UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

VICTOR JESÚS AREDO TISNADO

**Estudo da formação de partículas de licopeno em colágeno
hidrolisado usando CO₂ supercrítico**

VICTOR JESÚS AREDO TISNADO

**Estudo da formação de partículas de licopeno em colágeno
hidrolisado usando CO₂ supercrítico**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

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

Pirassununga

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A678e Aredo-Tisnado, Victor Jesús
 Estudo da formação de partículas de licopeno em
 colágeno hidrolisado usando CO2 supercrítico /
 Victor Jesús Aredo-Tisnado ; orientadora Alessandra
 Lopes de Oliveira. -- Pirassununga, 2017.
 83 f.

 Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
 em) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de
 Alimentos, Universidade de São Paulo.

 1. Colágeno. 2. Dióxido de carbono. 3. Impregnação
 supercrítica. 4. Pigmento carotenóide. 5. Pó
 bioativo. I. Oliveira, Alessandra Lopes de, orient.
 II. Título.

ATA DE DEFESA

Aluno: 74132 - 9543663 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Victor Jesus Areco Tisnado no Programa: Engenharia de Alimentos, do(a) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Aos 21 dias do mês de novembro de 2017, no(a) Sala ZEA 01 realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Victor Jesus Areco Tisnado, apresentada para a obtenção do título de Mestre intitulada:

"Estudo da formação de partículas de licopeno em colágeno hidrolisado usando CO₂ supercrítico"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Alessandra Lopes de Oliveira	Presidente	FZEA - USP	Não Votante
Milena Martelli Tosi	Titular	FZEA - USP	<u>APROVADO</u>
Sebastião Pratavieira	Titular	Especialista-IFSC	<u>APROVADO</u>
Julian Martínez	Titular	UNICAMP - Externo	<u>APROVADO</u>

Resultado Final: Aprovado

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Erica Cristina Mello Ferraz, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Pirassununga, aos 21 dias do mês de novembro de 2017.

Milena Martelli Tosi

Sebastião Pratavieira

Julian Martínez

Alessandra Lopes de Oliveira
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 23.11.2017 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Mestre em Ciências obtido no Programa Engenharia de Alimentos - Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Profª. Drª. Rosemary Aparecida de Carvalho
Presidente da Comissão de
Pós-Graduação
FZEA/USP

*Dedico esta dissertação aos meus
pais Jesús e Rosa, e aos meus irmãos
Helen e Aron.*

AGRADECIMIENTOS

Agradeço a Deus por me dar saúde, fortaleza e guiar meus passos;

A minha orientadora, Profa. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira por ter me dado a oportunidade de estudar na Universidade de São Paulo, pela instrução e paciência que teve comigo para a realização desta dissertação;

Aos meus pais Jesús e Rosa e meus irmãos Helen e Aron, obrigado por terem me apoiado em todos meus projetos e em especial neste mestrado longe de casa;

Ao Sr. Aldo Cespedes, Sra. Fernanda Silva e Andre Cespedes por terem me integrado como mais um membro de sua família;

Ao técnico do LTAPPN Nilson José Ferreira por toda a ajuda e colaboração prestada durante os experimentos;

Aos responsáveis de outros laboratórios: Camila pelo auxílio com as análises de tamanho de partículas, Rodrigo pelo auxílio com as análises de microscopia eletrônica e FTIR, Mônica pelo auxílio com as análises DSC, Sebastião e Prof. Dr. Francisco Guimarães da USP- São Carlos pelo auxílio com as análises de microscopia confocal a laser;

A Lía Velásquez pela ajuda incondicional durante o mestrado;

Aos amigos que fiz em Pirassununga durante o mestrado: Heber, Hubert, Diana, Gilda, Maria, Luis, Sandra, Lizbet, Orfa, José, Mariana, Gerardo, Roger, Santiago, Julio, Samira, Alexander, e Walisson, obrigado por compartilharem comigo momentos de alegria;

Aos meus companheiros do LTAPPN: Heber, Maria, Estela, Gabriela, Naila e Paula pelo apoio e colaboração com esta pesquisa;

Ao Programa Nacional de Becas y Credito Educativo (PRONABEC) do Ministério de Educação do Peru pela concessão da bolsa de Mestrado.

À FAPESP (Proc. N° 2012/06981-0) pelo financiamento de parte de esta pesquisa.

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

AREDO-TISNADO, V. J. **Estudo da formação de partículas de licopeno em colágeno hidrolisado usando CO₂ supercrítico**. 2017. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

O objetivo desta pesquisa foi estudar a formação de partículas de licopeno em pó de colágeno hidrolisado (CH) comercial usando CO₂ supercrítico (CO₂-SC). O estudo consistiu em três etapas: a medida de solubilidade do CH em CO₂-SC por método estático para conhecer a afinidade do CH pelo CO₂, a formação de partículas de misturas físicas compostas de diferentes proporções de CH/licopeno (4:1, 6:1, 8:1 e 10:1) através de processamento em uma autoclave com CO₂-SC a 140 bar e 50 °C em agitação de 1.250 rpm por 45 min para definir a proporção de CH/licopeno, e o estudo do efeito de outras condições de CO₂-SC (150 bar e 50 °C, 150 bar e 60 °C, 250 bar e 50 °C, 250 bar e 60 °C) na formação de partículas de licopeno em CH para identificar a melhor condição de CO₂-SC. As partículas resultantes foram caracterizadas com relação à sua morfologia por microscopia eletrônica de varredura, distribuição de tamanho por difração a laser, comportamento térmico por calorimetria diferencial de varredura, estrutura química por espectroscopia de infravermelho de transformada de Fourier, liberação de carga, e estrutura física interna das partículas por microscopia de laser confocal para conhecer o mecanismo de formação das partículas pelo processamento com CO₂-SC. Os resultados indicaram que o CH é pouco solúvel em CO₂-SC, motivo pelo qual não há potencial para processos de micronização supercrítica relacionados à solubilidade do biomaterial carreador em CO₂-SC. No estudo de proporções de CH/licopeno foi observado que o processo com CO₂-SC a 140 bar e 50 °C permite a obtenção de partículas de licopeno em CH na forma de pó de coloração vermelha com intensidade dependente da quantidade de licopeno inicial, sem mudanças importantes na estrutura física porosa do CH, e um aumento de tamanho das partículas. Recomenda-se a proporção 10:1 de CH/licopeno, pois nela se evidenciou menor aglomeração de partículas e formação de fissuras na superfície das partículas que facilitam a incorporação do licopeno em CH seguindo um mecanismo de impregnação supercrítica propiciado pela sorção de CO₂ e arraste simultâneo de licopeno

ao interior da estrutura física das partículas de CH. Na exploração de outras condições de CO₂-SC, na temperatura de 60 °C (150/250 bar) obteve-se uma massa de aparência viscoelástica sem utilidade para a formação de partículas. Entanto, na temperatura de 50 °C foi observado que as partículas de licopeno em CH formadas com CO₂-SC a 150 bar, quando comparadas com as formadas com CO₂-SC a 250 bar, evidenciaram formação de fissuras que resultaram na melhor dispersão e maior carga de licopeno na estrutura interna do CH. Além disso, as análises do comportamento térmico e o espectro de infravermelho destas partículas evidenciaram a formação de interações eletrostáticas entre o licopeno e o CH favorecidas pelo processamento com CO₂-SC. Assim, conclui-se que o processamento com CO₂-SC a 140/150 bar e 50 °C poderia ser utilizada para o design de partículas de licopeno impregnadas em CH, gerando um ingrediente com possível ampla atividade funcional pela atividade biológica do CH em tecidos conjuntivos e pela atividade antioxidante do licopeno.

Palavras-chave: Pigmento carotenoide. Colágeno. Dióxido de carbono. Impregnação supercrítica. Pó bioativo.

ABSTRACT

AREDO-TISNADO, V. J. **Study of particle formation of lycopene in hydrolyzed collagen using supercritical CO₂**. 2017. 83 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

The objective of this research was to study the formation of lycopene particles in commercial powder of hydrolyzed collagen (HC) using supercritical CO₂ (SC-CO₂). The study consisted of three steps: the solubility measurement of HC in SC-CO₂ by static method to know the affinity of HC by CO₂, the formation of particles of physical mixtures composed of different ratios of HC/lycopene (4:1, 6:1, 8:1 and 10:1) by autoclaving with SC-CO₂ at 140 bar and 50 °C under stirring at 1,250 rpm for 45 min to define the HC/lycopene ratio, and the study of the effect of other conditions of SC-CO₂ (150 bar and 50 °C, 150 bar and 60 °C, 250 bar and 50 °C, 250 bar and 60 °C) in the particle formation of lycopene in HC to identify the best SC-CO₂ condition. The resulting particles were characterized with respect to their morphology by scanning electron microscopy, size distribution by laser diffraction, thermal behavior by differential scanning calorimetry, chemical structure by Fourier transform infrared spectroscopy, charge release, and physical structure of the particles by confocal laser microscopy to know the mechanism of particle formation by SC-CO₂ processing. The results indicated that HC is poorly soluble in SC-CO₂ and therefore has no potential for supercritical micronization processes related to the solubility of the biomaterial in SC-CO₂. In the study of ratios of HC/lycopene it was observed that the process with SC-CO₂ at 140 bar and 50 °C allowed to obtain lycopene particles in HC with powder appearance of red color with intensity depending on the amount of initial lycopene, without important changes in the porous physical structure of HC, and an increase in particle size. It is recommended a 10:1 ratio of HC/lycopene, since this ratio showed less particle agglomeration, and formation of fissures on the surface of the particles facilitating the incorporation of lycopene into HC following a mechanism of supercritical impregnation propitiated by CO₂ sorption and simultaneous drag of lycopene to the interior of the physical structure of the HC particles. In the exploration of other conditions of SC-CO₂, at 60 °C (150/250 bar) a mass of viscoelastic appearance was obtained without utility for the

formation of particles. However, at 50 °C was observed that the lycopene particles in HC formed with SC-CO₂ at 150 bar, when compared with the particles formed with SC-CO₂ at 250 bar evidenced the formation of fissures, which had positive influence in the dispersion and charge of lycopene in the internal structure of HC. In addition, analyzes of the thermal behavior and the infrared spectrum of these particles evidenced the formation of electrostatic interactions between lycopene and HC favored by SC-CO₂ processing. Thus, it can be concluded that SC-CO₂ processing at 140/150 bar and 50 °C could be used for the design of lycopene particles impregnated in HC, producing an ingredient with possible broad functional activity due to the biological activity of HC in connective tissues and the antioxidant activity of lycopene.

Keywords: Carotenoid pigment. Collagen. Carbon dioxide. Supercritical impregnation. Bioactive powder.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama de fases de um composto puro (C: ponto crítico, T: ponto triple)	17
Figura 2 - Equipamento usado para impregnação assistida por CO ₂ supercrítico	24
Figura 3 - Interações no sistema de impregnação assistido por CO ₂ supercrítico	25
Figura 4 - Estrutura química do licopeno (<i>all-trans</i> licopeno)	26
Figura 5 - Equipamento para a medida experimental da solubilidade em CO ₂ supercrítico	36
Figura 6 - Desenho esquemático do equipamento de formação de partículas em CO ₂ supercrítico	39
Figura 7 - Aparência física das partículas de licopeno segundo a proporção colágeno hidrolisado/licopeno	43
Figura 8 - Micrografias das partículas de colágeno hidrolisado: A) 100x e B) 1.0kx	43
Figura 9 - Micrografias das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado em CO ₂ supercrítico a 140 bar e 50 °C nas proporções de colágeno hidrolisado/licopeno 4:1 A) 100x e B) 1.0kx; 6:1 C) 100x e D) 1.0kx	44
Figura 10 - Micrografias das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado em CO ₂ supercrítico a 140 bar e 50 °C nas proporções de colágeno hidrolisado/licopeno 8:1 A) 100x e B) 1.0kx; 10:1 C) 100x e D) 1.0kx	45
Figura 11 - Micrografias das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado na proporção de 10:1 de colágeno hidrolisado/licopeno: A) 100x e B) 1.0kx em CO ₂ supercrítico a 120 bar e 45 °C; C) 100x e D) 1.0kx em CO ₂ supercrítico a 100 bar e 40 °C	46
Figura 12 - Distribuição do diâmetro das partículas: A) colágeno hidrolisado e B) licopeno em colágeno hidrolisado	47
Figura 13 - Liberação de carga das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado durante lavagem em solvente orgânico	49
Figura 14 - Aparência física da mistura após contato com CO ₂ supercrítico a 150 bar e 60 °C	51
Figura 15 - Morfologia das partículas de colágeno hidrolisado: A) CO ₂ supercrítico a 150 bar e 50 °C, B) CO ₂ supercrítico a 150 bar e 60 °C, C) CO ₂ supercrítico a 250 bar e 50 °C, e D) CO ₂ supercrítico a 250 bar e 60 °C; 500x	52

Figura 16 - Morfologia das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado: A) 100x e B) 1.0kx em CO ₂ supercrítico a 150 bar e 50 °C; C) 100x e D) 1.0kx em CO ₂ supercrítico a 250 bar e 50 °C.....	53
Figura 17 - Distribuição do diâmetro das partículas: A) colágeno hidrolisado tratado com CO ₂ supercrítico e B) licopeno em colágeno hidrolisado formado com CO ₂ supercrítico ..	54
Figura 18 - Solubilidade das partículas em água: A) colágeno hidrolisado, B) licopeno em colágeno hidrolisado/fase aquosa isolada e C) licopeno em colágeno hidrolisado/dissolução	56
Figura 19 - Termogramas do licopeno, colágeno hidrolisado sem e com tratamento de CO ₂ supercrítico, mistura física de licopeno e colágeno hidrolisado e das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado formadas com CO ₂ supercrítico	57
Figura 20 - Espectros FTIR do licopeno, colágeno sem e com tratamento com CO ₂ supercrítico, mistura física de licopeno e colágeno hidrolisado, e partículas de licopeno em colágeno hidrolisado formadas com CO ₂ supercrítico	60
Figura 21 - licopeno liberado das partículas durante três lavagens com acetona.....	63
Figura 22 - Espectros de emissão de fluorescência de algumas regiões de imagens de microscopia confocal a laser de partículas de colágeno hidrolisado e de licopeno em colágeno hidrolisado	65
Figura 23 - Imagens da estrutura interna de partículas de colágeno hidrolisado (CH): A) sem tratamento supercrítico, B) sem tratamento supercrítico, C) CO ₂ supercrítico a 150 bar e 50 °C (T1) e D) CO ₂ supercrítico a 250 bar e 50 °C (T2)	66
Figura 24 - Imagens da estrutura interna das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado: A, B) mistura física, C) CO ₂ supercrítico a 150 bar e 50 °C (T1) e D) CO ₂ supercrítico a 250 bar e 50 °C (T2)	67
Figura 25 - Imagens da estrutura interna das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado formadas com CO ₂ supercrítico a 150 bar e 50 °C após lavagens com acetona: A, B) após primeira lavagem, C) após segunda lavagem e D) após terceira lavagem.....	69
Figura 26 - Imagens da estrutura interna das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado formadas com CO ₂ supercrítico a 250 bar e 50 °C após lavagens com acetona: A, B) após primeira lavagem, C) após segunda lavagem e D) após terceira lavagem.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tecnologias de fluido supercrítico para formação de partículas	19
Tabela 2 - Algumas aplicações de impregnação de substâncias ativas em matrizes poliméricas com CO ₂ supercrítico	21
Tabela 3 - Comparação de algumas técnicas de formação de partículas	23
Tabela 4 - Estudos de formação de partículas de licopeno com diferentes materiais e métodos.....	27
Tabela 5 - Pesquisas de formação de partículas de licopeno com CO ₂ supercrítico	30
Tabela 6 - Técnicas utilizadas na caracterização de partículas de licopeno	31
Tabela 7 - Solubilidade de alguns biomateriais em CO ₂ supercrítico.....	42
Tabela 8 – Descritores da distribuição de tamanho das partículas de colágeno hidrolisado e de partículas de licopeno em colágeno hidrolisado.....	48
Tabela 9 – Descritores da distribuição de tamanho das partículas de colágeno hidrolisado tratado com CO ₂ supercrítico e de partículas de licopeno em colágeno hidrolisado formado com CO ₂ supercrítico	55
Tabela 10 - Temperatura de transição vítrea (T _g), e temperatura de fusão (T _f) do licopeno, colágeno hidrolisado sem e com tratamento com CO ₂ supercrítico, mistura física de licopeno e colágeno hidrolisado, e partículas de licopeno em colágeno hidrolisado formadas com CO ₂ supercrítico.....	58
Tabela 11 - Principais bandas (cm ⁻¹) dos espectros FTIR do colágeno hidrolisado sem e com tratamento com CO ₂ supercrítico, licopeno, mistura física de licopeno e colágeno hidrolisado e partículas de licopeno em colágeno hidrolisado formadas com CO ₂ supercrítico	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	CO ₂ supercrítico.....	17
2.2	Formação de partículas utilizando CO ₂ Supercrítico	18
2.2.1	Formação de partículas via micronização/precipitação supercrítica.....	18
2.2.2	Formação de partículas via impregnação supercrítica.....	20
2.3	Licopeno.....	26
2.3.1	Licopeno e formação de partículas em pó	26
2.3.2	Estado da arte da formação de partículas de licopeno com CO ₂ supercrítico 29	
2.3.3	Caracterização de partículas de licopeno em pó	31
2.4	Colágeno hidrolisado	33
3	OBJETIVOS	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	MATERIAIS.....	36
4.2	METODOLOGIA	36
4.2.1	Medida da solubilidade do colágeno hidrolisado em CO ₂ supercrítico	36
4.2.2	Preparo da mistura física inicial.....	37
4.2.3	Formação de partículas usando CO ₂ supercrítico	38
4.2.4	Caraterização das partículas.....	39
4.2.5	Análise Estatística	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Solubilidade do colágeno hidrolisado em CO ₂ supercrítico.....	42
5.2	Estudo de proporções de colágeno hidrolisado/licopeno.....	43
5.2.1	Morfologia das partículas	43
5.2.2	Distribuição de tamanho das partículas	47
5.2.3	Liberação do licopeno em solvente orgânico.....	49
5.3	Estudo de condições de CO ₂ supercrítico	51
5.3.1	Morfologia das partículas	52
5.3.2	Distribuição de tamanho das partículas	54
5.3.3	Solubilidade das partículas em água	56

5.3.4	Propriedades térmicas.....	57
5.3.5	Estrutura química das partículas	59
5.3.6	Liberação de licopeno em solvente orgânico.....	63
5.3.7	Análise de estrutura física interna das partículas	65
6	CONCLUSÕES.....	71
7	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

O licopeno é um pigmento carotenoide que confere a coloração vermelha a alguns frutos maduros como o tomate, mamão e melancia (SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2015). Seu consumo tem sido promovido pois sua alta atividade antioxidante protege contra doenças influenciadas por reações de radicais livres, tais como o câncer de próstata, câncer de pâncreas, câncer de estômago, câncer de pele, e doenças cardiovasculares (KUN; LULE; XIAO-LIN, 2006; PERVEEN et al., 2015; SOARES et al., 2015). Porém, o licopeno é susceptível à isomerização e oxidação por fatores ambientais como a luz, temperatura e oxigênio, durante o processamento tecnológico e armazenamento (LEE; CHEN, 2002; RANVEER et al., 2015; SHI et al., 2002). Assim, uma maneira de protegê-lo, facilitar o uso como ingrediente e garantir sua presença e estabilidade nos produtos que o conterão (ROCHA; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2012) é mediante a formação de partículas em pó usando materiais carreadores biológicos de natureza polimérica (COCERO et al., 2009; ĐORĐEVIĆ et al., 2015; SALDAÑA; COIMBRA; CARDOZO-FILHO, 2015).

Na formação de partículas de licopeno já foram estudadas várias técnicas, como a secagem por pulverização (MATIOLI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2002), pulverização a frio (PELISSARI et al. 2016), pulverização eletrostática (PÉREZ-MASIÁ; LAGARON; LOPEZ-RUBIO, 2015), crioconcentração (CHIU et al., 2007), coacervação complexa (SILVA et al., 2012), gelificação inversa (CELLI et al., 2016). Porém, a formação de partículas com morfologias adequadas não é garantia de uma proteção efetiva do pigmento no tempo considerado na avaliação da estabilidade (DURANTE et al., 2016; SILVA et al., 2012). Por isso, novas técnicas e biomateriais carreadores ainda estão sendo testadas para esse fim.

Neste contexto, as técnicas que usam CO₂ supercrítico (CO₂-SC) oferecem importantes vantagens como a baixa toxicidade; uso de temperaturas moderadas, pois a temperatura crítica do CO₂ é de 31,1 °C; uma atmosfera inerte (sem oxigênio) que evita a degradação do composto de interesse; ausência de água para suspender ou misturar os materiais; e a possibilidade de ajustar as propriedades do CO₂ mediante alterações na pressão e temperatura ou pela adição de co-solvente (COCERO et al., 2009; TOMASKO et al., 2003; YEO; KIRAN, 2005). Assim, o uso do CO₂-SC na formação de partículas de licopeno poderia minimizar ou retardar a degradação do pigmento.

A formação de partículas de licopeno com CO₂-SC tem sido pouco estudada. Já foram testados os processos de precipitação SEDS (Dispersão de Solução Aumentada por Fluido Supercrítico / *Solution-Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids*) (NEROME et al., 2013) e SAS (Anti-Solvente Supercrítico / *Supercritical Antisolvent*) (CHENG et al., 2017), mas esses processos são influenciados por vários parâmetros de operação, e as conclusões geralmente são limitadas ao material e condições específicas (MARTÍN; COCERO, 2008). Blanch et al. (2007) propuseram a extração supercrítica de licopeno acoplada à encapsulação, mediante o contato do licopeno com o biomaterial (β -ciclodextrina) no meio supercrítico para formar um complexo de inclusão, enfoque similar ao seguido em trabalhos de impregnação de óleos essenciais em pó poroso de amido (ALMEIDA et al., 2013; MACHADO; PELEGATI; OLIVEIRA, 2016; VARONA et al., 2011), que evita operações de precipitação, reduzindo os parâmetros de operação e facilitando o aumento de escala (COCERO et al., 2009; PERRUT; JUNG; LEBOEUF, 2005a, b). Pelo qual a formação de partículas de licopeno por impregnação com CO₂-SC apresenta grande potencial.

Nas pesquisas de formação de partículas de substâncias ativas, o colágeno hidrolisado (CH) ainda não foi testado como biomaterial carreador, mas foi aplicado com sucesso na fabricação de filmes (BORGES et al., 2016; LANGMAIER et al., 2008a, b; PEI et al., 2013). Este biomaterial é uma mistura de peptídeos obtida por hidrólise adicional de colágeno desnaturado (LI et al., 2005; ZHANG; LI; SHI, 2006). Desta forma, o CH é uma fonte de peptídeos e aminoácidos biologicamente disponíveis durante a digestão gastrointestinal, proporcionando benefícios na saúde como agente nutricional e farmacêutico (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011; GUILLERMINET et al., 2010; IWAI et al., 2005), atuando como agente terapêutico em doenças dos ossos e articulações (MOSKOWITZ, 2000), e melhorador do aspecto da pele (INOUE et al., 2016; WANG et al., 2017). Portanto, o uso de CH como biomaterial carreador para a formação de partículas de substâncias ativas permitirá gerar ingredientes com bioatividade adicional.

Face ao descrito, neste trabalho foi estudada a formação de partículas de licopeno em CH usando CO₂-SC, avaliando o efeito de diferentes proporções de CH/licopeno e condições de pressão e temperatura do CO₂-SC nas características das partículas formadas para entender o mecanismo de formação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CO₂ supercrítico

Todos os gases podem se transformar em fluido supercrítico ao atingir condições de pressão e temperatura acima do ponto crítico (Figura 1) (ESFANDIARI, 2015). A importância dos fluidos supercríticos radica em que possuem propriedades físicas entre as de líquidos e gases. Assim, um fluido supercrítico tem a viscosidade e difusividade de gás, e a densidade e propriedades de solvatação de líquido. O qual, lhe confere características excelentes como solvente para processos de extração, formação de partículas, impregnação, etc (KNEZ et al., 2014; NALAWADE, 2006), substituindo solventes orgânicos convencionais que são prejudiciais ao meio ambiente. Isso, possibilita processos sustentáveis e econômicos pelo baixo consumo de energia, facilidade de separação do produto, e possibilidade de recuperação, reciclagem ou reutilização do gás (BRUNNER, 2010; KNEZ et al., 2014).

Figura 1 - Diagrama de fases de um composto puro (C: ponto crítico, T: ponto triple)

Fonte: ESFANDIARI, N. Production of micro and nano particles of pharmaceutical by supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, Amsterdam, v. 100, p. 129-141, 2015.

Muitos gases têm temperatura crítica elevada, são custosos ou não são seguros (ESFANDIARI, 2015). No entanto, o CO₂ atinge a condição supercrítica com facilidade, dado que sua temperatura crítica (31 °C) e pressão crítica (73,8 bar) são relativamente baixas

quando tem-se como referência a água (temperatura crítica de 374 °C e pressão crítica de 220,6 bar) (KAZARIAN, 2000). Além disso, o CO₂ apresenta outras vantagens como sua baixa toxicidade, estabilidade termodinâmica e não ser inflamável. Outra característica importante é a possibilidade de ajustar suas propriedades termofísicas como a difusividade, viscosidade e densidade, variando a pressão e a temperatura, razões pelas que o CO₂-SC é considerado o "solvente verde para o futuro" (KIKIC; VECCHIONE, 2003; KNEZ et al., 2014). As propriedades do CO₂-SC permitem uma penetração profunda e rápida nos núcleos de materiais sólidos por seu alto coeficiente de difusividade, de 10⁻² a 10⁻¹ m²s⁻¹, e baixa viscosidade, de 10⁻² a 9 x 10⁻² mPa·s⁻¹, que é 30 a 100 vezes menor do que a viscosidade de um líquido (BRUNNER, 2010). Nesse contexto, uma de suas aplicações é o processamento de polímeros como solvente, anti-solvente ou plastificante para a formação de partículas de substâncias ativas (KNEZ et al., 2014).

2.2 Formação de partículas utilizando CO₂ Supercrítico

A formação de partículas de substâncias ativas com CO₂-SC pode ser atingida com processos de micronização/precipitação supercrítica ou com processos de impregnação supercrítica em carreador polimérico particulado poroso.

2.2.1 Formação de partículas via micronização/precipitação supercrítica

A formação de partículas de substâncias ativas tem como objetivos a proteção da degradação causada por agentes ambientais como a luz e o oxigênio, e o aumento de sua biodisponibilidade, ao formar partículas de morfologia regular de escala micrométrica ou nanométrica. Assim, a utilização de processos de micronização/precipitação supercrítica é considerada como uma técnica promissora, pois permite o melhor controle da morfologia e do tamanho das partículas quando comparada a técnicas tradicionais que podem produzir partículas grosseiras com ampla distribuição de tamanho, e degradar a substância ativa devido a tensões mecânicas ou térmicas, ou a contaminação das partículas com solventes orgânicos ou outras substâncias tóxicas (MARTÍN; COCERO, 2008).

A formação de partículas com características desejadas mediante processos de micronização/precipitação supercrítica é possível pelo ajuste dos parâmetros do processo,

tais como a quantidade de gás dissolvido, temperatura, pressão, adição de cossolvente, diâmetro do bocal, taxa de despressurização (COCERO et al., 2009; JUNG; PERRUT, 2001; KNEZ et al., 2014; SALDAÑA; COIMBRA; CARDOZO-FILHO, 2015; SHARIATI; PETERS, 2003). Ainda assim, as partículas resultantes podem ter diferentes configurações, sendo chamadas de “compósitos” quando há precipitação e dispersão simultânea da substância ativa no biomaterial carreador, ou “cápsulas” quando o biomaterial polimérico é precipitado como uma casca fina em torno da substância ativa (COCERO et al., 2009).

São vários os processos de micronização/precipitação com CO₂-SC para a formação de partículas, os quais têm sido denominadas de acordo com a solubilidade do biomaterial polimérico no CO₂-SC. Assim, quando o CO₂-SC age como solvente, o processo se denomina RESS (Expansão rápida da solução supercrítica/*Rapid Expansion of Supercritical Solutions*); quando é soluto, o processo é PGSS (Partículas de soluções saturadas de gás/*Particles from Gas Saturated Solutions*); e quando é antissolvente pode tratar-se de processos GAS (Gás Antissolvente/*Gas Anti-Solvent*), SAS (Precipitação Antissolvente Supercrítica/*Supercritical Anti Solvent precipitation*), SFEE (Extração de emulsões por Fluido Supercrítico/*Supercritical Fluid Extraction of Emulsions*), ASES (Sistema de Extração de Solvente Aerossol/*Aerosol Solvent Extraction System*) e SEDS (Dispersão de Solução Aumentada por Fluido Supercrítico/*Solution-Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids*).

Algumas características dos processos supercríticos mais comuns para a produção de partículas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Tecnologias de fluido supercrítico para formação de partículas			
Característica	RESS	PCA/SAS/GAS/ASES/SEDS/SAA	PGSS TM
SCF usado como	Solvente	Antissolvente	Soluto
Quantidade de gás	Alta	Media	Baixa
Solvente orgânico	Ausente	Presente	Ausente
Pressão	Alta	Media	Media
Separação do gás	Fácil	Fácil	Fácil

Fonte: KNEZ, Ž. et al. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v. 77, p. 235-243, 2014.

Os processos de precipitação com fluido supercrítico e suas aplicações em diferentes substâncias ativas têm sido revisados em diferentes trabalhos (BRUNNER, 2010; COCERO et al., 2009; JUNG; PERRUT, 2001; KNEZ; WEIDNER, 2003; REVERCHON et al. 2009; SALDAÑA; COIMBRA; CARDOZO-FILHO, 2015; SHARIATI; PETERS, 2003; TABERNERO; DEL

VALLE; GALÁN, 2012; WEIDNER, 2009; ZARENA; SANKAR, 2011). Nos quais, informou-se que é escasso o uso do conhecimento em escala laboratorial na projeção de escala piloto e industrial (SALDAÑA; COIMBRA; CARDOZO-FILHO, 2015), pois deve-se superar os desafios técnicos relacionados ao processamento em alta pressão e altos custos de investimento quando comparada a outras tecnologias tradicionais (KNEZ et al., 2014). Nesse contexto, Martín e Cocero (2008) explicaram que devido a estes processos serem complexos com vários fenômenos simultâneos e interdependentes, a maior parte da pesquisa experimental é mais descritiva do que preditiva, com conclusões geralmente limitadas aos materiais e condições estudadas. Portanto, o conhecimento dos fundamentos e mecanismos do processo junto ao conhecimento empírico ajudarão na aplicação comercial, pois se requer previsibilidade das características do produto.

Um processo diferente e menos complexo que os processos mencionados de formação de partículas de substâncias ativas é a impregnação com fluido supercrítico, a qual se descreve na seguinte seção.

2.2.2 Formação de partículas via impregnação supercrítica

A impregnação supercrítica de substâncias de atividade biológica em polímeros começou com trabalhos orientados à impregnação de fármacos (CORTESI et al., 2000). Posteriormente, Alessi et al. (2003) nomearam o processo como Impregnação de Solvente Supercrítico (*Supercritical Solvent Impregnation* - SSI), o qual foi adotado em vários trabalhos. Porém, existem autores que preferem nomear o processo de Impregnação de Solução Supercrítica com a mesma sigla SSI, e outros simplesmente a nomeiam como impregnação supercrítica. Este processo se tornou muito importante para diferentes aplicações, permitindo inclusive a obtenção de matrizes poliméricas portadoras de fármacos para aplicações biomédicas de implantes (BARROS et al., 2017). Estes produtos se caracterizam por serem livres de solventes residuais, pois na despressurização o CO₂ se difunde rapidamente do polímero a temperatura ambiente, o que elimina os custos na remoção de solvente residual quando comparado com processos tradicionais que empregam solvente orgânico (BERENS et al., 1992).

Na Tabela 2, estão apresentas algumas aplicações de impregnação de substâncias ativas em matrizes poliméricas com CO₂ supercrítico.

Tabela 2 - Algumas aplicações de impregnação de substâncias ativas em matrizes poliméricas com CO₂ supercrítico

(Continuação)					
Ativo	Material	P (bar)	T (°C)	t (h)	Referencia
Partículas micrométricas ativas					
Óleo essencial de orégano	Amido de sorgo e arroz	80 - 150	40 - 50	3 - 24	Almeida et al. (2013)
Piroxicam	PVP	300	100	20 - 48	Banchero et al. (2009)
β-estradiol e 5-fluorouracil	PLGA	101-220	35 – 55	1,5 - 9	Guney e Akgerman (2002)
Óleo essencial de lavanda	Amido modificado	100 - 120	40 - 50	2	Varona et al. (2011)
5-fluorouracil	PLA	100 - 200	40 - 60	2	Zhan et al. (2013)
Filmes ativos					
Natamicina	Alginato de sódio	200	40	2,5 - 14	Bierhalz et al. (2013)
Eugenol	LLDPE	100 - 150	45	4	Goñi et al. (2016)
Óleo essencial de cravo	LLDPE	150 - 250	25 - 45	2	Medeiros, Ferreira e Carciofi (2017)
Cinamaldeído	Amido de mandioca	150 - 250	35	3 - 5	Souza et al. (2014)
Timol	LLDPE	70 - 120	40	4	Torres et al. (2014)
Timol	PLA	90 - 120	40	3	Torres et al. (2017)
Roxitromicina	PLA	300	70	2	Yu et al. (2011)
Ibuprofeno	Quitosana	200	40	0,5 - 3	Tang et al. (2014)
Pulegona e timoquinona	LLDPE	100 - 150	45	2 - 4	Goñi et al. (2017)
Filmes curativos para feridas					
Quercetina e timol	Quitosana e agarosa	100 - 200	30 - 50	3	Dias et al. (2011)
Extrato de Libidibia ferrea	Quitosana, colágeno/celulosa e ácido-base hialuronico	270	50	15	Dias et al. (2013)
Aerogéis ativos					
Timol	Amido de milho e de tapioca	155	35	24	Milovanovic et al. (2015a)

Tabela 2 - Algumas aplicações de impregnação de substâncias ativas em matrizes poliméricas com CO₂ supercrítico

					(Conclusão)
Ativo	Material	P (bar)	T (°C)	t (h)	Referencia
Macropartículas ativas					
Timol	Acetato de celulose	100 - 200	35 - 50	2 - 44	Milovanovic et al. (2015b)
Anticorpos para immuno-globina	PMMA	40	140	2,5	Sproule et al. (2004)
Material de estrutura porosa (<i>Scaffold</i>)					
Timol	PCL e PCL-HA	100 - 300	35 - 40	2	Ivanovic et al. (2016)
Lentes de contato terapêuticos					
Acetazolamida	Balafilcon A	150 - 200	40 - 50	1 - 3	Braga et al. (2011)
Acetazolamida e timolol	Balafilcon A	170	40	1,5	Costa et al. (2010a)
Flurbiprofeno e timolol	Nelfilcon A, Omaficon A, Methafilcon A e Hilafilcon B	90 - 160	40	0,5 - 3	Costa et al. (2010b)
Flurbiprofeno, ibuprofeno e dexametasona	Hilafilcon B	120	40	2,5	Yañez et al. (2011)
Lentes intraoculares ativos					
Norfloxacin	Acrílico	150 - 300	40	14	González-Chomón et al. (2012)
Implante polimérico subconjuntival					
Timolol	PCL	110 - 200	40	2	Natu, Gil e Sousa (2008)
Hidrogel ativo para tratamento oftálmico					
Flurbiprofeno e timolol	Quitosana	90 - 140	30 - 50	1	Braga et al. (2008)

PVP: Poli (vinilpirrolidona), PCL: Poli (ε-caprolactona); PCL-HA: Poli (ε-caprolactona) -hidroxiapatita, PLA: Poli (ácido l-láctico); MMA: metil metacrilato; MAA: ácido metacrílico; PLGA: Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico); PVP: Polivinilpirrolidona.

Fonte: Própria autoria.

Na Tabela 2 observa-se que a impregnação supercrítica tem sido usada na formação de partículas de substâncias ativas, o que é possível quando a substância ativa é solúvel em CO₂-SC e as partículas do biomaterial carreador são porosas (PERRUT; JUNG; LEBOEUF, 2005b). Assim, este processo, quando comparado aos processos de precipitação supercrítica, carece de etapas de precipitação que controlam tamanhos e morfologia das

partículas, de modo que estas características são definidas pela estrutura física inicial das partículas do biomaterial empregado como carreador.

Uma comparação mais detalhada dos principais processos supercríticos de formação de partículas se encontra na Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação de algumas técnicas de formação de partículas

Processo	Solubilidade do substrato	Solubilidade da matriz	Tipo de partículas	Observações
RESS	Sim	Sim	Microesferas	Poucos materiais substrato/parede solúveis em CO ₂ supercrítico Possível uso de SFC polar
Antisolvente supercrítico	Não	Não	Microesferas e microcápsulas, Complexos de ciclodextrina	Dificuldade para a separação do solvente orgânico com o CO ₂ , e para o aumento de escala Consumo de CO ₂ muito baixo
Impregnação	Sim	Não	Ativo adsorvido pelo carreador poroso	Impregnação do material carreador com o ativo extraído Fácil aumento de escala Raramente usados para aprimoramento de dissolução

Fonte: Modificado de PERRUT, M.; JUNG, J.; LEBOEUF, F. Enhancement of dissolution rate of poorly-soluble active ingredients by supercritical fluid processes: Part II: Preparation of composite particles. **International journal of pharmaceutics**, Lille, v. 288, n. 1, p. 11-16, 2005b.

Em relação à configuração do equipamento necessário para essa aplicação, Cocero et al. (2009) descreveu que para o processo SSI dois elementos principais são: uma coluna de solubilização para a saturação do CO₂-SC com a substância ativa, e uma coluna de impregnação para o contato e sorção da solução no carreador polimérico poroso. Porém, existe certa versatilidade na configuração. Outros autores, como Almeida et al. (2013) e Varona et al. (2011), prescindiram de duas colunas e usaram somente uma autoclave para a solubilização e impregnação de óleos essenciais em amido (Figura 2).

Figura 2 - Equipamento usado para impregnação assistida por CO₂ supercrítico

AM: Agitador magnético, TP: Transdutor de alta pressão, AI: Autoclave de impregnação, CT: Controle de temperatura.

Fonte: ALMEIDA, A. P. et al. Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials using supercritical fluid technology. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 20, p. 140-145, 2013.

No processo de impregnação supercrítica interagem no mínimo três elementos: a substância de interesse, o CO₂-SC e o polímero. De estudos de sistemas binários polímero + CO₂-SC, sabe-se que três fenômenos acontecem simultaneamente: a sorção de CO₂-SC no polímero, o inchamento reversível do polímero e a diminuição da temperatura de transição vítrea (T_g), também conhecida como plastificação (KIKIC; VECCHIONE, 2003). A explicação desses fenômenos reside nas forças intermoleculares entre o polímero e o CO₂, que podem ser não específicas (forças de Van der Waals) ou específicas como pontes de hidrogênio, ácido-base e outros tipos de interação doador-receptor com pares de átomos não compartilhados de O, N, S (KAZARIAN et al., 1996; KAZARIAN et al., 1997).

Com base nesses fenômenos de interação de polímero + CO₂-SC a impregnação supercrítica é possível, pois as cadeias do polímero se movimentam mais livremente, facilitando o deslocamento das cadeias moleculares umas sobre as outras, provocando o amaciamento do polímero, o que facilita a difusão da substância ativa solubilizada em CO₂-SC no polímero (BERENS et al., 1992; CHIOU et al., 1985; GUNEEY; AKGERMAN, 2002; KAZARIAN, 2000; KELLY et al., 2012; NALAWADE et al., 2006; ÜZER; AKMAN; HORTAÇSU, 2006; WANG et al., 2002; WEBB; TEJA, 1999; WISSINGER; PAULAITIS, 1987).

As propriedades da substância ativa também são determinantes no processo de impregnação supercrítica, pois não somente a substância ativa deve ser solúvel em CO₂-SC, mas também deve existir um alto coeficiente de partição da substância ativa entre as fases

de polímero e fluido supercrítico, ou seja, deve existir afinidade da substância ativa com o polímero (COCERO et al., 2009; KAZARIAN; MARTIROSYAN, 2002; KIKIC; VECCHIONE, 2003). De outra forma poderia acontecer que a carga impregnada (q = massa de substância ativa/massa de polímero) é muito baixa, e a substância ativa poderia ficar na superfície do material polimérico ou simplesmente se perderia por arraste durante a despressurização.

Uma representação das interações que acontecem na impregnação supercrítica está apresentada na Figura 3.

Figura 3 - Interações no sistema de impregnação assistido por CO₂ supercrítico

Fonte: KIKIC, I.; VECCHIONE, F. Supercritical impregnation of polymers. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, Madison, v. 7, n. 4, p. 399-405, 2003.

Em nível tecnológico, o processo de impregnação supercrítica é afetado por vários parâmetros como temperatura e pressão, que determinam as propriedades solventes do CO₂-SC (HOWDLE et al., 1994; KAZARIAN et al., 1997; VON SCHNITZLER; EGGERS, 1999), e parâmetros como o tempo de impregnação e a taxa de despressurização que influem na carga, penetração e uniformidade de dispersão da substância ativa no carreador polimérico (BRAGA et al., 2008; KAZARIAN; MARTIROSYAN, 2002). Por isso, esses parâmetros são explorados em cada aplicação dependendo da natureza da substância ativa e do polímero.

Nesse sentido, Cocero et al. (2009) sugeriram que, para melhorar a aplicabilidade e o desempenho deste processo, é necessária uma compreensão detalhada das interações entre polímero, CO₂ e substância ativa, e de como a substância ativa está ligada ou adsorvida no polímero.

Um ingrediente inovador de interesse para a indústria de alimentos, farmácia e cosmética que poderia obter-se mediante impregnação supercrítica é o licopeno em pó. As características deste pigmento estão apresentadas na seguinte seção.

2.3 Licopeno

2.3.1 Licopeno e formação de partículas em pó

O licopeno é um dos 600 carotenoides encontrados na natureza, sendo conhecido por ser o pigmento que confere a coloração vermelha de certos frutos como o tomate, melancia, goiaba e mamão. A molécula do licopeno é acíclica com 11 duplas ligações conjugadas e duas duplas ligações não conjugadas normalmente na configuração *all-trans* (BRAMLEY, 2000) (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura química do licopeno (*all-trans* licopeno)

Fonte: KUN, Y.; LULE, U.S.; XIAO-LIN, D. Lycopene: Its properties and relationship to human health. **Food Reviews International**, New York, v. 22, n. 4, p. 309-333, 2006.

O elevado número de duplas ligações conjugadas do licopeno confere à molécula atividade antioxidante destacada quando comparada com outros antioxidantes conhecidos, pois a capacidade do licopeno em sequestrar o oxigênio *singlete* equivale ao dobro da capacidade do β -caroteno e dez vezes a capacidade do α -tocoferol (DIMASCIO; KAISER; SIES, 1989). Assim, diversos estudos epidemiológicos de culturas celulares e testes em animais relataram evidências para sugerir que a atividade antioxidante do licopeno fornece proteção contra doenças influenciadas por reações de radicais livres, tais como o câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, câncer de estômago, câncer de pele, e doença cardíaca coronária (BRAMLEY, 2000; KUN; LULE; XIAO-LIN, 2006; PERVEEN et al., 2015; RAO; AGARWAL, 1999; SOARES et al., 2015).

No entanto, a estrutura altamente insaturada do licopeno o torna susceptível à isomerização e oxidação por fatores ambientais como a luz, temperatura e oxigênio durante o processamento tecnológico e armazenamento (LEE; CHEN, 2002; MATIOLI;

RODRIGUEZ-AMAYA, 2002). Por isso, a formação de partículas de licopeno em um material carreador representa uma alternativa para minimizar ou retardar a degradação do pigmento, e facilitar seu uso como ingrediente em produtos funcionais.

Vários estudos aplicaram diferentes métodos e materiais carreadores para a formação de partículas de licopeno (Tabela 4), e atingiram em muitos casos eficiências superiores ao 90%. Porém, a formação de partículas com uma alta eficiência do processo inclusive com a observação de morfologias consideradas adequadas, não é garantia de uma proteção efetiva do pigmento no tempo considerado na avaliação da estabilidade (DURANTE et al., 2016; SILVA et al., 2012). Por isso, novas técnicas e biomateriais carreadores estão sendo estudadas na formação de partículas de licopeno.

Tabela 4 - Estudos de formação de partículas de licopeno com diferentes materiais e métodos

(Continuação)			
Método	Material carreador	Eficiência (%)	Referência
Coacervação complexa (complex coacervation)	Gelatina-pectina	89,5 - 93,2	Silva et al. (2012)
	Gelatina e goma arábica	90,73 - 99,63	Rocha-Selmi, Fávaro-Trindade e Grosso (2013)
Pulverização eletrostática (electrospraying) e secagem por pulverização (spray drying)	WPC (Lacprodan®), dextrana e quitosana	1,3 - 75,2	Pérez-Masiá, Lagaron e Lopez-Rubio (2015)
Crioconcentração (freeze drying)	Gelatina e poli (γ -ácido glutâmico)	76,50	Chiu et al. (2007)
	α -Cyclodextrina	—	Durante et al. (2016)
Emulsificação ultrassônica e Crioconcentração (freeze drying)	Monoestearato de glicerol	64,40	Guo et al. (2012)
Gelificação inversa (inverse-gelation)	Alginato de cálcio	98,44 e 64,39	Celli et al. (2016)
Pulverização a frio (spray chilling)	Gordura composta por óleo hidrogenado e interesterificado de semente de algodão, soja e palma (Tri-HS-48).	—	Pelissari et al. (2016)

Tabela 4 - Estudos de formação de partículas de licopeno com diferentes materiais e métodos

			(Conclusão)
Método	Material carreador	Eficiência (%)	Referência
Secagem por pulverização (spray drying)	Goma arábica e maltodextrina	–	Matioli e Rodriguez-Amaya (2002)
	α , β , γ -Ciclodextrina	–	Matioli e Rodriguez-Amaya (2003)
	Maltodextrina	93,19	Goula e Adamopoulos (2012)
	Gelatina e sacarose	92,60	Ranveer et al. (2015)
	Amido modificado (Capsul [®])	21 - 29	Rocha, Fávaro-Trindade e Grosso (2012)
	Zeina	74,19 – 91,57	Xue et al. (2013)
Secagem por pulverização (spray drying) e inclusão molecular	Gelatina e sacarose	12,1 - 82,2	Shu et al. (2006)
	Goma arábica e sacarose	50	Nunes e Mercadante (2007)
Incubação de células rodeadas da substância bioativa	Células de <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	96,31	Pu e Tang (2017)
Formação de niosomas mediante técnica de Adsorção-hidratação	Colesterol e monoestearato de sorbitano	62,76	Sharma et al. (2016)
Liofilização	α , β , γ -Ciclodextrina	93,80	Blanch et al. (2007)

Fonte: Própria autoria.

Com relação aos biomateriais testados nas pesquisas de formação de partículas de licopeno em pó, foi observado que a função principal do biomaterial é proteger o licopeno de agentes ambientais, e que o enfoque de utilização de um biomaterial que forneça propriedades adicionais às partículas de licopeno foi sugerido por Pu e Tang (2017) com a utilização de células de *Chlorella pyrenoidosa* como carreador com propriedades nutricionais.

A pesquisa de formação de partículas de licopeno empregando CO₂-SC é relativamente recente e limitada, os trabalhos nesse tema são analisados na seguinte seção.

2.3.2 Estado da arte da formação de partículas de licopeno com CO₂ supercrítico

A tecnologia de CO₂-SC tem sido pesquisada amplamente na extração de licopeno a partir de diferentes matrizes vegetais (DURANTE et al., 2016; SHI et al., 2009). Recentemente, esta tecnologia mostrou potencial na formação de partículas de licopeno, motivo pelo qual existe interesse no design de processos com tecnologia de CO₂-SC que integrem operações de extração e formação de partículas. Com essa premissa, Blanch et al. (2007) propuseram o uso de CO₂-SC a 50 °C e 320 bar para a extração de licopeno e encapsulação simultânea em β -ciclodextrina. Nesse estudo, a passagem do CO₂ através do sistema transferiu o licopeno extraído a um recipiente com β -ciclodextrina, para assim formar um complexo de inclusão. Este processo reduziu o manuseamento da amostra e o tempo do processamento (3 h vs 20 h) quando comparado à liofilização como método convencional, porem ofereceu menor rendimento de encapsulação (67,5% vs 93,8%).

Outros trabalhos estiveram orientados à aplicação de técnicas de precipitação com CO₂-SC. O primeiro trabalho deste tipo foi de Miguel et al. (2006), que consistiu na precipitação de licopeno sem biomaterial carreador mediante técnica SAS, atingindo a micronização de cristais de licopeno usando soluções de diclorometano. A partir do estudo do efeito de vários parâmetros de operação (pressão, temperatura, concentração inicial da solução e vazão de CO₂) sobre o tamanho de partícula, morfologia e rendimento da precipitação, os autores recomendaram que os parâmetros operacionais do processo SAS devem ser orientados à redução da solubilidade do licopeno para aumentar a supersaturação, a qual permite a produção de partículas de licopeno de tamanho menor.

Em 2013, Nerome et al. (2013) aplicaram a precipitação supercrítica SEDS, que é uma modificação da técnica SAS, na formação de partículas de licopeno com um biomaterial carreador, utilizando N,N-dimetilformamida como solvente e CO₂-SC como anti-solvente na precipitação de partículas de um complexo de inclusão formado por licopeno e β -ciclodextrina. Para isso, estudaram o efeito de parâmetros de operação do processo (concentração inicial de licopeno e β -ciclodextrina, vazão de CO₂, e vazão da solução e a pressão e temperatura) no tamanho e morfologia das partículas. Os autores recomendaram o uso de alta temperatura e pressão, alta vazão de CO₂ e baixa vazão da solução para a formação de partículas de escala nanométrica.

Outra pesquisa em precipitação supercrítica foi feita por Cheng et al. (2017). Estes autores aplicaram a técnica SAS para encapsular licopeno com lecitina e α -tocoferol, estudando o efeito de parâmetros de operação do processo (vazão de CO₂, vazão da solução, pressão e temperatura, e concentração dos componentes) na morfologia, distribuição de tamanho, e na estabilidade de armazenamento das partículas. As partículas tiveram forma de agulha (*lath-like*) de 0,8 - 3 μ m, e foram relativamente estáveis.

No trabalho de Santos et al. (2012), a técnica SFEE foi usada como um tratamento prévio para processar uma mistura composta de licopeno dissolvido em diclorometano e uma solução aquosa de amido modificado, para obter uma nanoemulsão de licopeno que posteriormente foi processada via *spray-drying* para a formação de partículas em pó, as quais apresentaram morfologia esférica e fraturas na superfície.

Alguns detalhes dos trabalhos comentados de formação de partículas de licopeno com CO₂-SC estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Pesquisas de formação de partículas de licopeno com CO₂ supercrítico

Téc.	Biomaterial	P (bar)	T (°C)	EE (%)	Tamanho	Morf.	Fonte
SAS	-	70 - 150	35 - 45	-	10 - 80 μ m	Tipo agulha	Miguel et al. (2006)
SFE*	β -ciclodextrina	320	50	67,5	Nc	Nc	Blanch et al. (2007)
SFEE**	Amido modificado	90 - 130	80	34 - 89	344 - 366 nm	Esférica	Santos et al. (2012)
SEDS	β -ciclodextrina	100 - 140	40 - 50	Nc	40 nm	Esférica	Nerome et al. (2013)
SAS	Lecitina e α -tocoferol	80	47	34,5 - 56,5	0,8 - 3 μ m	Tipo agulha	Cheng et al. (2017)

Téc: Técnica, P: Pressão, T: Temperatura, EE: Eficiência de Encapsulação, Morf.: Morfologia, SAS: Antissolvente Supercrítico (*Supercritical Anti Solvent*), SFE: Extração com Fluido Supercrítico (*Supercritical Fluid Extraction*), SFEE: Extração de emulsões por Fluido Supercrítico (*Supercritical Fluid Extraction of Emulsions*), SEDS: Dispersão da Solução Melhorada por Fluidos Supercríticos (*Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids*), Nc: Não consta. * Com base nas características do processo, notou-se similaridade com um processo SIS. ** Características das partículas após processamento *Spray Drying* das emulsões obtidas via SFEE.

Fonte: Própria autoria.

O processo de formação de partículas influencia nas características do pó (Tabela 5), portanto, na sua qualidade. Nesse contexto, a seguinte seção aborda a caracterização de partículas de licopeno.

2.3.3 Caracterização de partículas de licopeno em pó

Na caracterização de partículas de licopeno em pó diferentes técnicas foram usadas dependendo da característica de interesse. Essas técnicas foram listadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Técnicas utilizadas na caracterização de partículas de licopeno

Pesquisa	Características das partículas de licopeno					
	Morfologia	Tamanho	Estrutura Química	Prop. Térmicas /Cristalinidade	Quantidade de licopeno	Estabilidade
Blanch et al. (2007)	—	—	E. Raman	-/DRX	HPLC	✓
Celli et al. (2016)	—	—	—	—	Esp.	x
Cheng et al. (2017)	MEV-EC	ELD	—	—	HPLC	✓
Chiu et al. (2007)	—	—	—	—	HPLC	✓
Durante et al. (2016)	MEV	—	FTIR	DSC/-	HPLC	✓
Goula e Adamopoulos (2012)	—	—	—	—	Esp.	✓
Guo et al. (2012)	MO	DL	—	DSC/-	Esp.	✓
Matioli e Rodriguez-Amaya (2002)	—	—	—	—	Esp.	✓
Matioli e Rodriguez-Amaya (2003)	—	—	—	—	Esp.	✓
Nerome et al. (2013)	MEV-EC	SEM	—	DSC/-	—	x
Nunes e Mercadante (2007)	MEV	—	—	—	Esp.	x
Pelissari et al. (2016)	MEV	DL	FTIR	-/DRX	Esp.	✓
Pérez-Masiá, Lagaron e Lopez-Rubio (2015)	MEV	MEV	FTIR	—	Esp.	✓
Pu e Tang (2017)	MF	—	—	TGA, DSC/DRX	HPLC	✓
Ranveer et al. (2015)	MEV	—	—	—	Esp.	✓
Rocha, Fávaro-Trindade e Grosso (2012)	MEV	—	—	—	Esp.	✓
Rocha-Selmi, Fávaro-Trindade e Grosso (2013)	MO	MO	—	—	Esp.	✓
Santos et al. (2012)	MO / MEV	—	—	—	Esp.	✓
Sharma et al. (2016)	MEV	MEV	—	—	Esp.	✓
Shu et al. (2006)	MEV	MEV	—	-/DRX	Esp.	✓
Silva et al. (2012)	MO/MEV	—	—	—	Esp.	✓
Xue et al. (2013)	MEV	—	—	—	HPLC	✓

DL: Difração a Laser; DSC: Calorimetria diferencia de varredura (*Differential Scanning Calorimetry*), ELD: Espalhamento de Luz Dinâmica; Esp.: Espectrofotometria; FTIR: Espectroscopia de Infravermelho de Transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy*); DRX: Difração de Raios X; HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*); MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura; MEV-EC: Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo; MF: Microscopia de fluorescência; MO: Microscopia ótica; TGA: Análise Termogravimétrica (*Thermogravimetric Analysis*).

Fonte: Própria autoria.

A morfologia foi uma característica comumente estudada nas partículas de licopeno (Tabela 6). Nesse contexto, a técnica de microscopia eletrônica de varredura foi mais usada do que a microscopia ótica, pois facilita a avaliação de diferentes materiais carreadores e dos mecanismos envolvidos no processo de formação das partículas (ROSENBERG; KOPELMAN; TALMON, 1985). Por outro lado, a microscopia de fluorescência foi recentemente usada para avaliar a encapsulação de licopeno em uma matriz celular, aproveitando a propriedade do pigmento de emissão de fluorescência como resposta à incidência de luz em um comprimento de onda específico (PU; TANG, 2017).

A medida do tamanho das partículas também foi de interesse em estudos de formação de partículas de licopeno (Tabela 6), pois tamanhos uniformes de escala micrométrica ou nanométrica nas partículas são relacionados com a melhora da solubilidade e biodisponibilidade da substância ativa (ESFANDIARI, 2015). Para a determinação de tamanho, uma técnica muito usada foi a técnica de difração a laser, que quando comparada a outras técnicas de medida de tamanho de partículas, tem vantagens como sua alta velocidade, boa confiabilidade e alta reprodutibilidade das medidas (MA et al., 2000). Por outro lado, quando se precisa apenas de uma estimativa do tamanho das partículas, as micrografias que foram usadas para análise de morfologia podem ser processadas em programas de análise de imagem para a medida aleatória do tamanho de um mínimo de 100 partículas como amostra representativa (NEROME et al., 2013).

A análise de propriedades térmicas por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e cristalinidade por Difração de Raios X (DRX) foi realizada em poucos estudos de formação de partículas de licopeno (Tabela 6). No entanto, essas propriedades são importantes para avaliar o sucesso do processo (COCERO et al., 2009). Por exemplo, mediante DSC, a não detecção de picos térmicos característicos do licopeno nas partículas resultantes foi interpretada por Nerome et al. (2013) e Durante et al. (2016) como evidencia da formação de um complexo de inclusão de licopeno em ciclodextrina, e por Pu e Tang (2017) como evidencia da formação de um sistema homogêneo entre o licopeno e células carreadoras. Entretanto, mediante DRX, a não detecção dos picos de cristalinidade característicos do licopeno nas partículas resultantes foi sugerida por Shu et al. (2006) como evidencia de interações entre o licopeno e o sistema carreador (gelatina). Além, a DRX foi usada por Blanch et al. (2007) para avaliar se o CO₂-SC altera a estrutura cristalina de β -ciclodextrina.

A análise de estrutura química das partículas de licopeno foi feita em poucos trabalhos (Tabela 6), sendo a FTIR a principal técnica usada para esse fim, pois permite detectar ligações químicas que podem ocorrer entre o licopeno e o biomaterial carreador, e detectar alterações moleculares (DURANTE et al., 2016; PELISSARI et al., 2016). No caso da formação de partículas com CO₂-SC, a técnica FTIR pode ser empregada no estudo de novos biomateriais carreadores para identificar grupos funcionais de caráter apolar que interagem com o CO₂ (KAZARIAN et al., 1996,1997). Uma técnica similar ao FTIR é a espectroscopia de ressonância micro-Raman, que foi usada por Blanch et al. (2007) para obter informação molecular específica da formação e estabilidade no armazenamento de um complexo de inclusão licopeno-ciclodextrina.

Uma característica comumente avaliada nas pesquisas de formação de partículas de licopeno é a quantificação do licopeno mediante técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência ou espectrofotometria (Tabela 6). A determinação do licopeno permite o cálculo da eficiência de encapsulação e o estudo da estabilidade do licopeno encapsulado durante o armazenamento em condições controladas. Outras técnicas utilizadas em estudos de estabilidade de licopeno em pó foram a medida da cor instrumental das partículas no sistema Lab (PELISSARI et al., 2016) e a medida da atividade antioxidante através do método de sequestro do radical ABTS (PÉREZ-MASIÁ; LAGARON; LOPEZ-RUBIO., 2015).

As propriedades do carreador também influenciam nas características das partículas de licopeno. Por isso, na seguinte seção se descreve o CH como biomaterial carreador.

2.4 Colágeno hidrolisado

O CH é uma mistura de polipeptídeos obtido através da hidrólise de colágeno desnaturado (LI et al., 2005; ZHANG; LI; SHI, 2006). O processo de hidrólise é enzimático pelo qual a distribuição de pesos moleculares, a estrutura dos polipeptídeos, e consequentemente as propriedades do CH dependem das condições do processo (pH, temperatura e tempo) e da especificidade da enzima utilizada no processo (DENIS et al., 2008; GUILLERMINET et al. 2010; LI et al., 2005). Contudo, o CH, em comparação com a gelatina, tem uma massa molar menor e melhor capacidade de retenção de água (PEI et al., 2013).

O CH é usado na área cosmética como agente tópico hidratante para melhorar e proteger a estrutura e função da pele (LANGMAIER et al., 2001; LANGMAIER et al., 2002; LI et al., 2005; SECCHI, 2008; YORGANCIOGLU; BAYRAMOGLU, 2013). Quando o CH é ingerido, é fonte de peptídeos biologicamente ativos que se liberam durante a digestão gastrointestinal, proporcionando benefícios múltiplos na saúde (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011), dado que há estudos que evidenciam que o consumo de CH pode aumentar a umidade e elasticidade da pele, diminuindo a presença de rugas e aspereza (INOUE et al., 2016; WANG et al., 2017). Também, há evidências do potencial do CH como agente terapêutico no tratamento de doenças dos ossos e articulações como a osteoartrite e a osteoporose (MOSKOWITZ, 2000; PORFÍRIO; FANARO, 2016). Esses benefícios podem ser atribuídos à presença de dois aminoácidos essenciais no CH (glicina e prolina) que preferencialmente são acumulados pelo organismo na cartilagem ajudando à estabilização e regeneração deste tecido (BELLO; OESSER, 2006; CLARK, 2007), e à maior biodisponibilidade dos aminoácidos devido ao reduzido tamanho das cadeias peptídicas quando comparado com a gelatina e a fibra de colágeno (GUILLERMINET et al., 2010; IWAI et al., 2005; MOSKOWITZ, 2000; WU et al., 2004).

As propriedades do CH o tornam um aditivo potencial em alimentos (MORIMURA et al., 2002). Além disso, o CH é geralmente reconhecido como ingrediente alimentar seguro pelas agências reguladoras, motivo pelo qual existem pesquisas que estudaram a incorporação de CH em uma bebida de leite fermentado (WALRAND et al., 2008) e sua utilidade como substituto da manteiga de cacau (NEYESTANI-MOHAMMAD; MOHAMMADIFAR, 2014).

Na área de biomateriais, o CH foi empregado na fabricação de filmes biodegradáveis comestíveis com uso potencial para controlar o tempo de liberação de um composto ativo (LANGMAIER et al., 2008a, b), filmes compostos (PEI et al., 2013) e filmes de desintegração oral (BORGES et al., 2016), ou para conferir caráter biodegradável a filmes misturados com polímero sintético (DESELCU; MILITARU; DESELCU, 2014).

Assim, surge o interesse em estudar a aplicação do CH como material carreador na formação de partículas de substâncias bioativas. Por conseguinte, este trabalho foi conduzido ao estudo da formação de partículas de licopeno em CH usando CO₂-SC através do cumprimento dos objetivos descritos na seguinte seção.

3 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a formação de partículas de licopeno usando pó de CH comercial como material carreador em CO₂-SC. Os objetivos específicos abrangem os seguintes passos:

- Determinar a solubilidade do CH em CO₂-SC;
- Definir a melhor proporção de CH/licopeno para a formação de partículas de licopeno em CH;
- Identificar a melhor condição de pressão e temperatura do CO₂-SC para a formação de partículas de licopeno em CH;
- Sugerir o mecanismo de formação de partículas envolvido no processo com base nas características das partículas como sua morfologia, distribuição do tamanho, comportamento térmico, estruturas químicas, capacidade de carga e estrutura física interna.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Neste estudo foram utilizados pó de CH de origem suíno (Peptinex®, Gelnex™, Itá, SC, Brasil) como material matriz/carreador, licopeno em dispersão (20% em óleo de girassol) (Lycovit®; BASF, Ludwigshafen, Alemanha) como material bioativo de interesse, CO₂ líquido (Linde, SP, Brasil) como fluido para o meio supercrítico, e etanol anidro (99,9%) (AppliChemPanreac, Darmstadt, Alemanha) como dispersante.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Medida da solubilidade do colágeno hidrolisado em CO₂ supercrítico

A medida experimental da solubilidade do CH em CO₂-SC foi feita em um equipamento montado no Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN) da FZEA (Universidade de São Paulo, Brasil). Integrado por: (1) tanque de CO₂, (2) sistema de refrigeração a -5 °C, (3) trocador de calor, (4) bomba de líquido, (5) tanque pulmão, (6) extrator de leito fixo, (7) banho termostático, (8) coletor de volume conhecido (8,58 cm³), (9) frasco, válvulas de regulagem (V1-5) e manômetros (M1,2). Uma representação do equipamento encontra-se na Figura 5.

Figura 5 - Equipamento para a medida experimental da solubilidade em CO₂ supercrítico

Fonte: Modificado de CORNELIO-SANTIAGO, H. P. et al. Supercritical CO₂ extraction of oil from green coffee beans: solubility, triacylglycerol composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling. *Journal of Supercritical Fluids*, Amsterdam, 2017. doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.030

A medida experimental consistiu em submeter o CH (10 g) disperso em pérolas de vidro em contato estático com CO₂-SC na condição fixa de 150 bar e 60 °C (condição comumente usada para a formação de partículas de substâncias termosensíveis) durante o período de 1 h para garantir o equilíbrio de fases na célula de equilíbrio (leito fixo), testes com menor tempo de contato revelaram similar solubilização do CH. Logo, uma amostra da solução em equilíbrio (biomaterial + CO₂-SC) foi deslocada para um coletor de volume conhecido (8,58 cm³), mantendo a pressão do leito fixo constante durante a abertura simultânea das válvulas V2 e V3. Para que não ocorresse queda de pressão (P) durante a coleta, um ΔP de 20 bar foi mantido entre o tanque pulmão (5) e a célula de equilíbrio (6). A amostra deslocada foi removida do coletor de volume conhecido para um frasco coletor (9) mediante despressurização, e lavagem do coletor com água destilada e etanol. O material arrastado e solubilizado em água e etanol foi seco, para determinar a massa solubilizada de CH por gravimetria. As medidas foram feitas em triplicata.

A solubilidade em CO₂-SC foi calculada pela seguinte relação (Equação 1).

$$S = \frac{X}{V \cdot \rho_{CO_2}} \quad (1)$$

Onde: S = solubilidade (g material/kg CO₂); X = massa do material solubilizado deslocado ao coletor (g soluto); V = Volume do coletor (8,58 cm³); ρ = densidade da solução expressa como densidade do solvente (g CO₂/mL) devido à alta razão solvente/material. A densidade do CO₂ foi calculada mediante a equação de Huang et al. (1985) usando o programa "DCO21.for" desenvolvido por Silva (1999).

4.2.2 Preparo da mistura física inicial

Na escolha da proporção dos materiais que integram a mistura física inicial, por não existirem pesquisas de uso do CH como biomaterial na formação de partículas, foram utilizadas como referência as pesquisas onde a gelatina tem sido usada como biomaterial carreador do licopeno mediante métodos convencionais (CHIU et al. 2007; RANVEER et al.

2015; ROCHA-SELMÍ; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2013; SHU et al. 2006; SILVA et al. 2012), pois a gelatina é um material de natureza similar ao CH.

As proporções relatadas na literatura foram muito variadas, pelo que optou-se por basear-se na maior proporção estudada, a qual foi a faixa de proporções de 3,9:1 a 8,7:1 g do biomaterial (gelatina + outro material)/g licopeno estudada por Chiu et al. (2007). Assim, as misturas físicas consistiram de 10 g de diferentes proporções de CH/licopeno (4:1, 6:1, 8:1 e 10:1 (m/m)) e 4,5 g de etanol anidro como dispersante. A mistura física foi feita manualmente aproximadamente por 2 minutos até dispersar completamente o licopeno na solução.

4.2.3 Formação de partículas usando CO₂ supercrítico

Na formação de partículas foi utilizado um equipamento SFC/RESS (Thar Instruments Co./Waters, Pittsburgh, USA), no qual as misturas feitas na etapa anterior foram colocadas no interior de uma autoclave e submetidas ao contato com aproximadamente 120 g de CO₂-SC em uma condição fixa de pressão e temperatura com um tempo de contato de 45 min e agitação de 1,250 rpm, condições de tempo e agitação usadas por Machado, Pelegati e Oliveira (2016) para o mesmo equipamento. Após a despressurização lenta (aprox. 15 min), as partículas foram coletadas do interior da autoclave e colocadas em frascos de vidro cobertas com papel alumínio e armazenadas em refrigeração (4 °C) até a caracterização, para evitar degradação pelo oxigênio, luz e alta temperatura.

Na formação de partículas foram feitos dois estudos: o primeiro foi chamado de estudo de proporções de CH/licopeno, e o segundo foi chamado de estudo de condições de CO₂-SC.

No estudo de proporções de CH/licopeno, as misturas de proporções 4:1, 6:1, 8:1 e 10:1 (m/m) foram processadas na condição de CO₂-SC de 140 bar e 50 °C para identificar a proporção que permita a formação de partículas com melhores características de morfologia, tamanho e capacidade de carga. Logo, a proporção selecionada foi processada em condições menos severas de CO₂-SC (120 bar e 45 °C, e 100 bar e 40 °C), as quais foram condições de CO₂-SC estudadas por Nerome et al. (2013).

No estudo de condições de CO₂ supercrítico, a melhor proporção de CH/licopeno foi processada em diferentes condições de CO₂-SC as quais foram: 150 bar e 50 °C, 150 bar e

60 °C, 250 bar e 50 °C, e 250 bar e 60 °C. Além disso, um estudo binário (CH + CO₂-SC) foi feito nessas condições, para o qual 10 g de CH puro foram processados em vez da mistura física.

Uma representação do equipamento utilizado se encontra na Figura 6.

Figura 6 - Desenho esquemático do equipamento de formação de partículas em CO₂ supercrítico.

Cilindro de CO₂ (1), válvulas (2), banho termostaticado (3), bomba do CO₂ (4), manômetro (5), autoclave (6), misturador (7) e garrafa de coleta de despressurização (8).

Fonte: Própria autoria.

4.2.4 Caracterização das partículas

A caracterização das partículas de CH e de partículas de licopeno em CH consistiu nas seguintes análises.

4.2.4.1 Morfologia das partículas

O estudo da morfologia das partículas foi realizado por meio de microscopia eletrônica de varredura usando um microscópio TM 3000 (Hitachi, Kyoto, Japão). Para isso, as amostras foram fixadas numa fita dupla face de carbono (Ted Pella, Redding, CA, Estados Unidos), a qual permite que as partículas não condutoras sejam observadas em baixas magnificações sem a necessidade de um recobrimento metálico; após fixação, as amostras

foram colocadas em suportes de alumínio, e analisadas com um diferencial de potencial de 5Kv e corrente de 1,750 mA (PELISSARI et al., 2016). Optou-se por ampliações de 100 e 1000 (1 k) vezes para observar a aglomeração e estrutura externa das partículas, respectivamente.

4.2.4.2 Distribuição do tamanho das partículas

No estudo do perfil de tamanho das partículas foi utilizado um equipamento de difração de raio laser em comprimento de onda de 375 nm SALD-201V (Shimadzu, Tóquio, Japão), o qual é sensível à faixa de tamanho de 0,01 e 300 μm . As partículas foram dispersadas em vaselina líquida (Synth, Diadema, SP, Brasil), homogeneizadas com ajuda de ultrassom por 1 minuto, e colocadas em cubetas de quartzo para a leitura (SANTOS, 2016). As medidas foram feitas em triplicata, e a partir dos perfis de distribuição volumétrica do tamanho foram determinados seus descritores de distribuição como a média por diâmetro de De Brouckere - $D(4,3)$, mediana, moda e largura da distribuição.

4.2.4.3 Solubilidade das partículas em água

A solubilidade em água das partículas de CH e das partículas de licopeno em CH foi medida com base no método de Ayoub e Rizvi (2008). Para isso, uma amostra de 0,4 g foi dispersada em 40 mL de água destilada e aquecida a 60 °C durante 10 min em banho-maria. Esta dispersão foi centrifugada a 1.800 rpm durante 20 min. Uma alíquota do sobrenadante foi seca a 105 °C até peso constante para determinar a quantidade de material dissolvido. A solubilidade das partículas foi expressada em percentagem de massa de material dissolvido/massa de material usado. As medidas foram feitas em triplicata.

4.2.4.4 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas (temperatura de fusão- T_m e temperatura de transição vítrea- T_g) dos materiais individuais e das partículas formadas foram determinadas a partir de termogramas obtidos com um calorímetro diferencial de varredura DSC-TA2010 (Thermal Analysis Instruments, Newcastle, Estados Unidos) controlado por um módulo TA5000 (Thermal Analysis Instruments, Newcastle, Estados Unidos). Para isso, uma quantidade conhecida de amostra foi pesada, acondicionada em cadinhos herméticos, aquecida a 20 °C/min (NEROME et al. 2013), e submetida à varredura de temperatura de -100 °C a 250 °C em atmosfera inerte de nitrogênio (45 mL N_2 /min) (MACHADO; PELEGATI; OLIVEIRA, 2016). As medidas foram feitas em duplicata.

4.2.4.5 Estrutura química

O estudo das possíveis alterações e ligações formadas na estrutura química das partículas de licopeno em CH foi realizada através da espectroscopia FT-IR, usando um espectrômetro de infravermelho Spectrum One (Perkin Elmer, Norwalk, Estados Unidos). As amostras foram adicionadas diretamente no equipamento em um acessório (Universal ATR Sampling Accessory), e realizaram-se 20 varreduras na faixa de 4000-650 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

4.2.4.6 Liberação do licopeno em solvente orgânico

Com o intuito de investigar como o licopeno se encontra na microestrutura das partículas de CH, adaptou-se a metodologia de Kim, Chen e Pearce (2005). O procedimento consistiu na mistura instantânea de 0,1 g de partículas com 10 mL de acetona (Merck, Darmstadt, Alemanha), e na filtração da mistura a vácuo, utilizando um filtro de politetrafluoretileno (PTFE) de tamanho de poro de 0,45 μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Alemanha). A fase líquida filtrada foi colocada em uma capela para evaporação do solvente, e o pó restante foi submetido ao mesmo procedimento de lavagem por mais duas vezes. A determinação da massa liberada de licopeno foi determinada por gravimetria. As medidas foram feitas em duplicata.

4.2.4.7 Estrutura física interna de partículas

Na análise da estrutura física interna das partículas e observação da distribuição do licopeno nelas, foi utilizado um microscópio confocal de fluorescência (Zeiss, LSM 780 invertido, Alemanha) com excitação por dois fótons (laser titânio: safira 800 nm, 80 MHz, pulso 100 fs), lente objetiva: 20x; 0,8NA; wd = 0,5 mm (ar), e detectores GaAsP de alta sensibilidade para imagem espectral de 400-700 nm.

4.2.5 Análise Estatística

A comparação de médias foi feita mediante análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (5%) usando o programa estatístico *Statistica* (versão 12.0, Statsoft, Estados Unidos).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Solubilidade do colágeno hidrolisado em CO₂ supercrítico

A solubilidade do CH em CO₂-SC em uma condição comumente usada em aplicações de formação de partículas de substâncias termosensíveis está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Solubilidade de alguns biomateriais em CO₂ supercrítico

Biomaterial	Condição do CO ₂ supercrítico	Solubilidade (g material/ kg CO ₂)	Fonte
Colágeno hidrolisado	150 bar e 60 °C (ρ: 605 g/L)	0,51 ± 0,01*	Resultado deste trabalho
Polihidroxibutirato	152 bar e 55 °C (ρ: 657 g/L)	0,90**	Khosravi-Darani (2003)
	152 bar e 65 °C (ρ: 561 g/L)	0,77**	
Ácido poliláctico	150 bar e 55 °C (ρ: 655 g/L)	0,56**	Tom e Debenedetti (1991)

*Média ± desvio padrão, n=3. ** Valores recalculados às unidades da Tabela.

Fonte: Própria autoria.

A solubilidade do CH é menor à observada em outros biomateriais que têm sido estudados com tecnologia supercrítica (Tabela 7). A análise desses valores é complexa, pois as condições de pressão e temperatura do sistema e as propriedades do polímero como a massa molar, distribuição da massa molar, o tamanho das cadeias moleculares e as interações intermoleculares influenciam na solubilidade; sendo esperado que a solubilidade em CO₂-SC de biomateriais (polímeros naturais) de alta massa molar seja baixa (KHOSRAVI-DARANI, 2003) assim como a solubilidade de polímeros que não possuem grupos funcionais de caráter apolar, pois não interagem com o CO₂ (KAZARIAN et al., 1996; KAZARIAN et al., 1997). Com base neste resultado e à não observação de arraste considerável do CH durante a despressurização pode se afirmar que o CH não apresenta potencial como biomaterial carreador para a formação de partículas com técnica RESS.

A solubilidade do CH em condições de maior densidade de CO₂-SC não foi estudada, pois embora a solubilidade pode ser maior, a alta quantidade de CO₂ requerida na técnica RESS limitaria sua aplicação prática. Na seguinte seção, outras características do CH se tornaram mais importantes para estabelecer uma estratégia de utilização como carreador.

5.2 Estudo de proporções de colágeno hidrolisado/licopeno

As partículas de licopeno em CH formadas com diferentes proporções de CH/licopeno tiveram aparência de pó com intensidade de coloração vermelha diretamente dependente da quantidade de licopeno utilizada na mistura física inicial (Figura 7).

Figura 7 - Aparência física das partículas de licopeno segundo a proporção colágeno hidrolisado/licopeno

Fonte: Própria autoria.

5.2.1 Morfologia das partículas

A morfologia das partículas de CH e das partículas de licopeno em CH foi estudada mediante microscopia eletrônica de varredura (Figuras 8-11).

Figura 8 - Micrografias das partículas de colágeno hidrolisado: A) 100x e B) 1.0kx

Fonte: Própria autoria.

A morfologia das partículas de CH foi principalmente esférica com pequenos poros superficiais e sem aglomeração entre partículas (Figura 8). Essas características, com exceção da aglomeração, se preservaram nas partículas de licopeno em CH formadas com diferentes proporções de CH/licopeno (Figuras 9-11). O que indica potencial do CH como material carreador seguindo estratégias de impregnação supercrítica (BLANCH et al., 2007; PERRUT; JUNG; LEBOEUF, 2005b).

Figura 9 - Micrografias das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado em CO₂ supercrítico a 140 bar e 50 °C nas proporções de colágeno hidrolisado/licopeno 4:1 A) 100x e B) 1.0kx; 6:1 C) 100x e D) 1.0kx

Fonte: Própria autoria.

A aglomeração das partículas foi maior na proporção 4:1 de CH/licopeno (Figura 9A, B), e pode ser atribuída ao excesso de licopeno livre na superfície das partículas. Isso, evidencia supersaturação da capacidade de carga do CH, motivo que também poderia explicar a falta de outras mudanças como fissuras ou fragmentações das partículas, indicando flexibilidade da partícula ao possível inchamento com CO₂-SC. Nas partículas

formadas com proporções 6:1 e 8:1 de CH/licopeno (Figuras 9C e 10A), observou-se que a aglomeração das partículas se reduz consideravelmente, pois como é lógico, o uso de menor quantidade de licopeno na mistura física inicial reduz a supersaturação da capacidade de carga das partículas de CH.

Figura 10 - Micrografias das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado em CO₂ supercrítico a 140 bar e 50 °C nas proporções de colágeno hidrolisado/licopeno 8:1 A) 100x e B) 1.0kx; 10:1 C) 100x e D) 1.0kx

Fonte: Própria autoria.

As partículas formadas com a proporção 10:1 de CH/licopeno (Figura 10D) apresentaram fissuras que poderiam ser explicadas pela menor quantidade de licopeno na superfície das partículas de CH. Ao contrário a outras tecnologias de formação de partículas, a formação de fissuras pode representar uma oportunidade para uma maior capacidade de carga e melhor uniformidade do licopeno na estrutura física do CH.

No estudo da mesma proporção (10:1) em condições menos severas com CO₂-SC a 120 bar e 45 °C (Figura 11B) e CO₂-SC a 100 bar e 40 °C (Figura 11D), foi observada uma redução na formação de fissuras na superfície das partículas, que indicou que a condição de CO₂-SC a 140 bar e 50 °C é necessária para a formação de partículas de licopeno em CH quando se considera uma melhora na impregnação do pigmento via fissuras formadas.

Assim, as características morfológicas das partículas de CH sem tratamento e das partículas de licopeno em CH revelaram evidências para afirmar que a formação de partículas segue um mecanismo de impregnação supercrítica, onde o licopeno é incorporado na estrutura porosa das partículas de CH.

Figura 11 - Micrografias das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado na proporção de 10:1 de colágeno hidrolisado/licopeno: A) 100x e B) 1.0kx em CO₂ supercrítico a 120 bar e 45 °C; C) 100x e D) 1.0kx em CO₂ supercrítico a 100 bar e 40 °C

Fonte: Própria autoria.

5.2.2 Distribuição de tamanho das partículas

Os perfis de tamanho das partículas de CH e de licopeno em CH formadas com diferentes proporções de CH/licopeno estão apresentados na Figura 12. Além, os descritores das distribuições de tamanho estão na Tabela 8.

Figura 12 - Distribuição do diâmetro das partículas: A) colágeno hidrolisado e B) licopeno em colágeno hidrolisado

Distribuição volumétrica. Medidas feitas em triplicata. Medidas da proporção 8:1 a 140 bar e 50 °C, e 10:1 a 120 bar e 45 °C não foram reportadas pela alta degradação das amostras.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 8 – Descritores da distribuição de tamanho das partículas de colágeno hidrolisado e de partículas de licopeno em colágeno hidrolisado

Material	Prop.	Tratamento	Descritores			
			Media* (μm)	Mediana (μm)	Moda (μm)	Faixa (μm)
Colágeno hidrolisado	–	–	126 ± 5^a	64 ± 2^b	71 (13,4%)	12-262
Licopeno em colágeno hidrolisado	4:1	140 bar e 50 °C	109 ± 1^b	86 ± 3^a	95 (25,2%)	40-170
	6:1	140 bar e 50 °C	108 ± 1^b	82 ± 3^a	95 (22,6%)	34-196
	10:1	140 bar e 50 °C	110 ± 2^b	84 ± 4^a	95 (23,5%)	40-196
	10:1	100 bar e 40 °C	109 ± 4^b	86 ± 3^a	95 (24,7%)	40-170

Prop.: Proporção de colágeno hidrolisado: licopeno (m/m). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$). * Diâmetro médio de De Brouckere – D (4,3).

Fonte: Própria autoria

O perfil de tamanho das partículas de CH (Figura 12A) mostrou distribuição unimodal, com faixa de tamanho de 12-262 μm e diâmetro médio (D (4,3)) de 126 μm (Tabela 8). Enquanto que, os perfis de tamanho das partículas de licopeno em CH (Figura 12B) apresentaram distribuição unimodal com menores faixas de tamanho que abrangem desde 34 μm ao máximo de 196 μm ; e menores diâmetros médios (D (4,3)) que variaram entre 108 a 110 μm , sem diferenças significativas. Esses descritores de distribuição sugerem que as partículas de licopeno em CH apresentam menores tamanhos do que as partículas de CH; no entanto, o valor de diâmetro médio das partículas de CH pode não ser exato, devido à detecção considerável de partículas com tamanho maior a 150 μm que dificilmente foram observadas nas micrografias do CH (Figura 8). Nesse sentido, outros descritores de distribuição que não são dependentes dos valores de tamanho extremos, como a mediana e moda foram mais confiáveis para estabelecer comparações. Assim, notou-se que o valor da mediana de 64 μm nas partículas de CH foi menor aos valores de mediana nas partículas de licopeno em CH, já que variaram entre 82 e 86 μm , sem diferenças significativas. Além o valor da moda de 71 μm nas partículas de CH foi menor ao valor da moda nas partículas de licopeno em CH que foi 95 μm (Tabela 8). Portanto, há evidências para afirmar que as partículas de licopeno em CH apresentam maior tamanho do que as partículas de CH, resultado que pode se atribuir ao inchamento causado pela adsorção de CO_2 e incorporação de licopeno no CH.

5.2.3 Liberação do licopeno em solvente orgânico

A carga liberada das partículas durante três lavagens sucessivas com acetona permitiu estudar a distribuição e capacidade de carga de licopeno na estrutura física do CH. A Figura 13 apresenta esses resultados.

Figura 13 - Liberação de carga das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado durante lavagem em solvente orgânico

Medidas feitas em duplicata. Letras diferentes no mesmo lavagem indicam diferença significativa ($p < 0.05$). A carga está expressada na relação g licopeno em óleo de girassol liberado/g de colágeno hidrolisado da mistura inicial. Medidas da proporção 8:1 a 140 bar e 50 °C, e 10:1 a 120 bar e 45 °C não foram realizadas pela degradação das amostras.

Fonte: Própria autoria.

Na Figura 13, observam-se diferenças na carga liberada em relação à amostra e ao número de lavagens, o que indica que o solvente orgânico (acetona) não foi saturado pelo licopeno. Nesse sentido, os valores de carga liberada podem ser atribuídos ao grau de incorporação do licopeno na estrutura da partícula de CH pelo efeito das proporções de CH e licopeno e a condição do $\text{CO}_2\text{-SC}$ usada no processo. Assim, pode-se afirmar que, na primeira lavagem com acetona, foi retirado o licopeno não incorporado, ou seja, o licopeno que estava na estrutura externa ou superficial da partícula, enquanto que na segunda e terceira lavagem com acetona acredita-se que foi retirado o licopeno incorporado na estrutura interna do CH.

Como esperado, observou-se que uma menor quantidade de licopeno na mistura inicial reduz consideravelmente o licopeno liberado na lavagem 1 (L1) (Figura 13), confirmando a supersaturação com licopeno nas estruturas externas das partículas de CH. Por isso, a proporção com menor conteúdo de licopeno (10:1 de CH/licopeno) é recomendada para reduzir o licopeno não incorporado.

Na segunda lavagem (L2) (Figura 13) foi observado que, com exceção das partículas formadas com a proporção 4:1 de CH/licopeno, a carga liberada das partículas formadas não teve diferença significativa, sugerindo que o CH tem uma capacidade inerente de carga de licopeno de aproximadamente 0,016 g de licopeno/g de CH. De forma similar, na terceira lavagem não foi observada uma diferença significativa na carga liberada das amostras, sugerindo que o CH tem adicionalmente uma capacidade inerente de carga na sua estrutura interna de aproximadamente 0,009 g de licopeno/g de CH. Assim, desprezando a carga de licopeno remanescente nas partículas após as três lavagens e a possibilidade de que na primeira lavagem o solvente poderia ter tirado carga incorporada em poros externos da partícula, pode-se afirmar que a partir da soma das capacidades de carga identificadas na segunda e terceira lavagem, a capacidade de carga de licopeno no CH é aproximadamente 0,025 g de licopeno/g de CH, a qual representa o 25% da carga esperada quando se utilizou a menor proporção de licopeno (10:1 CH/licopeno).

A capacidade de carga constante é coerente com a preservação da morfologia e o aumento de tamanho constante das partículas, e constituiu mais uma evidência de que a formação de partículas de licopeno em CH acontece seguindo um mecanismo de impregnação, na qual o CO₂-SC arrasta licopeno ao interior da estrutura física das partículas de CH. Recomenda-se a proporção 10:1 de CH/licopeno e a condição de CO₂-SC de 140 bar e 50 °C para a formação de partículas, pois as fissuras observadas poderiam ter facilitado a incorporação do licopeno na estrutura física interna e externa do CH.

A seguinte etapa desta dissertação focou na formação de partículas usando a proporção 10:1 de CH/licopeno e condições típicas de impregnação com CO₂-SC, além da caracterização das partículas formadas para o entendimento do mecanismo de formação.

5.3 Estudo de condições de CO₂ supercrítico

As partículas formadas em CO₂-SC a 150 bar e 50 °C, e 250 bar e 50 °C, tiveram aparência similar às observadas na condição de 140 bar e 50 °C (Figura 7). Já em CO₂-SC a 150 bar e 60 °C, e 250 bar e 60 °C, a formação de partículas foi impossível, pois no interior da autoclave formou-se uma massa de aparência viscoelástica (Figura 14), que dificultou a operação de despressurização, motivo pelo qual não pôde ser aproveitada para os fins deste trabalho. Uma explicação para este fenômeno se apresenta na seção de caracterização do comportamento térmico dos materiais envolvidos na mistura.

Figura 14 - Aparência física da mistura após contato com CO₂ supercrítico a 150 bar e 60 °C

Fonte: Própria autoria.

Na sequência são apresentadas as características das partículas formadas, como morfologia, tamanho, propriedades térmicas, estruturas químicas, solubilidade em água, liberação de licopeno em solvente orgânico e estrutura física interna.

5.3.1 Morfologia das partículas

O estudo da morfologia das partículas de CH tratadas com CO₂-SC e das partículas de licopeno em CH formadas com CO₂-SC foi feito através de microscopia eletrônica de varredura. As micrografias das partículas estão nas Figuras 15 e 16.

Figura 15 - Morfologia das partículas de colágeno hidrolisado: A) CO₂ supercrítico a 150 bar e 50 °C, B) CO₂ supercrítico a 150 bar e 60 °C, C) CO₂ supercrítico a 250 bar e 50 °C, e D) CO₂ supercrítico a 250 bar e 60 °C; 500x

Fonte: Própria autoria.

As partículas de CH tratadas com CO₂-SC (Figura 15) não evidenciaram mudanças morfológicas consideráveis quando comparadas com o CH sem tratamento (Figura 8). Já, as partículas de licopeno em CH formadas com CO₂-SC a 150 bar e 50 °C apresentam leve aglomeração, e formação de leves fissuras na superfície (Figura 16), que indicam potencial para uma maior incorporação de licopeno. As partículas de licopeno em CH formadas com CO₂-SC a 250 bar e 50 °C apresentaram-se mais aglomeradas e sem fissuras, o que indica

presença considerável de licopeno livre na sua superfície. A partir das características morfológicas, se infere que o CO₂-SC na temperatura de 50 °C pode impregnar licopeno em CH de maneira mais eficiente na condição de pressão moderada de 150 bar, do que na pressão de 250 bar, indicando que nessa pressão a solubilidade do licopeno é superior à necessária para a impregnação efetiva no CH. A justificativa destas afirmações está apresentada mais adiante, na seção de liberação de licopeno em solvente orgânico.

Figura 16 - Morfologia das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado: A) 100x e B) 1.0kx em CO₂ supercrítico a 150 bar e 50 °C; C) 100x e D) 1.0kx em CO₂ supercrítico a 250 bar e 50 °C

Fonte: Própria autoria.

5.3.2 Distribuição de tamanho das partículas

Os perfis de tamanho das partículas de CH tratadas com CO₂-SC, e das partículas de licopeno em CH formadas com CO₂-SC estão apresentados na Figura 17. Além, os descritores das distribuições de tamanho estão na Tabela 9.

Figura 17 - Distribuição do diâmetro das partículas: A) colágeno hidrolisado tratado com CO₂ supercrítico e B) licopeno em colágeno hidrolisado formado com CO₂ supercrítico

Medidas feitas em triplicata

Fonte: Própria autoria.

Tabela 9 – Descritores da distribuição de tamanho das partículas de colágeno hidrolisado tratado com CO₂ supercrítico e de partículas de licopeno em colágeno hidrolisado formado com CO₂ supercrítico

Material	Tratamento	Descritores			
		Media* (μm)	Mediana (μm)	Moda (μm)	Faixa (μm)
Colágeno hidrolisado	150 bar e 50 °C	108 $\pm$ 2 ^a	78 $\pm$ 2 ^b	82 (20.0%)	30-227
	150 bar e 60 °C	108 $\pm$ 2 ^a	77 $\pm$ 2 ^b	82 (19.9%)	30-227
	250 bar e 50 °C	108 $\pm$ 1 ^a	86 $\pm$ 2 ^a	95 (25.0%)	40-170
	250 bar e 60 °C	117 $\pm$ 9 ^a	76 $\pm$ 3 ^b	82 (17.5%)	19-227
Licopeno em colágeno hidrolisado	150 bar e 50 °C	110 $\pm$ 1 ^a	87 $\pm$ 2 ^a	95 (25.6%)	40-170
	250 bar e 50 °C**	-	-	-	-

Medidas feitas em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

*Diâmetro médio de De Brouckere – D (4,3). **Descritores da distribuição não reportados por não serem coerentes com os tamanhos observados nas micrografias da amostra.

Fonte: Própria autoria.

Os perfis de tamanho das partículas de CH tratadas com CO₂-SC (Figura 17A) foram unimodais e similares entre si, com faixas de tamanho que abrangem das 19 μm ao máximo de 227 μm , e valores de diâmetro médio (D(4,3)) que variaram entre 108 a 117 μm , sem diferenças significativas (Tabela 9). No entanto, as partículas de CH tratadas com CO₂-SC a 250 bar e 50 °C apresentaram um valor de mediana de 86 μm , o qual foi maior aos valores das medianas dos outros tratamentos que variaram entre 76 a 78 μm , sem diferenças significativas; da mesma maneira, neste tratamento, o valor da moda de 95 μm foi maior do que o valor da moda dos outros tratamentos que foi 82 μm (Tabela 9).

As partículas de licopeno em CH formadas com CO₂-SC a 150 bar e 50 °C (Figura 17B) apresentaram distribuição unimodal com faixa de tamanho de 40 a 170 μm , e tamanho médio (D(4,3)) de 110 μm . Enquanto que, o perfil de tamanho das partículas formadas com CO₂-SC a 250 bar e 50 °C (Figura 17B) não foi estudada pela detecção de tamanhos não coerentes (>200 μm) com os observados nas micrografias da amostra (Figuras 16C e 16D).

A partir da comparação da mediana e moda de todos os perfis de tamanho determinados nesta pesquisa (Figuras 12 e 17, Tabelas 8 e 9), notou-se que o CO₂-SC aumentou o tamanho das partículas de CH puro, atingindo um tamanho máximo a 250 bar e 50 °C. Além, as partículas de licopeno em CH atingiram esse tamanho máximo independentemente das proporções estudadas de CH/licopeno e das condições estudadas de CO₂-SC. Assim, com base nos resultados do estudo binário (CH + CO₂-SC), têm-se evidências de que as partículas de CH incharam a causa da adsorção de CO₂.

5.3.3 Solubilidade das partículas em água

O pó de CH utilizado nesta pesquisa é descrito pelo fabricante como ingrediente de alta solubilidade em água. O que tem relação com os resultados obtidos, pois a solubilidade do CH em água foi total (100%) (Figura 18), e como esperado o CH tratado com CO₂-SC foi também totalmente solúvel em água.

Figura 18 - Solubilidade das partículas em água: A) colágeno hidrolisado, B) licopeno em colágeno hidrolisado/fase aquosa isolada e C) licopeno em colágeno hidrolisado/dissolução

Fonte: Própria autoria.

A quantificação da solubilidade em água das partículas de licopeno em CH não foi realizada, pois quando as partículas ficaram em contato com água se formaram duas fases: uma fase aquosa, onde o CH se dissolveu instantaneamente, e uma fase oleosa nas superfícies dos tubos de cor vermelha intensa, que corresponde ao licopeno (Figura 18). No entanto, a fase aquosa isolada apresentou coloração levemente vermelha, o que indica que uma pequena quantidade de licopeno ficou suspensa na água. Por conseguinte, as partículas podem ser incorporadas em alimentos com conteúdo graxo como laticínios, visando a preservação da estrutura física das partículas. Mas, para seu uso como suplemento nutricional, a formulação deve ser aprimorada, já que a polaridade do óleo de girassol, que é o meio de dissolução do licopeno, pode ter interferido na solubilidade em água das partículas.

5.3.4 Propriedades térmicas

Os termogramas DSC do licopeno, do CH sem e com tratamento com CO₂-SC, da mistura física de licopeno e CH, e das partículas de licopeno em CH formadas com CO₂-SC estão apresentados na Figura 19.

Figura 19 - Termogramas do licopeno, colágeno hidrolisado sem e com tratamento de CO₂ supercrítico, mistura física de licopeno e colágeno hidrolisado e das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado formadas com CO₂ supercrítico

CH: Colágeno hidrolisado; MF: Mistura física de licopeno e colágeno hidrolisado; PL: Partículas de licopeno em colágeno hidrolisado; T1: CO₂ supercrítico a 150 bar e 50 °C; T2: CO₂ supercrítico a 250 bar e 50 °C.

Fonte: Própria autoria.

Na análise dos termogramas (Figura 19) foram identificadas a temperatura de transição vítrea (T_g) e a temperatura de fusão (T_f) como principais referências do comportamento térmico das amostras. Esses valores estão exibidos na Tabela 10.

Tabela 10 - Temperatura de transição vítrea (T_g), e temperatura de fusão (T_f) do licopeno, colágeno hidrolisado sem e com tratamento com CO_2 supercrítico, mistura física de licopeno e colágeno hidrolisado, e partículas de licopeno em colágeno hidrolisado formadas com CO_2 supercrítico

	T_g (°C)	T_f (°C)
Licopeno	-53 ± 3	-26 ± 1
Colágeno hidrolisado	64 ± 1 e $90,5 \pm 0,1$	211 ± 2
Colágeno hidrolisado a T1	$51,5 \pm 0,7$ e $83,2 \pm 0,1$	$215,7 \pm 0,7$
Colágeno hidrolisado a T2	$58,9 \pm 0,9$ e $75,4 \pm 0,0$	215 ± 3
Mistura física	$63,2^*$ e 86 ± 1	$-30,1 \pm 0,2$; 188 ± 7 e 216 ± 8
Partículas de licopeno em colágeno hidrolisado T1	$46,8 \pm 0,9$	143 ± 9
Partículas de licopeno em colágeno hidrolisado T2	92 ± 2	206 ± 2

Medidas feitas em duplicata; T1: Tratamento com CO_2 supercrítico a 150 bar e 50 °C, T2: Tratamento com CO_2 supercrítico a 250 bar e 50 °C. * Somente foi identificável em uma medida.

Fonte: Própria autoria.

A comparação do comportamento térmico do CH sem e com tratamento de CO_2 -SC revelou que o CO_2 -SC reduz as duas temperaturas (T_g) da transição vítrea do CH, pois diminuiu de 64 °C e 90,5 °C no CH a 51,5 °C e 83,2 °C no CH tratado com CO_2 -SC a 150 bar e 50 °C, e a 58,9 °C e 75,4 °C no CH tratado com CO_2 -SC a 250 bar e 50 °C (Tabela 10), o que se deve, provavelmente, à plastificação do CH causada pela sorção de moléculas de CO_2 . Desta forma, se evidencia mais uma vez o potencial do CH como biomaterial para aplicações de impregnação supercrítica (KIKIC; VECCHIONE, 2003; ZHOU et al., 2003).

O comportamento térmico do licopeno consistiu em um pico exotérmico a -53 °C e um pico endotérmico a -26 °C (Figura 19). Esse comportamento foi também observado na mistura física de licopeno e CH, pois foram detectados um pico exotérmico pouco definido e um pico endotérmico a -30 °C que corresponderiam ao licopeno (Figura 19). Em relação ao comportamento térmico do CH na mistura física, foi detectado um comportamento similar no T_g , mas diferente no T_f , pois em vez de aparecer um pico endotérmico a 211 °C foram observados dois picos endotérmicos a 188 °C e 216 °C (Figura 19).

O comportamento térmico das partículas de licopeno em CH foi diferente da mistura física de licopeno e CH (Figura 19). Nas partículas formadas não prevaleceram as características térmicas do licopeno livre. Estas partículas mostraram comportamento térmico bem definido, que constou de somente uma T_g e uma T_f , sendo 47 °C a T_g e 143 °C a T_f nas partículas formadas com CO₂-SC a 150 bar e 50 °C, e 92 °C a T_g e 206 °C a T_f nas partículas formadas com CO₂-SC a 250 bar e 50 °C (Tabela 10). Isto indica que as propriedades térmicas das partículas formadas dependem fortemente da condição de CO₂-SC usada. Por outro lado, a desapareição das características térmicas do licopeno sugere que o licopeno e o biomaterial carreador formaram, através de interação eletrostática, um complexo estável termicamente (Guo et al., 2012). Nesse sentido, pode se afirmar que o tratamento com CO₂-SC promove interações entre o licopeno e o CH, que poderiam proteger o licopeno da degradação.

O comportamento térmico também poderia explicar a mudança da mistura física a uma aparência viscoelástica quando foi tratada com CO₂-SC a 150/250 bar e 60 °C (Figura 14). Nessa temperatura, o licopeno começa a degradar-se e o CH inicia a transição vítrea; isso somado à influência do etanol e o CO₂ seriam os possíveis causantes daquela aparência viscoelástica (Figura 14). Uma inferência interessante a partir deste fenômeno é que o processo de formação de partículas com CH deve ser feito a temperaturas menores que a T_g do CH.

5.3.5 Estrutura química das partículas

As estruturas químicas do licopeno, CH sem e com tratamento de CO₂-SC, mistura física de licopeno e CH, e partículas de licopeno em CH formadas com CO₂-SC foram analisadas mediante técnica FTIR. Os espectros de transmitância no infravermelho estão apresentados na Figura 20.

Figura 20 - Espectros FTIR do licopeno, colágeno sem e com tratamento com CO₂ supercrítico, mistura física de licopeno e colágeno hidrolisado, e partículas de licopeno em colágeno hidrolisado formadas com CO₂ supercrítico

CH: colágeno hidrolisado; T1: Tratamento com CO₂ supercrítico a 150 bar e 50 °C; T2: Tratamento com CO₂ supercrítico a 250 bar e 50 °C; MF: Mistura física de colágeno hidrolisado e licopeno; PL: Partículas de licopeno em colágeno hidrolisado.

Fonte: Própria autoria.

A partir da análise dos espectros de absorção (Figura 20) se identificaram as principais bandas das amostras. Esses resultados estão na Tabela 11.

Tabela 11 - Principais bandas (cm^{-1}) dos espectros FTIR do colágeno hidrolisado sem e com tratamento com CO_2 supercrítico, licopeno, mistura física de licopeno e colágeno hidrolisado e partículas de licopeno em colágeno hidrolisado formadas com CO_2 supercrítico

Nº	CH	CH-T1	CH-T2	L-OG	MF	PI-T1	PI-T2	Banda atribuída a:	Modo vibracional e grupo funcional
1	3280	3281	3279	—	3283	3282	3281	CH (~ 3277) ^a	Est. O-H ^a
2	—	—	—	2923	2925	2927	2925	L (~ 2919) ^b , OG (2924) ^c	Est. C-H (CH_3) ^b , C-H assim. (CH_2) ^c
3	—	—	—	2854	2855	2856	2855	L (~ 2851) ^b , OG (2853) ^c	Est. C-H (CH_3) ^b , C-H sim. (CH_2) ^c
4	—	—	—	1744	1744	1744	1745	L (~ 1739) ^b , OG (1746) ^c	Est. -C=C (éster) ^c
5	1634	1634	1634	—	1634	1634	1634	CH (~ 1633) ^a	V. no plano de C=O da amida I ^a
6*	1520	1532	1532	—	1538	1532	1521	CH (~ 1525) ^a	Vs. da amida II (V.P. de C-N e N-H ou CH_2 da glicina) ^a
7	—	—	—	1457	—	—	—	L (~ 1447) ^b , 1462 ^d	Def. C-H (CH_2) ^{b,d} V. dos anéis pirrolidínicos de prolina e hidroxiprolina ^a
8	1446	1446	1447	—	1448	1447	1446	CH (~ 1445) ^a	Def. C-N amina ^a
9	1394	1394	1395	—	1398	1395	1394	CH (~ 1395) ^a	Def. C-N amina ^a
10	1332	1332	1331	—	1332	1332	1331	CH (~ 1332) ^a	V. da amida III (est. de C-N e V. de N-H) ^a
11	1239	1240	1240	—	1240	1241	1232	CH (~ 1238) ^a	Est. -C-O, Def. - CH_2 - ^c
12	—	—	—	1160	1161	1162	1160	OG (~ 1163) ^c	Def. axial C-N ^a
13	1081	1082	1080	—	1083	1082	1079	CH (~ 1081) ^a	Est. C-O (CH_2 -OH) ^e
14	—	—	—	—	1047	1048	—	**Etanol (1000-1050) ^e	Def. fora do plano HC=CH (trans) ^{b,d}
15	—	—	—	958	959	959	959	L (~ 957) ^{b,d}	**e
16	—	—	—	—	879	879	—	**Etanol ^e	Def. -(CH_2) _n -, -HC=CH-(cis-) ^c
17	—	—	—	722	—	—	—	OG (~ 723) ^c	

CH: Colágeno hidrolisado; T1: Tratamento com CO_2 supercrítico a 150 bar e 50 °C; T2: Tratamento com CO_2 supercrítico a 250 bar e 50 °C; L-OG: Licopeno em óleo de girassol; MF: Mistura física; PI: Partículas impregnadas; OG: Óleo de girassol. Est: Estiramento; V.: Vibração; Def: Deformação. *Vibração de meia intensidade sem pico bem definido, amplitude entre 1520-1538. **Intensidade atribuível ao etanol remanescente na partícula.

Fontes: (a) Prestes et al. (2013), (b) Aghel, Ramezani e Amirfakhrian (2011), (c) Guillén e Cabo (1997), (d) Rubio-Díaz et al. (2010), (e) Santos (2016).

O espectro do CH (Figura 20) foi similar ao reportado por Prestes et al. (2013), com bandas características similares. Já o espectro do foi diferente do reportado por Aghel, Ramezani e Amirfakhrian (2011) para licopeno puro, pois o licopeno usado neste trabalho está disperso em 20% em óleo de girassol, e, portanto, foram detectadas vibrações de grupos funcionais de triacilgliceróis como aquelas descritas por Guillén e Cabo (1997). Também se notou a sobreposição de intensidades das bandas de licopeno e do óleo de girassol, pelo qual foi difícil concluir se a banda corresponde a um triacilglicerol ou ao licopeno. No entanto, o licopeno possui bandas características que o diferenciam do óleo de girassol, a banda de 1457 cm^{-1} que corresponde à deformação do C-H (CH_2), e a banda de 957 cm^{-1} que corresponde à deformação fora do plano $\text{HC}=\text{CH}$ (trans) das moléculas de licopeno (AGHEL; RAMEZANI; AMIRFAKHRIAN, 2011; RUBIO-DIAZ et al., 2010).

Na comparação do CH sem e com tratamento com $\text{CO}_2\text{-SC}$ (Figura 20, Tabela 11) observou-se que o espectro permaneceu sem mudanças perceptíveis nas bandas características nem em suas intensidades. Portanto, pode se afirmar que o CH não sofre alterações na sua estrutura química devido ao tratamento com $\text{CO}_2\text{-SC}$.

O espectro da mistura física de licopeno e CH (Figura 20, Tabela 11) revelou que, quando o licopeno e o CH estão misturados, se identificam quase todas intensidades que foram detectadas individualmente no licopeno e no CH, com exceção das intensidades nas bandas de 1457 cm^{-1} , própria do licopeno, e 722 cm^{-1} , própria do óleo de girassol, que desapareceram, o que pode ser evidência de interações físicas entre o licopeno e o CH. Além disso, duas novas bandas foram observadas a 1047 cm^{-1} e 879 cm^{-1} , que podem atribuir-se à presença de etanol utilizado como dispersante na mistura (SANTOS, 2016).

O espectro infravermelho da mistura física de licopeno e CH foi usado como referência na análise dos espectros das partículas de licopeno em CH formadas com $\text{CO}_2\text{-SC}$ (Figura 20, Tabela 11). Assim, foram identificadas mudanças nas intensidades das bandas relacionadas ao licopeno em óleo de girassol em cinco bandas a 2923 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} , 1744 cm^{-1} , 1160 cm^{-1} , 958 cm^{-1} . Nas partículas tratadas com $\text{CO}_2\text{-SC}$ a 150 bar e $50\text{ }^\circ\text{C}$ a intensidade dessas bandas se reduziu consideravelmente, o que sugere a presença de interações moleculares tipo hospedeiro-convidado (*host-guest*) que bloqueiam parcialmente os modos vibracionais do licopeno em óleo de girassol (DURANTE et al., 2016). Nas partículas tratadas com $\text{CO}_2\text{-SC}$ a 250 bar e $50\text{ }^\circ\text{C}$ observou-se aumento leve das

intensidades nas bandas de 2923 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} e a preservação das intensidades das bandas de 1744 cm^{-1} e 958 cm^{-1} , como observado na mistura física. Na condição de $\text{CO}_2\text{-SC}$ a 250 bar e $50\text{ }^\circ\text{C}$ as bandas de 1047 cm^{-1} e 879 cm^{-1} , que foram atribuídas ao etanol, desapareceram, indicando que nessa condição o $\text{CO}_2\text{-SC}$ retira a totalidade do etanol durante a despressurização da autoclave (SANTOS, 2016). Devido a não existirem mudanças consideráveis no espectro, não existem evidências suficientes de que a impregnação na condição de $\text{CO}_2\text{-SC}$ a 250 bar e $50\text{ }^\circ\text{C}$ promove interações químicas entre o licopeno e o CH.

5.3.6 Liberação de licopeno em solvente orgânico

Para o estudo da capacidade de carga e para investigar como o licopeno se encontrou na estrutura física do CH, determinou-se a carga liberada durante 3 lavagens sucessivas com acetona. Esses resultados estão apresentados na Figura 21.

Medidas feitas em duplicata. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$). *A carga liberada está expressada em percentagem com referência à carga ideal de $0,1\text{ g}$ licopeno/ g colágeno hidrolisado.

Fonte: Própria autoria.

Na análise da carga total liberada nas três lavagens (Figura 21), notou-se que as partículas formadas com CO₂-SC a 150 bar e 50 °C mantiveram 94,6% do licopeno usado na formulação da mistura inicial, enquanto que as partículas formadas com CO₂-SC a 250 bar e 50 °C só mantiveram 84,1% do licopeno. As diferenças em quantidade de carga impregnada, segundo a condição CO₂-SC, foram estudadas em várias pesquisas (ALMEIDA et al., 2013; BERENS et al., 1992; HUSSAIN; GRANT, 2012; KAZARIAN et al., 1998; MEDEIROS; FERREIRA; CARCIOFI, 2017; ROJAS et al., 2015; VARONA et al., 2011), e foram atribuídas ao fato de que a solubilidade da substância ativa aumenta quando a pressão do CO₂ aumenta, até o ponto de que a substância ativa tem mais afinidade pelo CO₂ que pelo carreador, permanecendo na fase do CO₂ em vez de incorporar-se na fase do carreador polimérico. Assim, a utilização de CO₂-SC a 150 bar e 50 °C é vantajosa, pois a solubilidade do licopeno em CO₂-SC a 250 bar e 50 °C é tão considerável que foi estudada em aplicações de extração supercrítica a partir de matrizes alimentícias (SHI et al., 2009).

A diferença na carga liberada total das amostras foi definida pela carga liberada na primeira lavagem, pois nas outras lavagens não existiu diferença na carga liberada (Figura 21). Esses resultados indicam que as amostras apresentaram diferente quantidade de licopeno na superfície ou estrutura física externa das partículas, e similar capacidade de carga na estrutura física interna.

Levando em conta as características morfológicas das partículas formadas (Figura 16), pode-se afirmar que as fissuras externas observadas nas partículas feitas com CO₂-SC a 150 bar e 50 °C incorporam licopeno na estrutura externa e evitam a perda de licopeno durante a despressurização; já nas partículas formuladas com CO₂-SC a 250 bar e 50 °C, a falta de fissuras causa uma menor incorporação na estrutura externa das partículas, de modo que o licopeno não arrastado durante a despressurização permanece livre na superfície das partículas, provocando sua aglomeração.

Uma análise qualitativa da carga de licopeno das partículas e sua distribuição na estrutura física interna das partículas se apresenta na seguinte seção.

5.3.7 Análise de estrutura física interna das partículas

Para estudar a estrutura física interna das partículas utilizou-se a técnica de microscopia confocal a laser, que permite a obtenção de imagens de planos axiais das amostras. Como primeiro passo, obteve-se o espectro de emissão de regiões de coloração uniforme das imagens para facilitar a interpretação. O comportamento dos tipos de espectros observados nas amostras está incluído na Figura 22.

Figura 22 - Espectros de emissão de fluorescência de algumas regiões de imagens de microscopia confocal a laser de partículas de colágeno hidrolisado e de licopeno em colágeno hidrolisado

L: Licopeno; LPD: Licopeno pouco disperso; LD: Licopeno disperso; LMD: Licopeno muito disperso; CH: Colágeno hidrolisado; T1: Tratamento com CO₂ supercrítico a 150 bar e 50 °C; T2: Tratamento com CO₂ supercrítico a 250 bar e 50 °C.

Fonte: Própria autoria.

Na análise dos espectros de emissão como resposta à excitação do laser, notou-se que, o CH emitiu fluorescência de cor azul, com intensidade máxima em 478 nm, e o licopeno emitiu fluorescência de cor vermelha, com intensidade máxima em 627 nm (Figura 22). No entanto, o espectro de fluorescência emitido pelo licopeno foi variável, dependendo do grau de dispersão, passando da cor laranja no licopeno pouco disperso, com intensidade máxima em 592 nm, verde no licopeno disperso, com intensidade máxima em 522 nm, até azul claro no licopeno muito disperso, com intensidade máxima em 478

nm, sugerindo que na menor presença de licopeno existe maior predominância do espectro do CH. No caso do CH, as características espectrais indicam que o tratamento com CO₂-SC não altera o espectro de emissão deste biomaterial.

Tomando por base os espectros de emissão, realizou-se a interpretação das imagens do CH sem e com tratamento de CO₂-SC, da mistura física de licopeno e CH, e das partículas de licopeno em CH formadas com CO₂-SC que estão apresentadas nas Figuras 23-26.

Figura 23 - Imagens da estrutura interna de partículas de colágeno hidrolisado (CH): A) sem tratamento supercrítico, B) sem tratamento supercrítico, C) CO₂ supercrítico a 150 bar e 50 °C (T1) e D) CO₂ supercrítico a 250 bar e 50 °C (T2)

Fonte: Própria autoria.

As micrografias do CH (Figura 23) revelaram que a estrutura física interna das partículas carreadoras se caracteriza pela presença de espaços ocos de diferentes tamanhos com morfologia esférica, que permaneceram mesmo quando as partículas foram tratadas com CO₂-SC. Esta estrutura porosa é interessante para aplicações de formação de partículas, porque além da possibilidade de retenção física de licopeno nos espaços ocos, também pode oferecer uma ampla superfície de contato que facilite a interação do licopeno dissolvido em CO₂-SC com o CH.

Figura 24 - Imagens da estrutura interna das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado: A, B) mistura física, C) CO₂ supercrítico a 150 bar e 50 °C (T1) e D) CO₂ supercrítico a 250 bar e 50 °C (T2)

Fonte: Própria autoria.

Na análise da mistura física de licopeno e CH (Figuras 24 A, B), percebeu-se que o CH pode incorporar o licopeno com ajuda do etanol como dispersante, mas de maneira muito heterogênea, dado que existiu aglomeração do licopeno evidenciada nas áreas com coloração vermelha intensa e a presença de áreas onde o CH mantém sua coloração azul característica, como se não tivesse tido contato com o pigmento. Por outro lado, as imagens das partículas de licopeno em CH formadas com CO₂-SC (Figuras 24 C, D) mostraram que o processamento com CO₂-SC permitiu que o licopeno interagisse com o CH, pois se observaram colorações laranja, amarelo, verde e azul-verde, que indicam dispersão em diferentes graus do licopeno na totalidade da estrutura física interna das partículas de CH, sugerindo a dispersão molecular do licopeno na matriz de CH como resultado do processo de impregnação supercrítica (KAZARIAN; MARTIROSYAN, 2002).

Comparando a estrutura interna das partículas formadas, percebeu-se que as partículas formadas com CO₂-SC a 150 bar e 50 °C (Figura 24C) mostraram incorporação de licopeno mais homogênea do que as partículas formadas com CO₂-SC a 250 bar e 50 °C (Figura 24D), o que poderia se explicar pela leve modificação da estrutura física das partículas na condição de CO₂-SC a 150 bar e 50 °C. Na outra condição (CO₂-SC a 250 bar e 50 °C) manteve-se a estrutura física interna do CH sem modificações. Estas características são coerentes com a morfologia das partículas estudadas com microscopia eletrônica de varredura (Figura 16).

A estrutura interna das partículas de licopeno em CH submetidas a lavagem com acetona também foi analisada com microscopia confocal a laser, para observar como a carga de licopeno foi liberada em cada lavagem. Estas imagens estão apresentadas nas Figuras 25 e 26.

Figura 25 - Imagens da estrutura interna das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado formadas com CO₂ supercrítico a 150 bar e 50 °C após lavagens com acetona: A, B) após primeira lavagem, C) após segunda lavagem e D) após terceira lavagem

Fonte: Própria autoria.

As imagens das partículas de licopeno em CH lavadas com acetona (Figuras 25 e 26), revelaram que o comportamento de liberação de licopeno depende da condição de CO₂-SC usada no processo. Nas partículas de licopeno em CH tratadas a 150 bar e 50 °C, a liberação de licopeno foi gradativa, perdendo-se o licopeno aglomerado até restar o CH com coloração verde (Figura 25D), o que indicou a presença de licopeno remanescente fortemente ligado ao CH. Esses resultados têm muita relação com a modificação da estrutura física do CH, o que significa que a formação de fissuras facilitou uma impregnação mais eficiente. No entanto, essa característica também facilitou a liberação do licopeno nas

lavagens com acetona, devido à ausência de barreiras físicas que retenham o licopeno. No caso das partículas de licopeno em CH formadas com CO₂-SC a 250 bar e 50 °C, a liberação do licopeno foi aleatória nas partículas. Algumas retiveram o licopeno e outras perderam a carga de licopeno quase em sua totalidade (Figura 26D). Isso indica que a falta de mudanças morfológicas possibilita a preservação da estrutura interna do CH, que atua como barreira física que impede a liberação do licopeno que se incorporou por efeito do processamento com CO₂-SC.

Figura 26 - Imagens da estrutura interna das partículas de licopeno em colágeno hidrolisado formadas com CO₂ supercrítico a 250 bar e 50 °C após lavagens com acetona: A, B) após primeira lavagem, C) após segunda lavagem e D) após terceira lavagem

Fonte: Própria autoria.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho determinou-se que a solubilidade do colágeno hidrolisado em CO₂ supercrítico a 150 bar e 60 °C foi 0,51 g/KgCO₂. Por ser uma solubilidade baixa, conclui-se que o colágeno hidrolisado não é um biomaterial ideal para processos tipo RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solutions*) ou qualquer outro processo que necessite que o material carreador seja solúvel no CO₂ supercrítico.

No estudo da formação de partículas de misturas físicas feitas com proporções de 4:1, 6:1, 8:1 e 10:1 (m/m) de colágeno hidrolisado/licopeno em CO₂ supercrítico a 140 bar e 50 °C, os pós formados preservaram a estrutura física do colágeno hidrolisado e tiveram o tamanho de partículas aumentado, possivelmente devido ao inchamento pela sorção de CO₂ e à incorporação de licopeno na estrutura física das partículas de colágeno hidrolisado. Devido à limitada capacidade de carga do colágeno hidrolisado e à formação de fissuras na superfície das partículas que ajudam à incorporação do licopeno, foi determinado que a proporção de 10:1 (m/m) de colágeno hidrolisado/licopeno é a mais vantajosa para a formação de partículas, seguindo um mecanismo de impregnação onde o CO₂ supercrítico arrasta o licopeno solubilizado no solvente ao interior da estrutura física do colágeno hidrolisado.

O estudo da formação de partículas da proporção de 10:1 de CH/licopeno em diferentes condições de CO₂ supercrítico (150 bar e 50 °C, 150 bar e 60 °C, 250 bar e 50 °C, 250 bar e 60 °C) revelou que não podem se formar partículas à temperatura 60 °C, pois se forma um material com aparência viscoelástica. Já a 50 °C, as partículas apresentaram aparência de pó e preservaram a estrutura física do material carreador (colágeno hidrolisado). As partículas formadas com CO₂ supercrítico a 150 bar, quando comparadas às partículas formadas com CO₂ supercrítico a 250 bar, mostraram interações eletrostáticas entre o licopeno e o colágeno hidrolisado. Apresentaram, maior carga e melhor homogeneidade na incorporação do licopeno na estrutura física do colágeno hidrolisado, devido à formação de fissuras nas partículas e à possibilidade de estar ocorrendo maior afinidade do licopeno pelo colágeno hidrolisado do que pelo CO₂ nessa condição.

Assim, através de um processo de impregnação supercrítica formou-se um ingrediente alimentar em pó com possível ampla atividade biológica a base de licopeno

incorporado em colágeno hidrolisado. Este trabalho pode ser utilizado como referência para o design de partículas de outros compostos ativos de natureza lipofílica e termosensível impregnadas em pó de colágeno hidrolisado comercial. No entanto, estudos de estabilidade das partículas serão necessários para comprovar a efetividade do processo.

Para trabalhos futuros se sugere o estudo do equilíbrio de fases do sistema CO_2 + etanol + licopeno + colágeno hidrolisado, a determinação da atividade biológica das partículas formadas e a análise de sua incorporação em produtos.

7 REFERÊNCIAS

- AGHEL, N.; RAMEZANI, Z.; AMIRFAKHRIAN, S. Isolation and quantification of lycopene from tomato cultivated in Dezfoul, Iran. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, Ahvaz, v. 6, n. 1, p. 9-15, 2007.
- ALESSI, P. et al. Polydimethylsiloxanes in supercritical solvent impregnation (SSI) of polymers. **Journal of supercritical fluids**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 309-315, 2003.
- ALMEIDA, A. P. et al. Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials using supercritical fluid technology. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 20, p. 140-145, 2013.
- AYOUB, A.; RIZVI, S. S. Properties of supercritical fluid extrusion-based crosslinked starch extrudates. **Journal of applied polymer science**, Hoboken, v. 107, n. 6, p. 3663-3671, 2008.
- BANCHERO, M. et al. Supercritical solvent impregnation of piroxicam on PVP at various polymer molecular weights. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 49, n. 2, p. 271-278, 2009.
- BARROS, A. A. et al. Green solvents for enhanced impregnation processes in biomedicine. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, Lüneburg, 2017.
doi.org/10.1016/j.cogsc.2017.03.014
- BELLO, A. E.; OESSER, S. Collagen hydrolysate for the treatment of osteoarthritis and other joint disorders: a review of the literature. **Current medical research and opinion**, Abingdon, v. 22, n. 11, p. 2221-2232, 2006.
- BERENS, A. R. et al. Application of compressed carbon dioxide in the incorporation of additives into polymers. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 46, n. 2, p. 231-242, 1992.
- BIERHALZ, A. C. et al. Influence of natamycin loading methods on the physical characteristics of alginate active films. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 76, p. 74-82, 2013.
- BLANCH, G. P. et al. Stabilization of all-trans-lycopene from tomato by encapsulation using cyclodextrins. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 105, n. 4, p. 1335-1341. 2007.
- BORGES, J. G. et al. Lecithin, gelatin and hydrolyzed collagen orally disintegrating films: functional properties. **International journal of biological macromolecules**, Guilford, v. 86, p. 907-916, 2016.
- BRAGA, M. E. et al. Effects of operational conditions on the supercritical solvent impregnation of acetazolamide in Balafilcon A commercial contact lenses. **International journal of pharmaceutics**, Lille, v. 420, n. 2, p. 231-243, 2011.

- BRAGA, M. E. et al. Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 245-257, 2008.
- BRAMLEY, P. M. Is lycopene beneficial to human health?. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 54, n. 3, p. 233-236, 2000.
- BRUNNER, G. Applications of supercritical fluids. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, Berkeley, v. 1, p. 321-342, 2010.
- CELLI, G. B. et al. Encapsulation of lycopene from watermelon in calcium-alginate microparticles using an optimised inverse-gelation method by response surface methodology. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 51, n. 6, p. 1523-1529, 2016.
- CHENG, Y. S. et al. Encapsulation of lycopene with lecithin and α -tocopherol by supercritical antisolvent process for stability enhancement. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, 2017. doi.org/10.1016/j.supflu.2016.12.021
- CHIOU, J. S.; BARLOW, J. W.; PAUL, D. R. Plasticization of glassy polymers by CO₂. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 30, n. 6, p. 2633-2642, 1985.
- CHIU, Y. T. et al. Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly (γ -glutamic acid) as carrier. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 55, n. 13, p. 5123-5130, 2007.
- CLARK, K. L. Nutritional considerations in joint health. **Clinics in sports medicine**, Maryland Heights, v. 26, n. 1, p. 101-118, 2007.
- COCERO, M. J. et al. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: fundamentals and applications. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 546-555, 2009.
- CORNELIO-SANTIAGO, H. P. et al. Supercritical CO₂ extraction of oil from green coffee beans: solubility, triacylglycerol composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, 2017. doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.030
- CORTESI, A. et al. Supercritical fluids chromatography for impregnation optimization. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 61-68, 2000.
- COSTA, V. P. et al. Anti-glaucoma drug-loaded contact lenses prepared using supercritical solvent impregnation. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 165-173, 2010a.
- COSTA, V. P. et al. Development of therapeutic contact lenses using a supercritical solvent impregnation method. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 306-316, 2010b.

- DENIS, A. et al. Molecular weight determination of hydrolyzed collagens. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 989-994, 2008.
- DESELCU, D. C.; MILITARU, G.; DESELCU, V. Obtaining of biodegradable plastic materials. **Materiale plastice**, Bucharest, v. 51, n. 1, p. 72-74. 2014.
- DIAS, A. M. A. et al. Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide. **International journal of pharmaceutics**, Lille, v. 408, n. 1, p. 9-19, 2011.
- DIAS, A. M. A. et al. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucatá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 74, p. 34-45, 2013.
- DIMASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of biochemistry and biophysics**, Maryland Heights, v. 274, n. 2, p. 532-538, 1989.
- DORĐEVIĆ, V. et al. Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. **Food Engineering Reviews**, New York, v. 7, n. 4, p. 452-490, 2015.
- DURANTE, M. et al. α -Cyclodextrin encapsulation of supercritical CO₂ extracted oleoresins from different plant matrices: A stability study. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 199, p. 684-693, 2016.
- ESFANDIARI, N. Production of micro and nano particles of pharmaceutical by supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 100, p. 129-141, 2015.
- GIROTRA, P.; SINGH, S. K.; NAGPAL, K. Supercritical fluid technology: a promising approach in pharmaceutical research. **Pharmaceutical development and technology**, London, v. 18, n. 1, p. 22-38, 2013.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 1813-1827, 2011.
- GOÑI, M. L. et al. Eugenol-loaded LLDPE films with antioxidant activity by supercritical carbon dioxide impregnation. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 111, p. 28-35, 2016.
- GOÑI, M. L. et al. Supercritical CO₂ iof LDPE films with terpene ketones as biopesticides against corn weevil (*Sitophilus zeamais*). **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 122, p. 18-26, 2017.
- GONZÁLEZ-CHOMÓN. et al. Antifouling foldable acrylic IOLs loaded with norfloxacin by aqueous soaking and by supercritical carbon dioxide technology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 383-391, 2012.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. A new technique for spray-dried encapsulation of lycopene. **Drying Technology**, New York, v. 30, n. 6, p. 641-652, 2012.

GUILLEN, M. D.; CABO, N. Characterization of edible oils and lard by Fourier transform infrared spectroscopy. Relationships between composition and frequency of concrete bands in the fingerprint region. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Heidelberg, v. 74, n. 10, p. 1281-1286, 1997.

GUILLERMINET, F. et al. Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: An in vitro and in vivo study. **Bone**, New York, v. 46, n. 3, p. 827-834, 2010.

GUNEY, O.; AKGERMAN, A. Synthesis of controlled-release products in supercritical medium. **AIChE Journal**, Hoboken, v. 48, n. 4, p. 856-866, 2002.

GUO, H. et al. Optimization of technological parameters for preparation of lycopene microcapsules. **Journal of food science and technology**, New Delhi, v. 51, n. 7, p. 1318-1325, 2012.

HOWDLE, S. M.; RAMSAY, J. M.; COOPER, A. I. Spectroscopic analysis and in situ monitoring of impregnation and extraction of polymer films and powders using supercritical fluids. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, Hoboken, v. 32, n. 3, p. 541-549, 1994.

HUANG, F.H. et al. An accurate equation of state for carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, Bunkyo-ku, v. 18, n. 6, p. 490-496, 1985.

HUSSAIN, Y. A.; GRANT, C. S. Ibuprofen impregnation into submicron polymeric films in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 71, p. 127-135, 2012.

INOUE, N.; SUGIHARA, F.; WANG, X. Ingestion of bioactive collagen hydrolysates enhance facial skin moisture and elasticity and reduce facial ageing signs in a randomised double-blind placebo-controlled clinical study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 96, n. 12, p. 4077-4081, 2016.

IVANOVIC, J. et al. Supercritical CO₂ sorption kinetics and thymol impregnation of PCL and PCL-HA. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 107, p. 486-498, 2016.

IWAI, K. et al. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 6531-6536, 2005.

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

KAZARIAN, S. G. et al. In situ spectroscopy of polymers subjected to supercritical CO₂: plasticization and dye impregnation. **Applied Spectroscopy**, Thousand Oaks, v. 51, n. 4, p. 491-494, 1997.

KAZARIAN, S. G. et al. Partitioning of solutes and cosolvents between supercritical CO₂ and polymer phases. **Journal of supercritical fluids**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 107-112, 1998.

KAZARIAN, S. G. et al. Specific intermolecular interaction of carbon dioxide with polymers. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 118, n. 7, p. 1729-1736, 1996.

KAZARIAN, S. G.; MARTIROSYAN, G. G. Spectroscopy of polymer/drug formulations processed with supercritical fluids: in situ ATR-IR and Raman study of impregnation of ibuprofen into PVP. **International Journal of Pharmaceutics**, Lille, v. 232, n. 1, p. 81-90, 2002.

KAZARIAN, S. G. Polymer processing with supercritical fluids. **Polymer Science Series C**, Moscow, v. 42, n. 1, p. 78-101, 2000.

KELLY, C. A. et al. Viscosity studies of poly (DL-lactic acid) in supercritical CO₂. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, Hoboken, v. 50, n. 19, p. 1383-1393, 2012.

KHOSRAVI-DARANI, K. et al. Solubility of poly (β -hydroxybutyrate) in supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical & Engineering Data**, Washington, v. 48, n. 4, p.860-863, 2003.

KIKIC, I.; VECCHIONE, F. Supercritical impregnation of polymers. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, Madison, v. 7, n. 4, p. 399-405, 2003.

KIM, E. H. J.; CHEN, X. D.; PEARCE, D. Melting characteristics of fat present on the surface of industrial spray-dried dairy powders. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2005.

KNEZ, Ž. et al. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, Cape Town, v. 77, p. 235-243, 2014.

KNEZ, Ž.; WEIDNER, E. Particles formation and particle design using supercritical fluids. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, Madison, v. 7, n. 4, p. 353-361, 2003.

KUN, Y.; LULE, U. S.; XIAO-LIN, D. Lycopene: Its properties and relationship to human health. **Food Reviews International**, New York, v. 22, n. 4, p. 309-333, 2006.

LANGMAIER, F. et al. Biodegradable packing materials based on waste collagen hydrolysate cured with dialdehyde starch. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, v. 93, p. 547-552, 2008a.

LANGMAIER, F. et al. Biodegradable packing materials from hydrolysates of collagen waste proteins. **Waste Management**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 549-556, 2008b.

LANGMAIER, F. et al. Collagenous hydrolysates from untraditional sources of proteins. **International Journal of Cosmetic Science**, London, v. 23, n. 4, p. 193-199, 2001.

- LANGMAIER, F. et al. Isolation of elastin and collagen polypeptides from long cattle tendons as raw material for the cosmetic industry. **International Journal of Cosmetic Science**, London, v. 24, n. 5, p. 273-279, 2002.
- LEE, M. T.; CHEN, B. H. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 78, n. 4, p. 425-432, 2002.
- LI, G. Y. et al. Comparative study of the physiological properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate as cosmetic materials. **International Journal of Cosmetic Science**, London, v. 27, n. 2, p. 101-106, 2005.
- MA, Z. et al. New developments in particle characterization by laser diffraction: size and shape. **Powder Technology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 66-78, 2000.
- MACHADO, L. C.; PELEGATI, V. B.; OLIVEIRA, A. L. Study of simple microparticles formation of limonene in modified starch using PGSS—Particles from gas-saturated suspensions. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 107, p. 260-269, 2016.
- MARTÍN, A.; COCERO, M. J. Micronization processes with supercritical fluids: fundamentals and mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Salt Lake City, v. 60, n. 3, p. 339-350, 2008.
- MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Microencapsulation of lycopene with cyclodextrins. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 23, p. 102-105, 2003.
- MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Licopeno encapsulado em goma arábica e maltodextrina: Estudo da estabilidade. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 5, p. 197-203, 2002.
- MEDEIROS, G. R.; FERREIRA, S. R.; CARCIOFI, B. A. High pressure carbon dioxide for impregnation of clove essential oil in LLDPE films. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 41, p. 206-215, 2017.
- MIGUEL, F. et al. Supercritical anti solvent precipitation of lycopene: Effect of the operating parameters. **Journal of supercritical fluids**, Amsterdam, v. 36, n. 3, p. 225-235, 2006.
- MILOVANOVIC, S. et al. Effect of starch xero-and aerogels preparation on the supercritical CO₂ impregnation of thymol. **Starch-Stärke**, Weinheim, v. 67, n. 1-2, p. 174-182, 2015a.
- MILOVANOVIC, S. et al. Supercritical impregnation of cellulose acetate with thymol. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 97, p. 107-115, 2015b.
- MORIMURA, S. et al. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. **Process Biochemistry**, London, v. 37, p. 1403-1412, 2002.
- MOSKOWITZ, R. W. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. **Seminars in arthritis and rheumatism**, Maryland Heights, v. 30, n. 2, p. 87-99, 2000.

- NALAWADE, S. P. et al. Prediction of the viscosity reduction due to dissolved CO₂ of and an elementary approach in the supercritical CO₂ assisted continuous particle production of a polyester resin. **Powder technology**, Amsterdam, v. 170, n. 3, p. 143-152, 2006.
- NATU, M. V.; GIL, M. H.; SOUSA, H. C. Supercritical solvent impregnation of poly (ε-caprolactone)/poly (oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) and poly (ε-caprolactone)/poly (ethylene-vinyl acetate) blends for controlled release applications. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 93-102, 2008.
- NEROME, H. et al. Nanoparticle formation of lycopene/β-cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent precipitation. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 83, p. 97-103, 2013.
- NEYESTANI–MOHAMMAD, M. M. T. R.; MOHAMMADIFAR, A. Development of reduced-fat and reduced-energy dark chocolate using collagen hydrolysate as cocoa butter replacement agent. **Journal of Food and Nutrition Research**, Bratislava, v. 53, n. 1, p. 13-21, 2014.
- NUNES, I. L.; MERCADANTE, A. Z. Encapsulation of lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 5, p. 893-900, 2007.
- PEI, Y. et al. Fabrication, properties and bioapplications of cellulose/collagen hydrolysate composite films. **Carbohydrate polymers**, Kidlington, v. 92, n. 2, p. 1752-1760, 2013.
- PELISSARI, J. R. et al. Production of solid lipid microparticles loaded with lycopene by spray chilling: Structural characteristics of particles and lycopene stability. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 98, p. 86-94, 2016.
- PÉREZ-MASIÁ, R.; LAGARON, J. M.; LOPEZ-RUBIO, A. Morphology and stability of edible lycopene-containing micro-and nanocapsules produced through electrospraying and spray drying. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 8, n. 2, p. 459-470, 2015.
- PERRUT, M.; JUNG, J.; LEBOEUF, F. Enhancement of dissolution rate of poorly-soluble active ingredients by supercritical fluid processes: Part I: Micronization of neat particles. **International journal of pharmaceutics**, Lille, v. 288, n. 1, p. 3-10, 2005a.
- PERRUT, M.; JUNG, J.; LEBOEUF, F. Enhancement of dissolution rate of poorly-soluble active ingredients by supercritical fluid processes: Part II: Preparation of composite particles. **International journal of pharmaceutics**, Lille, v. 288, n. 1, p. 11-16, 2005b.
- PERVEEN, R. et al. Tomato (*Solanum lycopersicum*) Carotenoids and Lycopenes Chemistry; Metabolism, Absorption, Nutrition, and Allied Health Claims—A Comprehensive Review. **Critical reviews in food science and nutrition**, New York, v. 55, n. 7, p. 919-929, 2015.
- PORFÍRIO, E.; FANARO, G. B. Collagen supplementation as a complementary therapy for the prevention and treatment of osteoporosis and osteoarthritis: a systematic review. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 153-164, 2016.

- PRESTES, R. C. et al. Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 15, n. 4, p. 375-382, 2013.
- PU, C.; TANG, W. Encapsulation of lycopene in *Chlorella pyrenoidosa*: loading properties and stability improvement. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 235, p. 283–289, 2017.
- RANVEER, R.C. et al. Microencapsulation and Storage Stability of Lycopene Extracted from Tomato Processing Waste. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 58, n. 6, p. 953-960, 2015.
- RAO, A. V.; AGARWAL, S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. **Nutrition research**, New York, v. 19, n. 2, p. 305-323, 1999.
- REVERCHON, E. et al. Supercritical fluids processing of polymers for pharmaceutical and medical applications. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 484-492, 2009.
- ROCHA, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. **Food and bioproducts processing**, London, v. 90, n. 1, p. 37-42, 2012.
- ROCHA-SELMÍ, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. Morphology, stability, and application of lycopene microcapsules produced by complex coacervation. **Journal of Chemistry**, New York, 2013.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Effects of processing and storage on food carotenoids. **Sight and Life Newsletter**, Basel, v. 3, p. 25-35, 2002.
- ROJAS, A. et al. Supercritical impregnation and kinetic release of 2-nonanone in LLDPE films used for active food packaging. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 104, p. 76-84, 2015.
- ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. A. scanning electron microscopy study of microencapsulation. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 50, n. 1, p. 139-144, 1985.
- RUBIO-DIAZ, D. E. et al. Profiling of nutritionally important carotenoids from genetically-diverse tomatoes by infrared spectroscopy. **Food chemistry**, Amsterdam, v. 120, n. 1, p. 282-289, 2010.
- SALDAÑA, M. D.; COIMBRA, J. S. R.; CARDOZO-FILHO, L. Recovery, encapsulation and stabilization of bioactives from food residues using high pressure techniques. **Current Opinion in Food Science**, Kidlington, v. 5, p. 76-85, 2015.
- SANTOS, D. T. et al. Production of stabilized sub-micrometric particles of carotenoids using supercritical fluid extraction of emulsions. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 61, p. 167-174, 2012.

SANTOS, D. N. **Microencapsulação de Esqualeno Proveniente do Óleo do Fígado de Cação-Azul Via Precipitação com CO₂ Supercrítico**. 2016. 167 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

SECCHI, G. Role of protein in cosmetics. **Clinics in dermatology**, Philadelphia, v. 26, n. 4, p. 321-325, 2008.

SHARIATI, A.; PETERS, C. J. Recent developments in particle design using supercritical fluids. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, Madison, v. 7, n. 4, p. 371-383, 2003.

SHARMA, P. K. et al. Novel Encapsulation of Lycopene in Niosomes and Assessment of its Anti-cancer Activity. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, Los Angeles, v. 8, n. 5, p. 224-232, 2016.

SHI, J. et al. Oxidation and isomerization of lycopene under thermal treatment and light irradiation in food processing. **Preventive Nutrition and Food Science**, Busan, v. 7, n. 2, p. 179-183, 2002.

SHI, J. et al. Solubility of lycopene in supercritical CO₂ fluid as affected by temperature and pressure. **Separation and Purification Technology**, Kidlington, v. 66, n. 2, p. 322-328, 2009.

SHU, B. et al. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, London, v. 76, n. 4, p. 664-669, 2006.

SILVA, D. F. et al. Microencapsulation of lycopene by gelatin–pectin complex coacervation. **Journal of Food Processing and Preservation**, Hoboken, v. 36, n. 2, p. 185-190, 2012.

SILVA, G. F. **Extração de pigmentos do Urucum com CO₂ supercrítico**. 1999. 192p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

SOARES, N. C. et al. Anticancer properties of carotenoids in prostate cancer: A review. **Histology and histopathology**, Murcia, v. 30, n. 10, p. 1143-1154, 2015.

SOUZA, A. C. et al. Impregnation of cinnamaldehyde into cassava starch biocomposite films using supercritical fluid technology for the development of food active packaging. **Carbohydrate polymers**, Kidlington, v. 102, p. 830-837, 2014.

SPROULE, T. L. et al. Bioactive polymer surfaces via supercritical fluids. **Journal of supercritical fluids**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 241-248, 2004.

SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A.K. Lycopene; chemistry, biosynthesis, metabolism and degradation under various abiotic parameters. **Journal of Food Science and Technology**, New Delhi, v. 52, n.1, p. 41-53, 2015.

TABERNERO, A.; DEL VALLE, E. M. M.; GALÁN, M. A. Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: methods, basic fundamentals and modelling. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, Amsterdam, v. 60, p. 9-25, 2012.

TANG, C. et al. Preparation of ibuprofen-loaded chitosan films for oral mucosal drug delivery using supercritical solution impregnation. **International Journal of Pharmaceutics**, Lille, v. 473, n. 1, p. 434-441, 2014.

TOM, J. T.; DEBENEDETTI, P. G. Formation of Bioerodible Polymeric Microspheres and Microparticles by Rapid Expansion of Supercritical. Solutions. **Biotechnology Progress**, Malden, v. 7, p. 403-411, 1991.

TOMASKO, D. L. et al. A review of CO₂ applications in the processing of polymers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 42, n. 25, p. 6431-6456, 2003.

TORRES, A. et al. Effect of processing conditions on the physical, chemical and transport properties of polylactic acid films containing thymol incorporated by supercritical impregnation. **European Polymer Journal**, Kidlington, v. 89, p. 195-210, 2017.

TORRES, A. et al. Near critical and supercritical impregnation and kinetic release of thymol in LLDPE films used for food packaging. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 85, p. 41-48, 2014.

ÜZER, S.; AKMAN, U.; HORTAÇSU, Ö. Polymer swelling and impregnation using supercritical CO₂: a model-component study towards producing controlled-release drugs. **Journal of supercritical fluids**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 119-128, 2006.

VARONA, S. et al. Supercritical impregnation of lavandin (*Lavandula hybrida*) essential oil in modified starch. **Journal of supercritical fluids**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 313-319, 2011.

VON SCHNITZLER, J.; EGGERS, R. Mass transfer in polymers in a supercritical CO₂-atmosphere. **Journal of supercritical fluids**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 81-92, 1999.

WALRAND, S. et al. Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 56, n. 17, p. 7790-7795, 2008.

WANG, Y.; YANG, C.; TOMASKO, D. Confocal microscopy analysis of supercritical fluid impregnation of polypropylene. **Industrial & engineering chemistry research**, Washington, v. 41, n. 7, p. 1780-1786, 2002.

WANG, Z. et al. Improvement of skin condition by oral administration of collagen hydrolysates in chronologically aged mice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 97, n. 9, p. 2721-2726, 2017.

WEBB, K. F.; TEJA, A. S. Solubility and diffusion of carbon dioxide in polymers. **Fluid phase equilibria**, Amsterdam, v. 158, p. 1029-1034, 1999.

WEIDNER, E. High pressure micronization for food applications. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 556-565, 2009.

WISSINGER, R. G.; PAULAITIS, M. E. Swelling and sorption in polymer-CO₂ mixtures at elevated pressures. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, Hoboken, v. 25, n. 12, p. 2497-2510, 1987.

WU, J. et al. Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, Tokyo, v. 22, p. 547-553, 2004.

XUE, F. et al. Encapsulation of tomato oleoresin with zein prepared from corn gluten meal. **Journal of Food Engineering**, London, v. 119, n. 3, p. 439-445, 2013.

YAÑEZ, F. et al. Supercritical fluid-assisted preparation of imprinted contact lenses for drug delivery. **Acta biomaterialia**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 1019-1030, 2011.

YEO, S. D.; KIRAN, E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: a review. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 287-308, 2005.

YORGANCIOGLU, A.; BAYRAMOGLU, E. E. Production of cosmetic purpose collagen containing antimicrobial emulsion with certain essential oils. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 44, p. 378-382, 2013.

YU, J. P. et al. Preparation of roxithromycin-loaded poly (l-lactic acid) films with supercritical solution impregnation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 50, n. 24, p. 13813-13818, 2011.

ZARENA, A. S.; SANKAR, K. U. Design of submicron and nanoparticle delivery systems using supercritical carbon dioxide-mediated processes: an overview. **Therapeutic delivery**, London, v. 2, n. 2, p. 259-277, 2011.

ZHAN, S. et al. Preparation of 5-Fu-loaded PLLA microparticles by supercritical fluid technology. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 52, n. 8, p. 2852-2857, 2013.

ZHANG, Z.; LI, G.; SHI, B. I. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. **Journal Society of Leather Technologists and Chemists**, Redbourne, v. 90, n. 1, p. 23-28, 2006.

ZHOU, H. et al. Effect of the supercritical CO₂ on surface structure of PMMA/PS blend thin films. **Journal of supercritical fluids**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 137-145, 2003.