, logo após a homogeneização destas misturas, foram analisadas possíveis formações de aglomerados na suspensão via microscopia óptica. Verificou-se a presença de algumas estruturas semelhantes à microcápsulas somente para o polímero *Purity Gum Ultra*® com limoneno em aumento de 100x (Figura 13).

Paralelamente ao estudo das misturas, todos os polímeros puros foram submetidos ao PGSS/RESS. Para verificar as mudanças na estrutura dos diferentes polímeros com o solvente supercrítico, os primeiros ensaios direcionaram-se para estabelecer o contato e verificar, em um primeiro momento, o seguinte:

1) Observar visualmente a mudança de fase pelos visores de safira do vaso de mistura

Nestes ensaios preliminares, notou-se que durante a pressurização do sistema, até que ele atingisse as condições do processo, que o polímero sob agitação dentro do vaso de mistura (Figura 14A), deixou de ser visualizado separadamente do solvente. Nesta condição não foi mais observado “visualmente” a diferenciação das fases (Figura 14B). Estes ensaios foram realizados com todos os polímeros e o mesmo comportamento evidenciado. Com esta observação empírica, mesmo que visual, constatou-se que transformações físicas ocorreram durante o processo.

Estes ensaios preliminares tiveram como intuito a observação visual de uma possível solubilização do polímero no CO₂ supercrítico nas diferentes condições de pressão e temperatura (Figura 11). Além disso, avaliou-se a estrutura dos materiais (polissacarídeos) antes e depois da rápida expansão em solução supercrítica. Teoricamente, estes polímeros são insolúveis em CO₂ supercrítico, no entanto, considerou-se neste trabalho, a hipótese de que mudanças físicas ocorreram durante o contato entre o polímero e o solvente (CO₂ supercrítico). Em busca de explicar o fenômeno, com restrições experimentais, já que a solubilidade dos polímeros no CO₂ supercrítico não foi medida, duas considerações foram

feitas. Os polissacarídeos, como o amido, por exemplo, são hidrofílicos e não interagem com o CO_2 , no entanto, os amidos modificados sofrem alterações em sua estrutura o que os proporcionam hidrofobicidade, assim, o amido modificado e a *Purity Gum Ultra®* foram tratados como polissacarídeos que interagiram com o CO_2 . A partir destas observações julgou-se prudente determinar o processo de encapsulação usando o CO_2 supercrítico como PGSS (Particles from Gas Saturated or Suspension).

Uma segunda consideração refere-se à utilização de outros materiais insolúveis em CO_2 que também têm sido empregados na formação de micropartículas, como por exemplo, a quitosana, um polissacarídeo. No trabalho de Mertins et al. (2005) micro grãos de quitosana foram formados via processo supercrítico, no qual a quitosana passou por vários tratamentos preliminares e ao final o CO_2 supercrítico foi utilizado para a remoção do solvente. A quitosana é insolúvel no CO_2 supercrítico, mas este interferiu consideravelmente na estrutura do material.

A. Início da pressurização do reator (CO_2 + polímero)

B. CO_2 + polímero nas condições do processo (60°C/120bar)

Figura 14. Visor de safira do vaso de mistura, no qual se observa visualmente a mudança de fase no processo.

2) Observar a estrutura dos polissacarídeos por microscopia eletrônica de varredura antes e após o contato com CO_2 supercrítico

Outra observação preliminar foi verificar possíveis alterações no polímero após contato com o CO₂ supercrítico. Os polissacarídeos tiveram sua estrutura modificada pelo processo.

Sem tratamento

50°C e 100 bar

50°C e 120 bar

60°C e 100 bar

60°C e 120 bar

Figura 15. MEV do amido modificado puro sem tratamento e após diferentes condições de P e T do CO₂ supercrítico no PGSS (aumento de 1000x).

Sem tratamento

50°C e 100 bar

50°C e 120 bar

60°C e 100 bar

60°C e 120 bar

Figura 16. MEV da dextrina pura sem tratamento e após diferentes condições de P e T do CO₂ supercrítico no PGSS (aumento de 1000x).

Sem tratamento

50°C e 100 bar

50°C e 120 bar

60°C e 100 bar

60°C e 120 bar

Figura 17. MEV da *Purity Gum Ultra®* pura sem tratamento e após diferentes condições de P e T do CO₂ supercrítico no PGSS (aumento de 1000x).

Sem tratamento

50°C e 100 bar

50°C e 120 bar

60°C e 100 bar

60°C e 120 bar

Figura 18. MEV da maltodextrina pura sem tratamento e após diferentes condições de P e T do CO₂ supercrítico no PGSS (aumento de 1000x).

Na análise da MEV dos polissacarídeos puros antes e após o contato com o CO₂ supercrítico (Figuras 15 e 16) constatou-se que houve variação nas suas características físicas. Ocorreu micronização das partículas de amido modificado (Figura 14) quando submetidos ao processo com temperatura de processo de 50° C, independentemente da pressão. Quando se empregou temperatura de 60° C, observou-se pouca diferença no tamanho das partículas e uma aglomeração mais acentuada. Para a dextrina (Figura 16) nenhuma variação morfológica acentuada foi observada. Não se constata diferenciação no tamanho e forma das partículas antes e após ser submetida ao tratamento PGSS com CO₂ supercrítico.

A forma e estrutura da *Purity Gum Ultra*® foram consideravelmente modificadas quando submetida ao PGSS com CO₂ supercrítico, principalmente quando aplicado maiores valores de pressão (120 bar), independentemente da temperatura. Notou-se uma fragmentação do polissacarídeo, como se a estrutura tivesse sido rompida (Figura 17).

Para a maltodextrina, independentemente das condições de P e T aplicadas ao processo PGSS, observou-se, nas micrografias, uma considerável diminuição no tamanho das partículas (Figura 18).

O PGSS foi eficiente, no que se refere à capacidade de micronização das partículas da maioria dos polímeros testados e alterações morfológicas mais significativas foram observadas nas amostras submetidas às condições de 60°C e 120 bar, com agitação de 45 min. no reator.

Com base nos resultados obtidos a partir da realização destes ensaios preliminares, constatou-se que o amido modificado (Figura 15) e a *Purity Gum Ultra*® (Figura 17) sofreram interação com o CO₂ mais evidentes, diferentemente do que pôde ser observado com a maltodextrina e a dextrina, cujas alterações morfológicas não foram expressivas, a não ser a micronização da maltodextrina (Figura 18). Esta interação com o CO₂ utilizado

no processo pelos polímeros *Purity Gum Ultra*® e amido modificado, são justificadas pela presença de grupos hidrofóbicos de ambos os polímeros. Ainda assim, dispersões preparadas com os polímeros *Purity Gum Ultra*® (dispersão mais estável com EtOH hidratado 85%, sem separar fases por 40s) apresentaram melhores resultados, sendo o mesmo comportamento observado para a dispersão de amido modificado (dispersão mais estável com EtOH hidratado 92,8% , por 10s). O comportamento apresentado pelo polissacarídeo *Purity Gum Ultra*® é devido às suas propriedades hidrofóbicas, consequentemente, levando-o a interagir com o CO₂, se comparado ao amido modificado. A *Purity Gum Ultra*® ainda apresentou estabilidade em dispersão preparada com EtOH hidratado a 92,8%, mas a separação de fases foi mais acelerada (10s), o que não aconteceu com o amido modificado para esta mesma hidratação no etanol. Ao se preparar a solução de amido modificado com EtOH hidratado a 85% ocorreu aglomeração, deixando a mistura não homogênea mesmo durante a vigorosa agitação orbital (vortex) (Figuras 19 e 20).

Figura 19. Estabilidade das dispersões de *Purity Gum Ultra*® e amido modificado utilizando EtOH em diferentes proporções de hidratação (92,8% e 85%).

Figura 20. Aspecto aglomerado da dispersão de amido modificado utilizando EtOH hidratado a 85% após agitação vigorosa.

5.2. Formação de partículas via PGSS

A partir das análises preliminares, observando-se as misturas de polímeros e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) além das condições de P e T empregadas no PGSS, delinearam-se novos ensaios, os quais foram realizados com o intuito de verificar qual o polímero mais adequado para utilização como agente encapsulante. A morfologia dos polímeros *Purity Gum Ultra®* e amido modificado demonstraram-se morfolologicamente adequadas, com características esféricas regulares não observadas nos demais polímeros (dextrina e maltodextrina), bem como por apresentarem dispersões mais estáveis, com tempo de homogeneidade maior, evitando a separação de fases quase que instantânea ocorrida para os outros polímeros. Os ensaios passaram então a ser feitos com *Purity Gum Ultra®* e amido modificado, desta forma estes dois polímeros foram estudados neste trabalho como material de parede no processo de microencapsulação.

A partir destes novos testes, as dispersões contendo os polímeros (amido modificado e *Purity Gum Ultra*®) e o limoneno foram submetidas ao processo de formação de partículas via PGSS. Dispersões preparadas com amido modificado (utilizando-se EtOH hidratado a 92,8%) foram submetidas, no vaso de mistura do equipamento, a T de 60°C e P de 120 bar. Após este tempo, procedeu-se à despressurização do sistema. Neste processo, a mistura homogeneizada no vaso de mistura deveria sair para a câmara de expansão juntamente com o solvente (CO₂ supercrítico), no entanto isso não ocorreu. Assim que o sistema foi desestabilizado pela despressurização, a homogeneização da mistura dentro do reator se modificou fazendo com que não fosse possível sua coleta pelo bico aspersor na câmara de expansão. Após a despressurização do sistema observou-se um aglomerado viscoso, totalmente aderido ao reator (Figura 21). Este aglomerado apresentou aparência elástica, mas logo que foi retirado enrijeceu e tornou-se praticamente seco.

Os ensaios realizados com dispersões de *Purity Gum Ultra*® em EtOH hidratado a 85% e 92,8% nas mesmas condições realizadas com dispersões de amido modificado apresentaram-se, também, com característica elástica, ficando totalmente aderidas ao equipamento. Nos ensaios nos quais foram utilizados dispersões com cada um dos polissacarídeos (amido modificado e *Purity Gum Ultra*®) utilizando EtOH hidratado a 99,9%, a amostra não aglomerou. Assim, a dispersão não foi desestabilizada nesta fase do processo como nas outras condições. No entanto, durante a despressurização, uma quantidade do polímero seguiu para a câmara de expansão juntamente com o CO₂. A quantidade remanescente foi retirada diretamente do vaso de mistura. Isto se deve à insolubilização dos polissacarídeos no CO₂ supercrítico no momento da despressurização, quando a pressão cai bruscamente. Na despressurização rápida, houve a formação das partículas em pó e, como apontado na literatura, no processo de formação de partículas via

PGSS este comportamento é coerente já que Varona et al., (2010) sugerem para esse procedimento um período de até 1 min.

Figura 21. Característica apresentada pela dispersão de amido modificado em EtOH a 92,8% após processo PGSS.

Após a formação de partículas via PGSS, os materiais coletados foram acondicionados em pequenos frascos devidamente identificados, envoltos com papel alumínio para impedir contato com a luz e armazenados em temperatura de refrigeração (8°C). Nestas amostras foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) visando verificar possível formação de microcápsulas em amostras contendo amido modificado e *Purity Gum Ultra®* como material de parede e limoneno como núcleo. Com o emprego desta técnica microscópica foi possível identificar as diferentes conformações estruturais do material formado dependendo da constituição da dispersão.

As dispersões contendo amido modificado com limoneno e EtOH hidratado a 92,8% submetidos ao PGSS com CO₂ supercrítico (60° C e 120 bar) geraram, após a despressurização, uma pasta que em poucos segundos enrijeceu. Para que tomasse uma

aparência livre de solvente e com aspecto de trituração possível, estas pastas foram colocadas em dessecador durante sete dias. Este material foi triturado manualmente em almofariz, suas partículas foram separadas em um jogo de quatro peneiras e coletadas aquelas que possuíam diâmetros de até 30 μm . Vale ressaltar que o odor de limoneno era extremamente intenso durante a trituração manual, indicando uma possível liberação do volátil já que o material antes da trituração, quando no dessecador, não exalava odor.

Imagens de microscopia eletrônica do material formado após PGSS da dispersão com amido modificado como material de parede, limoneno como núcleo, EtOH hidratado a 92,8% e CO_2 supercrítico (60°C e 120 bar) como solvente, mostrou que o material formado foi homogêneo (Figura 22). Constataram-se poros na massa do polissacarídeo e conformação bem diferenciada das partículas de amido modificado puro, antes e após ter sido submetido ao PGSS, no entanto este tipo de análise, embora permita a micrografia de partículas não indica a eficiência da encapsulação, ou mais especificamente para este material, da impregnação.

Figura 22. MEV em amostras de partículas formadas via PGSS que utilizaram amido modificado como material de parede limoneno como núcleo, EtOH hidratado a 92,8% e CO_2 supercrítico (60°C e 120 bar) como solventes.

Nos ensaios realizados utilizando *Purity Gum Ultra®* como material de parede, diferentes conformações de estrutura de material foram obtidas. Ao utilizar na dispersão o

EtOH hidratado a 85% o material formado foi semelhante ao amido modificado. A pasta obtida também foi seca em dissecador, triturada manualmente e o pó de partículas menores que 30 µm foram analisadas por MEV. Estas partículas também tinham aparência maciça com pequenos poros nos quais se considera que o limoneno foi impregnado (Figura 22). Forte odor exalado durante a maceração de partículas quando possui voláteis como material de núcleo é um indicativo de que foi incorporado ao material, neste caso, impregnado.

Especificamente para a *Purity Gum Ultra*® optou-se por fazer uma mistura utilizando EtOH absoluto (99,9%). Embora a mistura inicial tenha demonstrado uma rápida separação de fases, decidiu-se por averiguar como seria o material formado após agitação no reator do PGSS a 1.250 rpm com CO₂ supercrítico. Partículas de polímeros esféricas e uniformes são típicas de material formado a partir do processo de secagem em spray-dryer, técnica utilizada na produção de polímeros derivados do amido, como é o caso da *Purity Gum Ultra*®. Levando em consideração que o CO₂ em estado supercrítico altera as propriedades físicas dos polímeros, e observando a conformação do material obtido após a despressurização rápida no vaso de mistura quando EtOH 99% foi empregado na dispersão (Figura 23), nota-se que as partículas continuaram com suas características esféricas com diferentes tamanhos (Figura 17), algumas rompidas e umas menores que as outras. Não se notam partículas de conformações diferentes como seria para o TIXOSIL e a lecitina de soja. O mesmo comportamento foi observado quando se optou por não utilizar EtOH (Figura 23), neste caso a mistura foi feita no próprio vaso de mistura com agitação de 1.250 rpm por 45 min., utilizando como solvente somente o CO₂ em estado supercrítico (60° C e 120 bar). Para estes dois casos, o material obtido era constituído de partículas com coloração uniforme (pó branco) com liberação de limoneno quando esmagado. Outra constatação da mudança na estrutura do polímero *Purity Gum Ultra*® após o processo via

PGSS, refere-se ao aspecto do pó obtido. Embora uniforme, no momento da despressurização sua conformidade aparentava um aglomerado, facilmente desfeito após manipulação (Figura 24).

EtOH 85% (aumento de 1.000x)

EtOH 85% (aumento de 1.500x)

EtOH 99,9% (aumento de 1.000x)

EtOH 99,9% (aumento de 1.500x)

Figura 23. MEV em amostras de partículas formadas via PGSS que utilizaram *Purity Gum Ultra®* como material de parede, limoneno como núcleo, EtOH e CO₂ supercrítico (60° C e 120 bar).

Como foi feita a utilização de TIXOSIL® como agente anti-aglomeração e não se constatou a presença da sílica nas análises de MEV houve a necessidade de evidenciar a presença da sílica na amostra. Para isso, as partículas obtidas após o processo de encapsulação via PGSS utilizando *Purity Gum Ultra®* como agente encapsulante, foram submetidas a uma análise de eletroscopia de energia dispersiva (EDS), sendo o EDS

acoplado ao equipamento de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e, portanto, realizados concomitantemente com a obtenção das micrografias.

Figura 24. MEV em amostras de partículas formadas via PGSS que utilizaram *Purity Gum Ultra*® como material de parede, limoneno como núcleo e CO₂ supercrítico (60° C e 120 bar) como solvente, aumentado em 100 e 600x.

Na análise de MEV das partículas formadas via PGSS utilizando *Purity Gum Ultra*® e TIXOSIL® não foi possível detectar a presença da sílica, como se constata nas Figuras 23 e 24. A análise de EDS, por indicar os componentes presentes na amostra, pôde demonstrar que a TIXOSIL® é um dos constituintes do pó proveniente deste processo. Em uma das imagens selecionadas a partir da amostra das micropartículas de *Purity Gum Ultra*® (Figura 25A), as partículas eram constituídas de carbono e oxigênio em maiores quantidades, o que é um indicativo de que se tratava do polímero. Em outro momento, selecionou-se uma imagem (Figura 25B) em conformação esférica, mas com aspecto diferente das demais, na qual foi detectado grande presença de silício em sua composição, o que está indicado pelo espectro que acompanha a imagem (Figura 25).

Figura 25. Caracterização de micropartículas através de análise de EDS; **Electron Image A:** Partículas de *Purity Gum Ultra*®; **Electron Image B:** Partículas de *Purity Gum Ultra*® com identificação de partículas de silício (TIXOSIL®) presentes na amostra.

5.3. Microscopia de varredura confocal

Neste trabalho a microscopia Confocal foi utilizada como mais uma ferramenta no intuito de verificar a ocorrência de microencapsulação via PGSS utilizando amido modificado e *Purity Gum Ultra*®, já que a MEV propicia as micrografias das partículas, mas não distingue o núcleo do material de parede ou mesmo a impregnação do óleo essencial, neste caso representado pelo limoneno.

A fluorescência de polissacarídeos é baixa, e, pode-se mesmo afirmar que o amido não é fluorescente. No entanto, nestas análises de microscopia de varredura Confocal, vários comprimentos de onda do laser foram incididos sobre as amostras de polissacarídeos (*Purity Gum Ultra*® e amido modificado) até que fluorescência fosse observada, o que

ocorreu para uma faixa de comprimento de onda entre 405 a 508. No entanto, especificamente para a *Purity Gum Ultra*®, o pico de fluorescência, mesmo em baixa intensidade, ocorreu a 488 nm (Figura 26).

Figura 26. Intensidade da resposta das amostras à emissão do laser para diferentes comprimentos de onda. Amostra de partículas de *Purity Gum Ultra*® obtidas via PGSS, apresentando melhor resultado em emissões com laser de diodo em torno de 488nm.

O limoneno não possui fluorescência, tanto que tem sido utilizado como substituto da parafina em análises histológicas de células que usam microscopia de varredura Confocal (Wynnchuk, 1994). Análises de microscopia de varredura Confocal foram realizadas para o limoneno puro na mesma faixa de comprimento de onda visando à confirmação de que este componente não estaria emitindo nenhum tipo de fluorescência na faixa que foi

observada para o amido. A intensidade do limoneno é extremamente baixa para qualquer comprimento de onda estudado (Figura 27).

Figura 27. Intensidade da resposta do limoneno à emissão do laser para diferentes comprimentos de onda.

A partir destas observações, verificou-se que, a partir das micrografias que as partículas formadas via PGSS a partir dos diferentes polissacarídeos poderiam estar impregnando e/ou encapsulando o Limoneno.

Na análise do amido modificado com limoneno, lecitina de soja, TIXOSIL®, sem EtOH e CO₂ supercrítico (60°C e 120 bar) como solvente apresentaram (Figura 28A), considerando que o amido modificado apresenta fluorescência e o limoneno não, pode-se levantar a hipótese de que o limoneno está impregnado na superfície do polímero, visto aos pontos escuros espalhados entre as manchas que florescem. No entanto, ao se observar as partículas de amido modificado com limoneno, formadas via PGSS com CO₂ supercrítico

(60 °C e 120 bar) a partir da dispersão contendo lecitina de soja, TIXOSIL® e 20 % de EtOH hidratado a 92,8%, levanta-se a hipótese de que microcápsulas foram formadas (Figura 28B). Para este caso específico não se observa opacidade na estrutura superficial da imagem e algumas regiões não fluorescentes das partículas podem ser inerentes ao núcleo formado pelo limoneno encapsulado pelo amido modificado.

A

B

Figura 28. Micrografias de microscopia confocal de partículas de amido modificado a 488nm; **A:** partículas de amido modificado obtidas via PGSS com limoneno, lecitina de soja, TIXOSIL® sem EtOH e CO₂ supercrítico (60°C e 120bar) como solvente; **B:** partículas de amido modificado obtidas via PGSS com limoneno, lecitina de soja, TIXOSIL®, EtOH hidratado a 92,8% e CO₂ supercrítico (60°C e 120bar) como solvente.

Na análise das partículas formadas a partir de *Purity Gum Ultra*® com limoneno o mesmo fenômeno foi observado com algumas particularidades. Ainda, levando em consideração a fluorescência do polissacarídeo e a não-fluorescência do limoneno, julga-se que a encapsulação tenha ocorrido já que há opacidade em algumas regiões das partículas como se fosse o núcleo completo com limoneno e a superfície fluorescente com a *Purity Gum Ultra*® (Figuras 28 A e B). Supõe-se ainda que ao invés de encapsulação, especificamente para as partículas formadas via PGSS com CO₂ supercrítico utilizando na dispersão EtOH hidratado a 85%, ocorreu impregnação já que na imagem (Figura 30C) não há uma região de núcleo definida. Este comportamento diferiu do amido modificado já que a impregnação foi observada nas partículas formadas via PGSS sem o EtOH como constituinte da mistura (Figura 28A).

Novas análises de microscopia de varredura Confocal foram realizadas com intuito de certificar-se de que o núcleo das partículas de amido modificado e *Purity Gum Ultra*® seria o limoneno, uma vez que o vazio de microcápsulas também pode gerar imagens semelhantes às Figuras 28B e 30A e B. Para isso, no momento da microscopia, adicionou-se uma solução de isotiocianato de fluoresceína a 1%, sobre as partículas.

O isotiocianato de fluoresceína (FITC) é um dos fluoróforos mais empregados em análises de microscopia de varredura Confocal, ou seja, uma substância utilizada como “marcador ou corante” de moléculas, e possui comprimentos de onda de excitação e emissão variáveis entre 485 e 521 nm. Hidrofílico, ele confere à substância maior quantidade de ligações duplas na sua fórmula estrutural, possibilitando a visualização (Figura 29) (GOLIM, 2007).

Figura 29. Fórmula estrutural do fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC). Fonte: (Sigma-Aldrich, 2008).

A solução de fluoresceína (1%) em contato direto com as microcápsulas promovia sua dissolução, fazendo com que fossem desestabilizadas, impedindo qualquer possibilidade de observação. Assim, para que as microcápsulas fossem coradas sem correrem o risco de serem solubilizadas, optou-se pela adição de uma pequena quantidade da solução de isotiocianato de fluoresceína a 1% como constituinte da mistura no processo de preparação das microcápsulas. Além da amostra, depois de submetida ao PGSS ter resultado na obtenção de um pó com características de coloração ligeiramente amarelada, nenhuma outra alteração foi visualmente constatada. Novamente observou-se a fluorescência no material de parede (*Purity Gum Ultra®*) e a mancha escura que representaria o material encapsulado (Figura 31). Algumas micrografias dão a impressão de que tenha ocorrido impregnação (Figura 31A) e outra encapsulação (Figura 31B).

Figura 30. Micrografias de microscopia confocal de partículas de *Purity Gum Ultra*® a 488nm; **A e B:** partículas de *Purity Gum Ultra*® obtidas via PGSS com limoneno, lecitina de soja, TIXOSIL® sem EtOH e CO₂ supercrítico (60°C e 120bar) como solvente; **C:** partículas de *Purity Gum Ultra*® obtidas via PGSS com limoneno, lecitina de soja, TIXOSIL®, EtOH hidratado a 85% e CO₂ supercrítico (60°C e 120bar) como solvente.

Figura 31. Micrografias confocal em micropartículas de *Purity Gum Ultra®* obtidas via PGSS com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína em sua composição; A: partículas de *Purity Gum Ultra®* obtidas via PGSS com limoneno, lecitina de soja, TIXOSIL® com EtOH 85% e CO₂ supercrítico (60°C e 120bar) como solvente; B: partículas de *Purity Gum Ultra®* obtidas via PGSS com Limoneno, lecitina de soja, TIXOSIL® com EtOH 99,9% e CO₂ supercrítico (60°C e 120bar) como solvente.

Com base nas considerações feitas na análise de microscopia de varredura confocal visualizou-se a presença do limoneno nas partículas formadas. No entanto, não foi possível concluir a respeito da impregnação ou da encapsulação do limoneno no interior das micropartículas, o que seria de grande importância na avaliação da eficiência do processo PGSS para este fim. Ainda, considerando a baixa intensidade da fluorescência do amido, optou-se por confirmar a encapsulação do composto volátil pela análise da concentração de limoneno no produto obtido da extração após o rompimento das cápsulas.

5.4. Determinação do teor de limoneno microencapsulado e caracterização do produto de extração pela análise da composição volátil por GC/MS

As cápsulas formadas via PGSS utilizando *Purity Gum Ultra®* como agente encapsulante, lecitina de soja como auxiliar surfactante, TIXOSIL® como anti-aglomerante, EtOH hidratado 85% ou EtOH 99,9% com limoneno (30%) foram analisadas com relação à eficiência da encapsulação. O processo PGSS à 60°C e 120 bar foi feito em

triplicata para estas suspensões. Uma quantidade maior de limoneno (30%, o que equivale a 3g) foi necessária à mistura para que pudesse ser coletado após extração via hidrodestilação utilizando aparelho de Clevenger. A massa de limoneno extraída das cápsulas (Tabela 5) indica que ao empregar EtOH hidratado (85%) na mistura propiciou o encapsulamento ou uma eficiência de 96% de limoneno, no entanto, quando utilizado EtOH puro na dispersão, o encapsulamento caiu para 42% de eficiência. Para ambos os processos considera-se eficiente a encapsulação do limoneno em *Purity Gum Ultra*®.

Tabela 5. Massa do produto extraído pela hidrodestilação em Clevenger das cápsulas de *Purity Gum Ultra*® com duas concentrações de EtOH na suspensão após decantação em funil de separação

Suspensão empregada na formação via PGSS (60° C/120 bar)	Massa Limoneno (g)			Média (g)
<i>Purity Gum Ultra</i> ® com EtOH 85% e 30% Limoneno	2,9	2,8	3,1	2,93 ± 0,15 ^a
<i>Purity Gum Ultra</i> ® com EtOH 99,9% e 30% Limoneno	1,3	1,4	1,1	1,27 ± 0,15 ^b

Médias na mesma coluna e seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si ($p < 0,05$).

Considerando erros esperados na quantificação gravimétrica do limoneno, já que o composto teve que ser separado da água após a hidrodestilação, o que pode acarretar na presença de moléculas de água aderidas ao produto nesta separação, fato constatado, por exemplo, em uma das medidas (Tabela 5) que gerou 3,1g sendo que o máximo de limoneno adicionado à suspensão foi de 3g, outras investigações foram necessárias. Outra consideração negativa às análises gravimétricas refere-se à natureza do composto já que o limoneno é altamente volátil, mesmo a temperatura ambiente.

Ainda, buscando a averiguação da presença de limoneno no etanol utilizado para lavagem das cápsulas, antes da extração via Clevenger, análises cromatográficas foram feitas tanto no limoneno extraído das cápsulas quanto no etanol de lavagem das mesmas.

O cromatograma de Íons Totais (TIC) (Figura 32) mostra a presença do limoneno no etanol utilizado na lavagem das cápsulas. A confirmação de que o único pico encontrado no etanol de lavagem é oLimoneno foi feito pela similaridade de espectro da biblioteca NIST 08 e NIST 08s do software do GC/MS (Figura 32-1).

Figura 32. Cromatogramas de Íons Totais (TIC) do etanol utilizado na lavagem das microcápsulas para remoção do limoneno aderido. Microcápsulas de *Purity Gum Ultra*[®] utilizando EtOH 85% na suspensão (—) e EtOH 99,9% (---).

O teor de limoneno presente no interior das cápsulas formadas via PGSS com *Purity Gum Ultra*[®], lecitina de soja, TIXOSIL[®], EtOH hidratado 85% e EtOH 99,9% com limoneno (30%), avaliados por GC/MS é apresentado na Figura 32-1. Os produtos obtidos da hidrodestilação em extrator de Clevenger para a extração de limoneno, mostra tanto para as cápsulas obtidas utilizando EtOH (85%) quanto para a que utilizou EtOH (99,9%), que o

principal componente foi mesmo o limoneno, com outros pequenos picos interferentes não identificados.

Logo na comparação dos TICs já se nota que a intensidade dos picos (eixo y) para o limoneno da solução de etanol utilizada na lavagem das cápsulas (Figura 32) é muito inferior àquela do limoneno extraído do interior das cápsulas (Figura 33). Mas de forma genérica, as diferentes amostras provenientes das microcápsulas de *Purity Gum Ultra*® apresentaram comportamentos semelhantes, sendo o limoneno o principal componente.

Na sobreposição dos picos de limoneno (Figura 34) visualiza-se que a intensidade do limoneno no material extraído das cápsulas quando elaboradas com etanol 99,9% na suspensão foi maior que quando se utilizou etanol 85%. A área de integração dos picos para as análises realizadas em triplicata, tanto para a solução de etanol com o limoneno aderido à superfície das cápsulas como para o limoneno extraído do núcleo via hidrodestilação são apresentados na Tabela 6. A concentração de limoneno no etanol de lavagem superficial das cápsulas de *Purity Gum Ultra*® foi inferior àquela do interior das cápsulas, indicando que o limoneno foi aprisionado no interior do polissacarídeo.

Figura 32-1. Espectro de massa do limoneno e comparação de similaridade com o espectro da biblioteca NIST 08 e NIST 08s.

Figura 33. Cromatogramas de Íons Totais (TIC) dos produtos de hidrodestilação por extrator de Clevenger provenientes das microcápsulas de *Purity Gum Ultra*[®] formadas em suspensão de EtOH 85% e 99,9%.

Figura 34. Sobreposição dos Cromatogramas de Íons Totais (TIC) dos produtos de hidrodestilação por extrator de Clevenger provenientes das microcápsulas de *Purity Gum Ultra*[®] formadas em suspensão de EtOH 85% na suspensão (—) e EtOH 99,9% (—).

Tabela 6. Concentração de limoneno nas análises *headspace* do etanol empregado na lavagem superficial das cápsulas e do produto da extração do núcleo das cápsulas via hidrodestilação.

Suspensão empregada na formação via PGSS (60°C/120bar)	TR (min)	Área Integrada dos picos	Concentração (mg/g)*
<i>Purity Gum Ultra</i> ® com EtOH 85% e 30% limoneno (Extração das cápsulas)	7,22	94.566.807	15,97 ± 4,59 ^b
<i>Purity Gum Ultra</i> ® com EtOH 85% 30% limoneno (Etanol de lavagem)	7,21	797.002	0,40 ± 0,11 ^c
<i>Purity Gum Ultra</i> ® com EtOH 99,9% e 30% limoneno (Extração das cápsulas)	7,19	65.807.660	26,17 ± 3,22 ^a
<i>Purity Gum Ultra</i> ® com EtOH 99,9% e 30% limoneno (Etanol de lavagem)	7,24	903.255	0,51 ± 0,10 ^c

* média ± desvio padrão expresso em mg de limoneno por g de produto de hidrodestilação ou lavagem. Médias na mesma coluna e seguidas de letras iguais, não diferem entre si (p < 0,05).

Na conversão da concentração (mg de Limoneno/g de solução) em massa de limoneno presentes em cada fração, etanol de lavagem e produto da hidrodestilação via Clevenger considerou-se 10 mL ou 7,9g de etanol ($\rho_{\text{EtOH}} \approx 0,79 \text{ g/mL}$) como a solução aproximada contendo o limoneno extraído da superfície e aproximadamente 100 mL ou 100 g a massa de água contendo o limoneno após a extração do interior das cápsulas. A massa encapsulada nas partículas formadas com *Purity Gum Ultra*® com EtOH 85% e 30% limoneno foi de 1,6 g aproximadamente o que equivale a 53 % da massa de limoneno utilizada, já quando encapsulada com *Purity Gum Ultra*® e EtOH puro na suspensão, a massa foi de 2,6 g o que equivale a 86% (Tabela 7). Este resultado obtido demonstrou que se compararmos as técnicas de microencapsulação aqui empregadas (PGSS) com métodos convencionais como o que foi estudado por Bertolini (1999), o valor de retenção para o volátil limoneno (86%) é significativo e estão próximos dos valores máximos de retenção de limoneno obtidos por Bertolini (1999), que corresponde a 91%. Este resultado é um indicativo de que o processo

de microencapsulação via PGSS aqui empregado favoreceu efetivamente na retenção do óleo essencial limoneno.

Tabela 7. Massa de limoneno encapsulada e massa perdida aderida à superfície das micropartículas formadas via PGSS utilizando polissacarídeo comercial *Purity Gum Ultra®*.

	Superfície das cápsulas (etanol de lavagem)		Encapsulada (extração das cápsulas)	
	Concentração (mg/g)	Massa (g)	Concentração (mg/g)	Massa (g)
<i>Purity Gum Ultra®</i> com EtOH 85% e 30% limoneno	$0,40 \pm 0,11$	0,00316	$15,97 \pm 4,59$	$\approx 1,60$
<i>Purity Gum Ultra®</i> com EtOH 99,9% e 30% limoneno	$0,51 \pm 0,10$	0,00403	$26,17 \pm 3,22$	$\approx 2,60$

A partir destes resultados (Tabela 6 e 7), pôde-se observar que as amostras encapsuladas com o polissacarídeo comercial *Purity Gum Ultra®* com etanol EtOH 99,9% apresentou uma maior eficiência de aprisionamento do limoneno que àquelas preparadas a partir da mistura contendo *Purity Gum Ultra®* com EtOH hidratado a 85%. As massas de limoneno encapsuladas diferem-se significativamente da massa de limoneno contida na solução de etanol empregada na lavagem para remoção do limoneno impregnado externamente no polissacarídeo. Outro fato a ser considerado refere-se à baixa quantidade de limoneno contido na superfície externa da partícula. Neste processo utilizando CO₂ supercrítico e limoneno, que é altamente solúvel neste solvente, ocorre a remoção do limoneno na despressurização do sistema. A despressurização do processo PGSS é rápida o suficiente para aprisionar o limoneno no interior do polissacarídeo modificado no reator e, devido à desestabilização rápida da pressão o soluto aderido à superfície é arrastado pelo CO₂, tanto que, durante a despressurização do sistema há odor característico de limoneno.

5.5. Análise de distribuição do tamanho das partículas

A análise de distribuição do tamanho de partículas indicou que o diâmetro das partículas antes e após o processo de encapsulação via PGSS (60° C, 120 bar) sofreu uma pequena alteração. As duas amostras de partículas de *Purity Gum Ultra*® contendo limoneno, lecitina de soja, TIXOSIL®, diferindo somente no etanol puro (99,9%) ou hidratado (85%) na suspensão, apresentaram perfis semelhantes (Figura 35). Na comparação das partículas do polissacarídeo sem sofrer tratamento via PGSS (Figura 35 A) com aquelas contendo o limoneno encapsulado, nota-se a presença de partículas com diâmetros variáveis de aproximadamente 8 e 20 µm (Figuras 35 B e C). O deslocamento do pico das curvas para a esquerda é um indicativo da diminuição do tamanho das partículas. Este comportamento atesta que o polissacarídeo sofreu influência do processo de encapsulação que emprega CO₂ supercrítico (PGSS).

O equipamento empregado no processo de formação de partículas com CO₂ supercrítico possui bicos aspersores por onde passam as microcápsulas para serem coletadas na câmara de despressurização. Estes bicos possuem internamente anéis de safira com espessuras de 2, 4 e 6 µm. Estes diferentes diâmetros podem ser variáveis de acordo com o tamanho de partícula desejado. Neste trabalho, empregou-se o anel de safira com diâmetro de 6 µm, no entanto, quando utilizada a suspensão preparada com etanol hidratado, na despressurização a alta viscosidade promovida pela água que ficava aderida ao polímero, causou entupimento e, desta forma, a coleta das micropartículas precisou ser realizada diretamente na câmara de aspersão sem os bicos aspersores ou, quando umedecida pela água incorporada, foi feita no próprio vaso de mistura do equipamento.

A **B** **C**

Figura 35. Observação do diâmetro das partículas (em μm) através de análise de distribuição de tamanho das partículas em amostras de *Purity Gum Ultra*® sem tratamento (A), EtOH 85% (B) e EtOH 99,9% (C).

A obstrução do bico aspersor de 6 μ m não ocorreu com as partículas preparadas com *Purity Gum Ultra*® quando dispersa em etanol puro (EtOH 99,9%). Esta suspensão demonstrou ter maior estabilidade na despressurização em comparação com as demais, porém houve um pouco de obstrução durante a passagem pelo bico aspersor, por este motivo nota-se uma maior porcentagem de partículas com menores diâmetros na análise de distribuição de tamanho das partículas, realizada em três replicatas para as diferentes amostras: *Purity Gum Ultra*® sem tratamento, EtOH 85% e EtOH 99% (Figura 35C).

5.6. Estudo térmico por DSC

A calorimetria exploratória diferencial ou DSC (Differential Scanning Calorimetry) constitui uma poderosa ferramenta para a análise de interações entre soluto encapsulado e o polímero (ATTAMA & MÜLLER-GOYMANN, 2008; Pool et al., 2012).

O grau de cristalinidade de uma partícula é extremamente importante, porque influencia na eficiência da encapsulação, na velocidade de liberação do ativo ou material aprisionado no núcleo e na expulsão do ativo durante o processo de estocagem, por exemplo. A análise de DSC fornece ainda a temperatura e a entalpia de fusão das partículas, onde um valor alto de entalpia de fusão sugere alta organização no retículo cristalino, isto porque a fusão de um cristal altamente organizado (cristal perfeito) requer mais energia para superar as forças de coesão do retículo cristalino do que um cristal pouco ordenado ou amorfo. Além disto, com essa técnica é possível observar o comportamento de cristalização das partículas (ATTAMA & MÜLLER-GOYMANN, 2008).

As amostras analisadas foram a lecitina de soja pura, o polissacarídeo comercial *Purity Gum Ultra*®, a mistura de *Purity Gum Ultra*® em suspensão com EtOH hidratado 85% e 30% de limoneno antes de ser submetida ao processo PGSS e as microcápsulas obtidas via PGSS desta mesma suspensão.

A análise de varredura calorimétrica feita em calorímetro diferencial (DSC) mostra duas importantes propriedades físicas que caracterizam os materiais, a temperatura de transição vítrea (T_g) e a temperatura de fusão (T_f) (Tabela 8).

Tabela 8. Temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de fusão (T_f) da lecitina de soja e da *Purity Gum Ultra®* pura, na mistura e suas micropartículas formadas via PGSS.

	T_g (°C)	T_f (°C)
Lecitina de soja	11,2	24,7
<i>Purity Gum Ultra®</i> pura	43,1	52,9
<i>Purity Gum Ultra®</i> na suspensão com EtOH 85% e limoneno 30%	45,9	53,5
Microcápsulas de <i>Purity Gum Ultra®</i> com EtOH 85% e limoneno 30%	144,7	175,9

Para a lecitina de soja não foi possível detectar tais propriedades térmicas, apresentando um comportamento totalmente adverso do polissacarídeo (*Purity Gum Ultra®*) (Figura 36). Já, ao analisar a *Purity Gum Ultra®* pura, na suspensão com EtOH 85% e Limoneno 30% na suspensão e as partículas derivadas desta suspensão via PGSS, foi possível identificar um comportamento do fluxo de calor em função da temperatura mais coerente.

A partir da análise da integração dos picos constante no termograma referente ao comportamento das substâncias analisadas (Figura 36), observou-se que cada amostra apresentou diferença significativa de transição de fase. A análise de DSC para lecitina de soja dentro da faixa de temperatura pré-estabelecida não apresentou alterações significativas na amostra e manteve-se estável dentro dos parâmetros (temperatura e atmosfera de nitrogênio) previamente estabelecidos; A ausência de picos para esta amostra é um indicativo que a lecitina de soja apresentou-se morfológicamente não cristalina, estando assim dispersa quando misturada aos demais componentes sólidos constituintes das

microcápsulas (*Purity Gum Ultra*®, TIXOSIL®). Para as demais amostras observaram-se comportamentos distintos a partir dos diferentes picos gerados nas transições endotérmicas, os quais estão relacionados ao ponto de fusão, correspondendo à decomposição de cada uma das amostras.

Figura 36. Análise de Calorimetria exploratória diferencial (DSC) em amostras de lecitina de soja (—); Microcápsulas de *Purity Gum Ultra*® com EtOH 85% e 30% limoneno obtidas via PGSS (—); *Purity Gum Ultra*® pura (—) e *Purity Gum Ultra*® com EtOH 85% e 30% limoneno sem tratamento (—).

As alterações referentes à transição endotérmica foram mais acentuadas para as amostras de *Purity Gum Ultra*® sem tratamento, *Purity Gum Ultra*® - pura e microcápsulas de *Purity Gum Ultra*® via processo PGSS, onde estas exibiram picos diferentes. Durante a

corrida da análise de DSC, foram observados que tais picos tiveram suas posições originais invertidas e, ao mesmo tempo em que era observada a formação de novos picos, outros desapareceram. Desta forma, os resultados obtidos nas análises de DSC demonstraram um comportamento comumente observado para os amidos de maneira abrangente, evidenciando uma baixa interação entre os constituintes das microcápsulas.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

Este trabalho visou demonstrar as vantagens do uso da tecnologia que emprega fluido supercrítico na encapsulação de compostos voláteis. A realização de todos os ensaios preliminares foi de suma importância na determinação das melhores condições de T e P do processo de encapsulação via PGSS utilizando CO₂ supercrítico, na definição dos polímeros mais adequados a ser empregado como material de parede, sendo a partir dos dados obtidos a sistematização dos experimentos na estabilidade da dispersão preliminar ao processo PGSS e na morfologia mais adequada das microcápsulas.

Este estudo teve como principal objetivo a produção de dispersões que estabilizassem as misturas de agente encapsulante e o volátil a ser encapsulado de maneira a garantir que estes voláteis não seriam solubilizados durante o processo PGSS. Testou-se também a formação de dispersão no próprio reator do equipamento utilizando somente o CO₂ supercrítico como solvente. Para esta situação específica considerou-se que o CO₂ em condições supercríticas tenha alterado as propriedades físicas dos polímeros, permitindo assim a encapsulação na desestabilização da dispersão formada no vaso de mistura do equipamento no momento da despressurização rápida.

A partir dos resultados obtidos, constatou-se a impregnação e possível microencapsulação do óleo essencial (limoneno), observados e constatados através de análises de microscopia (óptica, eletrônica e de fluorescência a laser) especialmente para *Purity Gum Ultra*® e amido modificado, os quais apresentaram comportamentos similares desejáveis como estabilidade da dispersão e morfologia, em comparação com os outros polímeros aqui testados (dextrina e maltodextrina). Os ensaios subsequentes (dimensionamento das partículas, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de varredura Confocal na presença de fluoresceína, estabilidade térmica pela técnica de DSC e

quantificação do teor de limoneno microencapsulado), determinaram definitivamente o polímero mais apropriado como agente encapsulante, e com isso foi demonstrada a eficiência da técnica proposta para esta finalidade.

As técnicas de microencapsulação aqui empregadas (PGSS) apresentaram valores significativos na retenção do óleo essencial representado pelo limoneno (86% em EtOH puro) em comparação aos métodos convencionais como o que foi estudado por Bertolini (1999), o qual apresentou 91% de eficiência para o mesmo volátil. Este foi o principal indicativo de que o processo de microencapsulação via PGSS proporciona a retenção eficiente do limoneno. As vantagens do estudo do processo de microencapsulação via PGSS no aprisionamento de compostos voláteis são inúmeras, já que se trata de uma tecnologia limpa que elimina a utilização de água no processo de constituição das microcápsulas. O emprego de temperaturas relativamente baixas que viabiliza a microencapsulação de materiais termossensíveis como enzimas, aromas e compostos voláteis e a utilização de CO₂ em estado supercrítico como solvente, que é considerado abundante, barato e ambientalmente seguro, bem como da utilização de polissacarídeos comerciais de baixo custo como agente encapsulante, são outras relevantes vantagens apontadas neste trabalho.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em continuidade a este trabalho de Mestrado, propõe-se como sugestões para trabalhos futuros demonstrar que o processo de microencapsulação de compostos voláteis via PGSS é viável e aplicável. Considerando-se que os materiais aqui empregados (*Purity Gum Ultra*®, lecitina de soja e sílica TIXOSIL®) são insolúveis em CO₂ supercrítico e para que isto possa ser constatado será necessário:

- Estudar a solubilidade do material encapsulante *Purity Gum Ultra*® em CO₂ em estado supercrítico;

- Estudar a solubilidade do agente utilizado como surfactante (lecitina de soja);

- Estudar a solubilidade do agente antiaglomerante sílica TIXOSIL®.

- Produzir as microcápsulas em condições já otimizadas de processo PGSS nesta dissertação de mestrado;

- Avaliar o rendimento da encapsulação (como a capacidade de retenção e a morfologia, por exemplo);

- Avaliar economicamente o desenvolvimento deste produto aplicado via PGSS, comparando-o com os aromas em pó ou óleos essenciais (cápsulas formadas por spray dryer) produzidos industrialmente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M. ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular biology of cell**. Cap. 4. p.139-157, 1994.

ANANDARAMAN, S.; REINECCIUS, G. A. Stability of encapsulated orange peel oil. **Food Technology**, v.40, p.88-93, 1986.

ASGHARI, I.; ESMAEILZADEH, F. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 433, p.149, 2012.

ATTAMA, A.A.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 315, n. 1-3, p. 189–195, 2008.

BAUER, K; D.; GARBE, D.: Common fragrance and flavor materials: Preparation, properties, and uses. **VCH Verlagsgesellschaft (Weinheim Germany and Deerfield Beach, FL)**, p. 213, 1985.

BLENDFORD, D. Fully protected. **Food, flavouring, ingredients, processing, packaging**, v. 8, n. 7, p. 43, 1986.

BERTOLINI, A. C. Estabilidade de óleo essencial de laranja, linalol e citral microencapsulados em goma arábica por atomização. **Dissertação de mestrado**, FEA, UNICAMP, Campinas, 106 p., 1999.

BRUNNER, G. In gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and application to separation processes; BAUMGARTEL, H.; FRANCK, E.U.; GRUNBEIN, W.; **Ed. Springer: New York**, p.387, 1994.

CARACCILO, G.; MARCHINI, C.; POZZI, D.; CAMINITI, R.; AMENITSCH, H.; MONTANI, M.; AMICI, A. Surface area of lipid membranes regulates the DNA-binding capacity of cationic liposomes. **Appl. Phys. Lett.** v. 94, n.03, p.39-43, 2009.

CARGILL FOODS. Disponível em:
<http://www.cargillfoods.com/lat/pt/produtos/amidos-edextrinas/dextrina/index.jsp>. Acesso em: 01/07/2013.

CHANG, H.C, ORIEL P. Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 660-662, 1994.

CLAXTON, NS, FELLERS, TJ, AND DAVIDSON. Confocal laser scanning microscopy, the Department of Optical Microscopy and Digital Imaging, **National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University**, p.37, 2005.

CONOCIMIENTOS LASER DIODES. Disponível em:
<http://conocimientoslaserdiodes.blogspot.com.br/2011/04/microscopia-laser-Confocal.html>. Acesso em 24/02/2014.

DZIEZAK, J. D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, p. 136-151, 1998.

FAGES, J.; SAUCEAU, M.; LETORNEAU, J. J.; RICHON, D.: Enhanced density-based models for solid compound solubilities in supercritical carbon dioxide with cosolvents. **Fluid Phase Equilibria**, v. 208, p. 99-113, 2003.

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

GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; ALLI, I; MULLIGAN, C.N. Encapsulation in the food industry: A review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.50, p.213 – 224, 1999.

GOLIM, M.A.; Conjugação e validação de controle isotópico IgG1-FITC para uso em citometria de fluxo; **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 4, São José do Rio Preto: Out. /Dez., 2007.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 330–347, 2004.

GRAS - GENERALLY RECONIZED AS SAFE. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/gras.htm>. Acesso em 22/03/2014.

INGREDION. INCORPORATED. Disponível em: <http://sp.ingredion.us/foodinnovation/enus/Search/Pages/IngredientSea.aspx?region=2&searchterms=PURITY>. Acesso em 01/07/2013.

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

KAYARAK, D.; ALKMAN U.; HORTAÇSU, Ö. Micronization of Ibuprofen by RESS. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 26, p. 17-31, 2003.

KRUKONIS, V. Supercritical fluid nucleation of difficult-to-comminute solids. **AIChE Annual Fall Meeting**, San Francisco, CA, paper, 140f, 1984.

LACEY, A.J. The principles and aims of light microscopy. In: *Light microscopy in biology a practical approach*, cap. 8, p.1-24, 1991.

LAPASIN, R.; PRICL, S. Rheology of industrial polysaccharides – theory and applications. Gaithersburg: Aspen Publishers, p. 620, 1999.

LEOURNEAU, J. J. et al. Micronized cocoa butter particles produced by a supercritical process. **Chemical Engineering and Processing**, v. 44, p. 201–207, 2005.

MARON, L. B.; Covas, C. P.; SILVEIRA, N. P.; POHLMANN, A.; MERTINS, O.; TATSUO, L. N.; MIRA, B.; BLASCO, M.; BERNA, A.; SUBRATS, S. Supercritical CO₂ extraction of essential oils from Orange peel. Effect of operation conditions on the extract composition. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p. 95-104, 1999.

MERTINS, O.; SEBBEN, M.; POHLMANN, A. R.; SILVEIRA, N. P.; Chitosan as Stabilizer and Carrier of Natural Based Nanostructures. **Chemistry Phys. Lipids**, v.138, p.29, 2005.

MUKHOPADHYAY, N. Improving the quality of copra (ried of *Cocos nucifera*) seed meal protein with amino acids in extra foos for rohu (*Labeo rohita* (Hamilton)) fingerlings. **Minutes Ichthyology**. Tax, 30 (2): 21-34, 2000.

OLIMPUS. Disponível em:
<http://www.olympusconfocal.com/theory/confocalintro.html>. Acesso em 26/06/2013.

OLIVEIRA, A.L.; LOPES, R.B.; CABRAL, F.A.; EBERLIN, M.N. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**., v. 99, p. 1-5, 2006.

PARAMITA, V.; FURUTA, T.; YOSHII, H. High-Oil-Load Encapsulation of Medium-Chain Triglycerides and d-Limonene Mixture in Modified Starch by Spray Drying. **Journal of Food Science**, Malden, v. 77, n. 2, 2012.

PIERCE, J.R.; ADAMS, P.J. Uncertainly in global CCN concentrations from uncertain aerosol nucleation and primary emission rates. **Chemistry Physical**, n.9, p.1339-1356, 2009.

POOL, H.; QUINTAMAR, D.; FIGUEROA, J.D.; MANO, C.M.; BECHARA, J.E.H.; GODÍNEZ, L.A.; MENDOZA, S. Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PGLA nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, v.12, 12p., 2012.

POURASGHAR, M.; FATEMI, S; VATANARA, A; NAJAFABADI, A. R. Production of ultrafine drug particles through rapid expansion of supercritical solution; a statistical approach. **Powder Technology**, v.225, p. 21-26, 2012.

RÉ, M. J. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, p. 1195-1236, 1998.

REINECCIUS, G.: Introduction to aroma research — Handbook of aroma research: M. Rothe, Kluwer Academic, Dordrecht, and Akademie. **Journal of Controlled Release**, v. 14, p. 187, 1990.

REINECCIUS, G.A. Carbohydrates for flavor encapsulation. **Food review Int.**, v. 5, n. 2, p. 147-176, 1991.

REVERCHON, E.; ADAMI, R. Review: Nanomaterials and supercritical fluids, **The Journal of Supercritical Fluids**, v.37, p. 1–22, 2006.

RISVI, S.S.H.; BENADO, A.L.; ZOLLWEG, J.A.; DANIELS, J.A. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. **Food Technology**, p. 55-65, 1986.

RHODIA SOLVAY. GROUP. Disponível em:
http://www.rhodia.com.br/pt/markets_and_products/brands/tixosil.tcm. Acesso em:
 01/07/2013:

RODRIGUEZ-MEIZOSO, I QUINO, J.; BRAEUER, A. In situ quantification of minor components in pressurized carbon dioxide using Raman spectroscopy. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.82, p.263-267, 2013.

RÖMER, F.; KRASKA, T. Molecular Dynamics simulation of the formation of pharmaceutical particles by Rapid Expansion of a Supercritical Solution, **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55,p. 769–777, 2010.

SALDAÑA, M.D.A.; MOHAMED, R.S.; MAZZAFERA, P. Extraction of cocoa butter from Brazilian cocoa beans using supercritical CO₂ and ethane, **Fluid Phase Equilibria**, v. 194, p. 885-894, 2002a.

SALGADO, J. M. Alimentos funcionais. Disponível em: http://www.sba.org.br/sba/_alimentos/200506_Alimentos_Funcionais.htm. Acesso em: 10/07/2013.

SANDLER, S.I. Chemical and Engineering Thermodynamics. **Wiley, New York**, p.622, 1989.

SANT'ANNA, O. A. B.; MORO, A. M.; TAKATA, C. S.; ARAUJO, P. S.; COSTA, M. H. B.; J. Liposome Characterization of soybean phosphatidylcholine purity by ^1H and ^{31}P NMR. **Química Nova**, v. 31, n.7, p.1856-1859, São Paulo: 2008.

SHAH, A.; AKOH, C. C.; TOLEDO, R. T.; CORREDIG, M.; Isolation of a phospholipid fraction from inedible egg. **Journal of Supercritical Fluids**, v.30, p.303-313, 2004.

SHINE, A.; GELB, J. Microencapsulation process using supercritical fluids. **Patent WO98151348 – EP0948396 – US 5766637**, 1997.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. Critical Review. **Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SILVA, G. Extração de pigmentos do urucum com CO₂ supercrítico. **Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos**, FEA, UNICAMP, Campinas, p. 208, 1999.

SILVERSTEIN, R.M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos** / Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, David J. Kiemle; Tradução: Ricardo Bicca de Alencastro, p. 70, 7ª Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

STEVANUS, H.; BAMBANG, V.; TJANDRAWINATA, R., R. Micronization of fenofibrate by rapid expansion of supercritical solution. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.20, p.54-60, 2014.

STEPHEN, A. M.; CHURMS, S. C. Introduction. In: STEPHEN, A. M. (Ed) Food Polysaccharides and their applications. **New York: Marcel Dekker**, p. 1-19, 1995a.

STRUMENDO, M. BERTUCCO, A.; ELVASSORE, N. Modelling of particle formation processes using gas saturated solution atomization. **Journal of Supercritical Fluids**, v.41, p.115-125, 2007.

SUBRA, P.; JESTIN, P. Process performances and characteristics of powders produced using supercritical CO₂ as solvent and ant solvent. **Powder Technology**, v. 142, p. 13– 22, 2004.

SUBRA, P. JESTIN, P. Powders elaboration in supercritical media: comparison with conventional routes. **Powder Technology**, v. 103, p. 2–9, 1999.

SUTTER, L.E.D.N.; SILVA, M.F.F.; CASSEL, E. Extração supercrítica, uma nova tecnologia industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**., v. 14, n. 3, p. 3-10, 1994.

TABOGA, S.R. Microscopia. In: RECCO-PIMENTEL, S.M.; CARVALHO, H.F. **A célula**, cap. 2, p. 06-14, 2001.

TOM, J. W.; DEBENEDETTI, P. G.: Particle formation with supercritical fluids - a review. **Journal of Aerosol Science**, v. 22, n. 5, p. 555-584, 1991.

TOMASKO, D.L. et al. Supercritical fluid applications in polymer nanocomposites, **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v.7, p.407–412, 2003.

TONON, R.V. Secagem por atomização do suco de açaí: Influência das variáveis de processo, qualidade, e estabilidade do produto. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)** FEA, UNICAMP, Campinas, p.242, 2009.

TURK, M. et al. Micronization of pharmaceutical substances by the Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS): a promising method to improve bioavailability of poorly soluble pharmaceutical agents. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, p. 75–84, 2003.

TURK, M; BOLTEN, D. Formation of submicron poorly water-soluble drugs by rapid expansion of supercritical solution (RESS): results for Naproxen, **Journal of Supercritical Fluids**, v.55, p.778–785, 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Disponível em: <http://www.degeo.ufop.br/laboratorios/microlab/mev.htm>. Acesso em: 02/07/2013.

WANG L., SUN D.-W., Recent developments in numerical modelling of heating and cooling processes in the food industry – a review, **Trends Food Science Technology**, v 14, p.408-423, 2003.

WANG, H.; LIU, Y.; WEI, S.; YAN, Z. Application to response surface methodology to optimize supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from *Cyperus rotundus* Linn. **Food Chemistry**, v.132, p.582-587, 2012.

WESTING, L. L.; REINECCIUS, G. A.; CAPORASO, F. Shelf life of orange oil; effects of encapsulation by spray-drying, extrusion, and molecular inclusion. In Flavor Encapsulation; ACS Symposium Series 370; Risch, S. J., Reineccius, G. A., Eds.; **American Chemical Society: Washington, DC**, p. 110-121, 1988.

WYNNCHUK, M. Evaluation of xylene substitutes for paraffin tissue processing. **Journal of Histotechnology**, v.17, p.143, 1994.

VARONA, S.; KARETH, S.;A. MARTÍN; COCERO, M.J. Formulação de óleo essencial de lavanda com biopolímeros por PGSS para aplicação como biocida em agricultura ecológica. **Jornal de fluidos supercríticos**, v. 54, p.369-377, 2010.

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

YU, H.; ZHAO, ZU, Y. ZHANG, X.; ZU, B. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p. 50-60, 2012.

ZHANG, W.; HE, H.; FENG, Y.; DA, S.; Analysis Technology Biomedicine. **New England Journal Medicine**. v.342, p.1946-1952, 2000.

ZHANG, W. N.; HE, H. B.; FENG, Y. Q.; DA, S. L.; Separation of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine by using high-performance displacement chromatography. **Journal of Chromatography** , v.103, p.145-154, 2004.

9. OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o desenvolvimento desta dissertação de Mestrado, outras atividades foram desenvolvidas. Dentre elas pode-se citar:

Cumprimento dos 36 créditos exigidos pelo programa de Pós-Graduação no curso de Mestrado em Ciências da Engenharia dos Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP, realizados na própria instituição, referentes a oito disciplinas e dois Programas de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE);

Participação em dois Programas de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) nas disciplinas de Termodinâmica e Higiene e Segurança dos Alimentos, cujas atividades desenvolvidas nestes PAE's incluem: Preparo e acompanhamento em aulas práticas, correção de relatórios e avaliações, plantão de dúvidas, atividades realizadas em sala de aula e aulas ministradas pela aluna PAE;

Orientação de trabalho de Iniciação Científica do graduando Luiz Tadeu Bertoldi, também intitulado “**Formação de micropartículas de limoneno em polissacarídeos usando CO₂ supercrítico**”, com duração de 12 meses.